



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

**EFEITOS DO DISSELENETO DE DIFENILA NA
ATIVIDADE DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO
DESIDRATASE
E EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolina Quatrin Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**EFEITOS DO DISSELENETO DE DIFENILA NA ATIVIDADE DA
ENZIMA δ AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS COM DIABETES
MELLITUS TIPO 1**

por

Carolina Quatrin Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Bioquímica
Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Santa Maria, RS, Brasil

2004

© 2004

Todos os direitos autorais reservados a Carolina Quatrin Oliveira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Robson Flores, quadra 11, casa 15, COHAB Fernando Ferrari, Santa Maria, RS, 97105-255

Fone (0xx)55 30273905; End. Eletr: carolbioquimica@yahoo.com.br

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Curso de Mestrado em Bioquímica Toxicológica

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

**EFEITOS DO DISSELENETO DE DIFENILA NA ATIVIDADE
DA ENZIMA δ AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E EM
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS COM DIABETES
MELLITUS TIPO 1**

elaborada por
Carolina Quatrin Oliveira

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristina Wayne Nogueira
(Orientadora)

Kátia Padilha Barreto

Vera Maria Morsch

Santa Maria, julho de 2004

"(...) Algumas doenças são visitas: chegam sem avisar, perturbam a paz e se vão. (...) Outras doenças vêm para ficar. E é inútil reclamar. Se vierem para ficar, é preciso fazer com elas o que a gente faria caso alguém se mudasse definitivamente para nossa casa: arrumar as coisas da melhor maneira possível para que a convivência não seja dolorosa. Quem sabe se pode até tirar algum proveito da situação? (...)".

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

A Deus sem o qual nada seria possível, pela vida, pela esperança e pelas bênçãos.

A toda minha família, em especial meus pais, pessoas que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado incentivando-me, dando carinho, compreensão e coragem.

A minha orientadora Cristina pela oportunidade de fazer parte do mundo científico e principalmente pela paciência, conhecimento, encorajamento e compreensão, virtudes sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Jackson, pela paciência, carinho e pelo companheirismo em todos os momentos, a sua ajuda foi muito importante para superar as dificuldades neste momento.

À minha prima Mariana que contribuiu de maneira direta e indireta para este trabalho.

Ao co-orientador Gilson pela contribuição, principalmente química deste estudo e também pelos momentos de descontração.

À Nilda e ao Elizandro que me acompanharam diretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório: "Lucielli, Francielli e Vanessa (as "meninas superpoderosas), também aos colegas Elusa, Carlos Eduardo, Dionéia, Tati, Alex e as mais recentes "aquisições" Ana e Simone, pela solidariedade nos momentos difíceis e pela contribuição direta de alguns neste trabalho. E como não poderia deixar de ser, obrigado pelas alegrias, festas, risadas, danças e brincadeiras que serão difíceis de esquecer.

Aos colegas Dionei e Guilherme que, apesar de se desligarem do grupo, não deixaram de contribuir de alguma maneira neste trabalho.

A todas as pessoas do laboratório do Professor Gilson, Braga e João Batista por terem compartilhado os momentos especiais, especialmente as festas animadas.

Há muito mais a quem agradecer... a todos aqueles que embora não nomeados brindaram-me com seus inestimáveis apoios em distintos momentos, o meu reconhecido e carinhoso "muito obrigado".

RESUMO

Dissertação de mestrado
Curso de pós-graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DO DISSELENETO DE DIFENILA NA ATIVIDADE DA ENZIMA δ -AMINOLEVULINATO DESIDRATASE E EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE RATOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1

Autora: Carolina Quatrin Oliveira
Orientadora : Cristina Wayne Nogueira
Co-orientador: Gilson Zeni

Data e local da defesa: Santa Maria, 16 de Julho de 2004

A hiperglicemia e o estresse oxidativo são fatores fortemente envolvidos no desenvolvimento de muitos distúrbios que caracterizam o Diabetes Mellitus. Sabe-se que alguns compostos orgânicos e inorgânicos de selênio são potentes agentes antioxidantes e que determinados compostos inorgânicos de selênio apresentam atividade similar à insulina no controle da hiperglicemia. Baseando-se nesses dados, o presente estudo avaliou o efeito do composto orgânico de selênio, disseleneto de difenila, na atividade da enzima δ -ALA-D e em parâmetros bioquímicos de ratos diabéticos tipo 1, induzidos com aloxano. Os animais foram tratados com 6 doses consecutivas de disseleneto de difenila (10 mg/kg, s.c) administrado antes (pré-tratamento) ou após (pós-tratamento) à indução de Diabetes. O composto em questão apresentou atividade inibitória *per se* sobre a atividade da enzima δ -ALA-D hepática e renal dos animais pré e pós-tratados e sacrificados 14 dias após a indução. Em contrapartida não foi verificado efeito sobre os demais tecidos. Sobre a atividade hepática, o disseleneto de difenila manteve os níveis de aminotransferases comparáveis aos níveis do controle apenas na primeira semana da indução, tanto no pré quanto no pós-tratamento. Além disso, os resultados encontrados sugerem que o disseleneto de difenila parece possuir a habilidade de regular os níveis de glicose sanguínea e frutossamina sérica que estavam alteradas nos animais diabéticos. Desta maneira, o disseleneto de difenila não foi eficaz em proteger a inibição da atividade da enzima δ -ALA-D verificada nesta dose e protocolo testados, entretanto ele parece possuir atividade hepatoprotetora e propriedade redutora do estado de hiperglicemia. Assim novos estudos poderiam ser realizados para investigar outras propriedades do disseleneto de difenila e os mecanismos envolvidos nestes efeitos farmacológicos, levando também em consideração que o mesmo possui uma estrutura química relativamente simples, que de fato representaria uma vantagem econômica.

Palavras chaves: Diabetes Mellitus, disseleneto de difenila, δ -ALA-D, aloxano.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Course of Master's Degree in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF DIPHENYL DISELENIDE ON δ -AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE ACTIVITY AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF DIABETES MELLITUS TYPE 1 RATS

Author: Carolina Quatrin Oliveira

Advisor: Cristina Wayne Nogueira

Co-advisor: Gilson Zeni

Date and Place of the Defense: Santa Maria, July, 16 2004

The hyperglycemia and oxidative stress are factors strongly involved on development of many disorders that characterize the Diabetes Mellitus. It is known that some organic and inorganic selenium compounds are potent antioxidant agents and present similar activity to the insulin in the control of hyperglycemia. Base on these data, the present study evaluated the effect of the organoselenium compound, diphenyl diselenide, on the δ -ALA-D activity and biochemical parameters of diabetic type 1 rats, induced by alloxan. The animals were treated with 6 consecutives doses of diphenyl diselenide (10 mg/kg, s.c) administrated before (pre-treatment) or after (post-treatment) diabetes induction. Diphenyl diselenide presented inhibitory effect *per se* on hepatic and renal δ -ALA-D activity. However, this effect was not verified on other tissues. Regarding aminotransaminases, there was no difference on aminotransaminases for both diphenyl diselenide pre and post treated rats at the first week of the induction. Besides, the results suggest that diphenyl diselenide seem to possess ability to regulate the levels of plasma glucose and serum fructosamine altered in diabetic animals. Thus, diphenyl diselenide was not effective in protecting δ -ALA-D inhibition verified in this dose and protocol. However, this compound seems to possess hepatic protector effect and property of reducing the hyperglycemia. Considering that diphenyl diselenide has a simple chemistry structure and it is easily prepared, new studies could be carried out to investigate other pharmacological properties as well the mechanisms involved in diphenyl diselenide effects.

Key words: Diabetes Mellitus, diphenyl diselenide, δ -ALA-D, alloxan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Glicosilação não enzimática de proteínas	5
Figura 2 – Possível ligação entre estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia e... subseqüente desenvolvimento de complicações diabéticas.....	7
Figura 3 – Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-amino levulínico catalisada pela enzima δ -ALA-	10
Figura 4 – Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos	11
Figura 5 – Estrutura do disseleneto de difenila	22
Figura 6 – Níveis de frutossamina sérica dos animais que receberam pré (A) e pós- tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes	29
Figura 7 – Níveis de frutossamina sérica dos animais que receberam pré (A) e pós- tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes	30
Figura 8 — Dosagem de creatinina plasmática nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias após a indução de Diabetes (B).....	31
Figura 9 – Dosagem de uréia nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias após a indu- ção de Diabetes (B)	32
Figura 10 – Dosagem de colesterol plasmático nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias após a indução de Diabetes (B).....	34
Figura 11 – Dosagem de triglicérides plasmáticos nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias após a indução de diabetes	35
Figura 12 – Atividade da enzima alanina aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indu- ção de Diabetes.....	37
Figura 13 – Atividade da enzima alanina aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a in- dução de Diabetes.....	38
Figura 14 – Atividade da enzima aspartato aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a in- dução de diabete	38
Figura 15 – Atividade da enzima aspartato aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indu- ção de diabetes.....	38

Figura 16 – Atividade da enzima δ ALA-D hepática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes	39
Figura 17 – Atividade da enzima δ ALA-D hepática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes	40
Figura 18 – Atividade da enzima δ ALA-D renal nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes.....	41
Figura 19 – Atividade da enzima δ ALA-D renal nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes.....	41
Figura 20 – Atividade da enzima δ ALA-D cerebral nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes	42
Figura 21 – Atividade da enzima δ ALA-D cerebral nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes	43
Figura 22 – Atividade da enzima δ ALA-D esplênica nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes	44
Figura 23 – Atividade da enzima δ ALA-D esplênica nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes ...	44

LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS

Esquema I - Pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila e indução de diabetes mellitus com aloxano.....	25
Tabela I - Efeito do pré-tratamento com disseleneto de difenila nos níveis de glicose (mg/dL) em ratos diabéticos induzidos por aloxano	28
Tabela II - Peso corporal dos ratos pré-tratados com disseleneto de difenila	44
Tabela III - Peso corporal dos ratos pós-tratados com disseleneto de difenila.....	45

ABREVIATURAS

δ -ALA – ácido delta-aminolevulínico ou delta-aminolevulinato.

δ -ALA-D – ácido delta-aminolevulinato desidratase

ALT–aspartato aminotransferase

ANOVA – análise de variância

AST–alanina aminotransferase

DM – diabetes mellitus

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EP – Erro padrão

ERO – espécies reativas de oxigênio

GAD65 – auto-anticorpo para ácido glutâmico descarboxilase

GSH – glutathiona reduzida

GSHPx – glutathiona peroxidase

GSSG – glutathiona oxidada

GHb - hemoglobina glicosilada

Hb – hemoglobina

HbA1 - hemoglobina A1

HbC – hemoglobina C

HbF – hemoglobina F

HbS – hemoglobina S

HLA – antígeno leucocitário humano

i.p – intraperitoneal

i.v. – intravenosa

IA-1 – auto-anticorpos para tirosina fosfatase 1

IA-2 - auto-anticorpos para tirosina fosfatase 2

IAA's – Auto-anticorpos para insulina

ICA's – Auto-anticorpos das ilhotas pancreáticas

IDDM – diabetes mellitus insulino-dependente

NIDDM – diabetes mellitus não insulino-dependente

NF-Kb - fator nuclear-kappa B

PBG – porfobilinogênio

PIG- produtos iniciais de glicosilação avançada

PTGA (“AGE’s”)- produtos terminais de glicosilação avançada

RAGE – receptor para AGE’s

Rpm – rotações por minuto

s. c. – subcutânea

TCA – ácido tricloroacético

TFK – tampão fosfato de potássio

TOTG – teste oral de tolerância a glicose

(ØSe)₂ –disseleneto de difenila

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ESQUEMAS E TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.1.1. Histórico	1
1.1.2. Definição	1
1.1.3. Classificação etiológica e características fisiopatológicas	1
1.1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1	1
1.1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2	2
1.1.4. Diagnóstico do Diabetes mellitus	2
1.1.5. Diabetes mellitus experimental	3
1.1.6. Complicações Diabéticas Crônicas	4
1.1.7. Glicosilação não-enzimática das proteínas.....	4
1.2. A enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ-ALA-D)	9
1.2.1. Definição	9
1.2.2. Estrutura e Funções	12
1.2.3. Mecanismo catalítico.....	13
1.2.4. Toxicológica da enzima δ -ALA-D	14
1.2.5. δ -ALA-D e Diabetes Mellitus	15
1.3. Selênio	16
1.3.1. Histórico	16
1.3.2. Características químicas	17
1.3.3. Atividade antioxidante.....	17
1.3.4. Disseleneto de difenila	18
1.3.5. Diabetes e selênio	18
1.3.5.1. Níveis de selênio no Diabetes.....	18
1.3.5.2. Proteção contra estresse oxidativo.....	19

1.3.5.3. Selênio e a homeostase da glicose.....	19
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. Animais	21
3.2. Material	22
3.2.1. Composto orgânico.....	22
3.2.2. Reagentes.....	22
3.2.3. Equipamentos	23
3.3. Métodos.	24
3.3.1. Experiências <i>in vivo</i>	24
3.3.1.1. Indução de Diabetes Mellitus	24
3.3.1.2. Verificação do estado diabético.....	25
3.3.1.3. Tratamento.....	25
3.3.2. Experiências <i>ex vivo</i>	26
3.3.2.1. Avaliação do perfil glicêmico dos animais de difenila.....	26
3.3.2.2 Avaliação dos níveis de frutossamina sérica dos animais.....	26
3.3.2.3.Avaliação do perfil lipídico dos animais	26
3.3.2.4. Avaliação da função hepática e renal dos animais	26
3.3.2.5. Determinação da atividade da enzima δ ALA-D nos animais.....	27
3.3.2.6. Avaliação do peso corporal	27
3.3.2.7. Determinação de proteínas	27
3.3.3. Análise estatística.	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Dosagens bioquímicas	28
4.1.1. Avaliação do perfil glicêmico dos animais.....	28
4.1.2. Avaliação dos níveis de frutossamina sérica dos animais.....	29
4.1.3. Avaliação da função renal dos animais	30
4.1.4. Avaliação do perfil lipídico dos animais	33
4.1.5. Avaliação da função hepática dos animais	36
4.2. Avaliação da atividade da enzima δ-ALA-D tecidual dos animais	39
4.2.1. Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-D hepática dos animais	39
4.2.2. Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-	

D renal dos animais	40
4.2.3. Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-	
D cerebral dos animais	42
4.2.4. Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-	
D esplênica dos animais	43
4.3. Avaliação do peso corporal dos animais.....	45
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Histórico

Há mais de dois mil anos já havia registros do conhecimento sobre o diabetes mellitus. O papiro Ebers, documento médico egípcio escrito cerca de 1500 AC, faz referência a uma doença caracterizada por emissão freqüente e abundante de urina. Em 30 AC, o médico capotociano Aretaeus, criou o termo Dia-betes”, que significa “passar através”, pelo fato da poliúria ser semelhante à drenagem de água através de um sifão. “Mellitus” origina-se do latim , que significa adoçado como mel, referindo-se a presença de açúcar na urina de pacientes com a doença. Em 1869, Langerhans descobriu as ilhotas celulares do pâncreas responsáveis pela secreção de insulina. E finalmente, em 1921, Banting e Best descobriram e isolaram a insulina, sendo um marco na história do diabetes (Greco & Stabenfeldt, 1999).

1.1.2 Definição

O diabetes mellitus (DM) constitui uma síndrome de etiologia múltipla, que decorre da diminuição de secreção e/ou perda da capacidade da insulina em exercer adequadamente seus efeitos. Essa síndrome caracteriza-se por distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (Gannon, 2002).

1.1.3 Classificação etiológica e características fisiopatológicas

Os dois principais tipos de diabetes mellitus, classificados de acordo com a etiologia dos distúrbios glicêmicos são:

1.1.3.1 Diabetes mellitus tipo 1

O DM tipo 1 que antigamente fora denominado de diabetes mellitus insulino-dependente (IDDM) ou diabetes juvenil compreende aproximadamente 10% da população

diabética, e manifesta-se em crianças, adolescentes e adultos jovens. Quanto à origem etiológica o DM tipo 1 pode ser dividido em diabetes imuno-mediado e diabetes idiopático. No diabetes imuno-mediado há uma forte associação com a região HLA (antígenos leucocitários humanos) no cromossomo 6 e uma relação com destruição auto-imune das células β pancreáticas. Os marcadores dessa destruição auto-imune incluem auto-anticorpos das ilhotas pancreáticas (ICAs), auto-anticorpos para insulina (IAAs), auto-anticorpos para ácido glutâmico decarboxilase (GAD65), e auto-anticorpos para a tirosina fosfatases IA-1 e IA-2. Desta maneira, falta o fornecimento de insulina, havendo a necessidade de reposição da mesma. Os pacientes são magros, com tendência a cetoacidose e com início repentino dos sintomas (Akerbloom et al., 2002; ADA, 2000).

O diabetes idiopático é a forma de diabetes tipo 1 que não têm nenhuma etiologia conhecida. Alguns destes pacientes têm insulinopenia permanente e são propensos a cetoacidose, outros exibem graus variados de deficiência de insulina entre episódios. Esta forma de diabetes tem fatores hereditários, mas não existem evidências de auto-imunidade das células β pancreáticas, além de não haver associação com HLA (ADA, 2000).

1.1.3.2 Diabetes mellitus tipo 2

O DM tipo 2 que antigamente fora denominado 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-Jack, 2002). Manifesta-se geralmente em pacientes com idade superior a 40 anos, e tem elevado componente hereditário. São reconhecidos como fatores etiológicos: a idade, predisposição genética e obesidade (Steppan & Lazar, 2002). Resulta de graus variáveis de resistência à insulina e/ou deficiência relativa de secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Arner et al., 1991; Gerich, 1998; Greenberg & McDaniel, 2002).

1.1.4 Diagnóstico do Diabetes mellitus

O diagnóstico da doença baseia-se na demonstração de hiperglicemia. O protocolo para a investigação laboratorial compreende dosar a glicose plasmática com o paciente em jejum de 8-10 horas.

Para investigação de DM, podem ser realizados os testes de glicemia de jejum e de tolerância oral à glicose (TOTG), com sobrecarga de 75 g de glicose via oral. Pacientes com glicemia de jejum inferior a 100 mg/dl e TOTG inferior a 140 mg/dl, são considerados com glicemia normal. Pacientes com glicemia de jejum superior a 126 mg/dl e TOTG entre 140 e 199 mg/dl, são caracterizados com tolerância diminuída à glicose. Pacientes com glicemia de jejum superior a 126 mg/dl e TOTG superior a 200 mg/dl, são considerados diabéticos (ADA, 2000).

1.1.5 Diabetes mellitus experimental

Agentes diabetogênicos como a estreptozotocina e o aloxano, têm sido extensivamente utilizados em estudos experimentais, eles reproduzem nos animais o quadro de alterações metabólicas e sinais clínicos idênticos aos que ocorrem na enfermidade naturalmente adquirida.

A estreptozotocina é um antibiótico de amplo espectro de ação, produzido a partir de microorganismos *Streptomyces achromogenes*, que atua como agente anti-tumoral. Sua propriedade diabetogênica consiste na completa degeneração das células β das ilhotas pancreáticas (Kaneko et al., 1978).

O aloxano é uma base pirimídica que também causa a destruição das células β das ilhotas pancreáticas. Essa citotoxicidade seletiva do aloxano é condicionada pela grande capacidade das células β em acumular a droga, aliada ao fato dessa célula demonstrar uma grande sensibilidade aos radicais peróxidos, quando comparada a outros tecidos (Malaisse et al., 1982; Matheus & Leiter, 1999; Nielsen et al., 1999).

O aloxano promove encolhimento celular, picnose nuclear e vacuolização do citoplasma. Cerca de 12 horas após a sua aplicação visualiza-se fragmentação e edema das mitocôndrias e conseqüentemente morte das mesmas, resultando na necrose das células β (Penberton & Manax, 1970).

Szkudelski (2001) em seus experimentos observou que o aloxano diminuiu os grupos -SH e aumentou a atividade da glutathione peroxidase em fígados de ratos. Concomitantemente a essas alterações houve um aumento drástico na concentração da insulina sanguínea desses ratos, entretanto não ocorreu uma diminuição da glicemia dos mesmos, o que sugere prejuízo da sensibilidade periférica a insulina. Esses resultados indicam que as ações características do aloxano não são apenas conseqüências de danos nas células β .

1.1.6 Complicações Diabéticas Crônicas

O diabetes 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 & Ter Veer, 2000). Existem várias rotas metabólicas que tentam explicar como a hiperglicemia de longa duração causa as complicações crônicas do diabetes, entre elas, a glicação de proteínas e o estresse oxidativo.

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; Biessels et al., 2002; Dagogo et al., 2002).

1.1.7 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 é iniciado com reações de glicosilação não-enzimática entre a glicose e o grupamento amino de proteínas (Caballero et al., 1998)

A glicose e outros açúcares não redutores reagem com resíduos N-terminais e/ou grupos amino de macromoléculas para formar inicialmente os adutos de “Bases de Schiff” (Figura 1). Em seguida estas aldiminas 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; 1984).

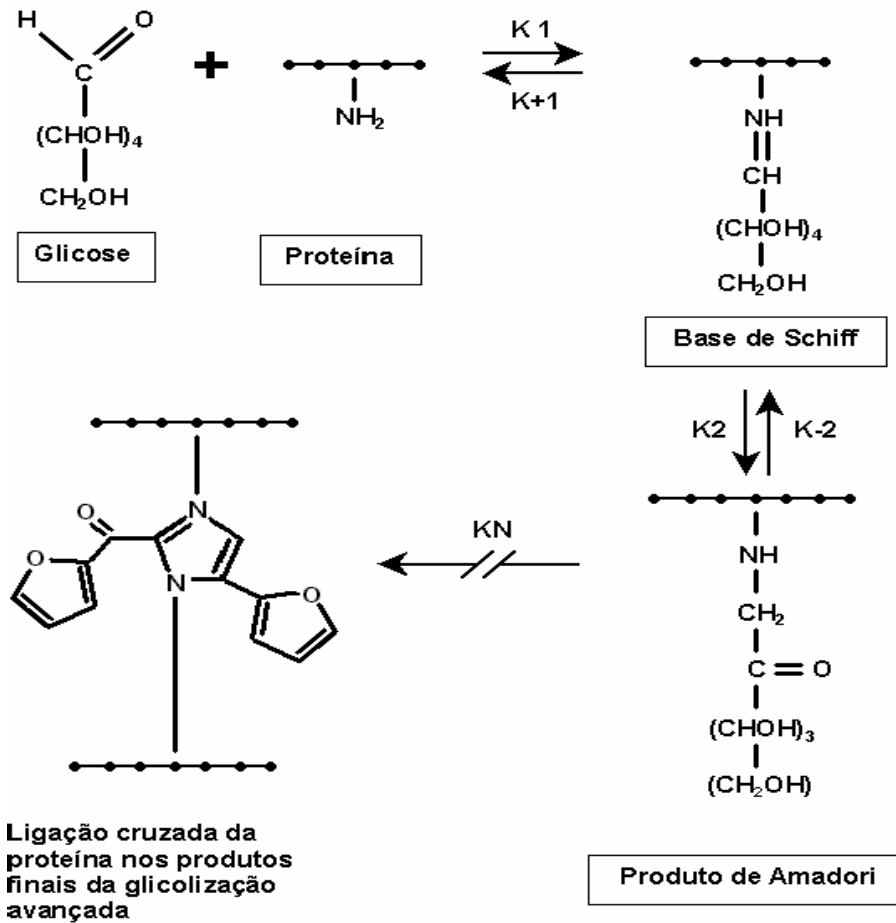


Figura 1. Glicosilação não-enzimática de proteínas.

O produto de glicosilação avançada envolve uma ligação cruzada proteína-proteína. Os produtos da glicosilação iniciais são reversíveis, os produtos terminais mais avançados são irreversíveis (Brownlee et al., 1988).

As cetoaminas (Produtos de Amadori) de cadeia aberta podem reagir com grupamentos amino de outras proteínas e formar ligações cruzadas irreversíveis, por meio de reações químicas, como a condensação, β eliminação ou hidratação e, portanto, alterar a estrutura e a função destes substratos (Bierhaus et al., 1998; Vlassara et al., 1994). Estas reações resultam na formação de produtos irreversíveis, chamados de Produtos Terminais de Glicosilação Avançada (PTGA), ou “Advanced Glycation End Products” (AGE’s) (Mohamed et al., 1999).

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 em outras proteínas estáveis de tecido no diabetes crônico, as suas concentrações não estão correlacionadas 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 este é considerado um parâmetro de exposição dos tecidos a altas concentrações de glicose, ao longo do tempo (Mohamed et al., 1999).

A hemoglobina glicosilada (GHb), que resulta da glicosilação não-enzimática da hemoglobina, é considerada um marcador para a formação de PTGA, sendo, portanto irreversível. A GHb é o produto da reação não-enzimática entre glicose e o grupo amino terminal de um resíduo de valina na cadeia β da hemoglobina. O termo inclui todas as hemoglobinas modificadas com a glicose, incluindo HbA1 e suas frações, bem como as outras hemoglobinas anormais (HbS, HbF, HbC) que, eventualmente, possam estar presentes. (Palmer & Jain, 1997).

A percentagem de GHb depende da concentração de glicose no sangue, do tempo de duração da exposição da hemoglobina à glicose e ao tempo de meia vida dos eritrócitos (aproximadamente 120 dias). Quanto maior a concentração de glicose e maior o período de contato, maior a percentagem da GHb. (Johnson et al, 1998, Turpeinen et al., 1995).

Além da hemoglobina, a glicose pode ligar-se a outras proteínas e globulinas por meio de uma glicosilação não-enzimática. A proteína total, principalmente a albumina, após a ligação com a glicose, se transforma em uma cetamina estável, e é denominada genericamente frutosamina. Por sua meia-vida ser pequena, de cerca de 30 dias, os resultados obtidos indicam a média das glicemias nas 2 últimas semanas (Schartz, 1995; Fu et al., 1992; Smid et al, 1986).

Existe uma correlação positiva significativa entre a formação aumentada de PTGA, e as complicações diabéticas tardias (Monnier et al., 1986; Brownlee et al. 1988).

Evidências indicam que a glicação de proteínas, por si só, poderia induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, e estas, podem 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 em eritrócitos de pacientes diabéticos (Caballero, 1995).

Uma possível ligação entre o estresse oxidativo e a hiperglicemia causam dano celular e conseqüentemente desenvolvimento secundário de complicações diabéticas.(Figura 2).

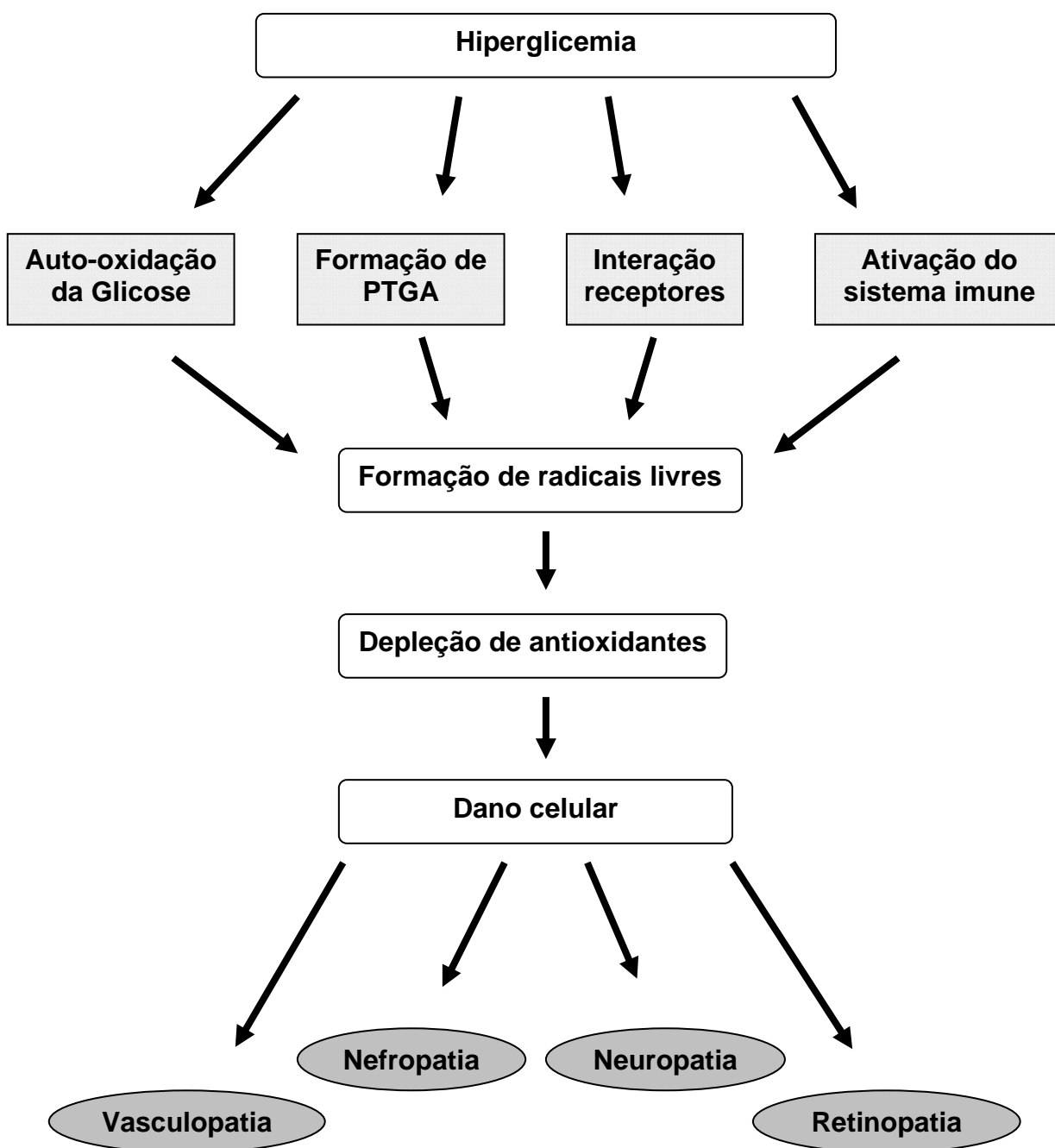


Figura 2. Possível ligação entre estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia e, subsequente desenvolvimento de complicações diabéticas (Figura modificada de Mohamed et al., 1999).

2.1.9 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).

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 (Vlassara, 2001).

A ligação dos PTGA com os “RAGE” resulta na geração intracelular de espécies reativas de oxigênio, (Esposito et al., 1989; 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 subseqüente expressão do gene dependente do fator NF-KB. (Bierhaus et al., 1997). Alguns autores pesquisaram pacientes com diabetes mellitus e demonstraram uma correlação positiva entre a ativação do NF-KB e a qualidade do controle glicêmico, este indicado pela dosagem de hemoglobina glicosilada (Hofmann et al., 1998). Os pacientes com níveis elevados de hemoglobina glicosilada, demonstraram uma elevada atividade de ligação NF-KB, enquanto pacientes com controle glicêmico bom, demonstraram uma baixa ativação do NF-KB.

Desta maneira, quando os pacientes são tratados com antioxidante, há uma supressão significativa na ativação do NF-KB, e também, uma diminuição nos marcadores plasmáticos para peroxidação lipídica. (Hofmann et al. 1998, 1999).

1.2 A enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D)

1.2.1 Definição

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 é uma metaloproteína que catalisa a formação do composto monopirrólico, porfobilinogênio (PBG), através da condensação e ciclização assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ALA), com perda de 2 moléculas de água (Gibson et al., 1955).

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 3) (Castelfranco et al., 1983).

A reação catalisada pela δ -ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes) (Figura 4). 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 xenobióticos (citocromo P₄₅₀) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases) (Timbrell, 1991).

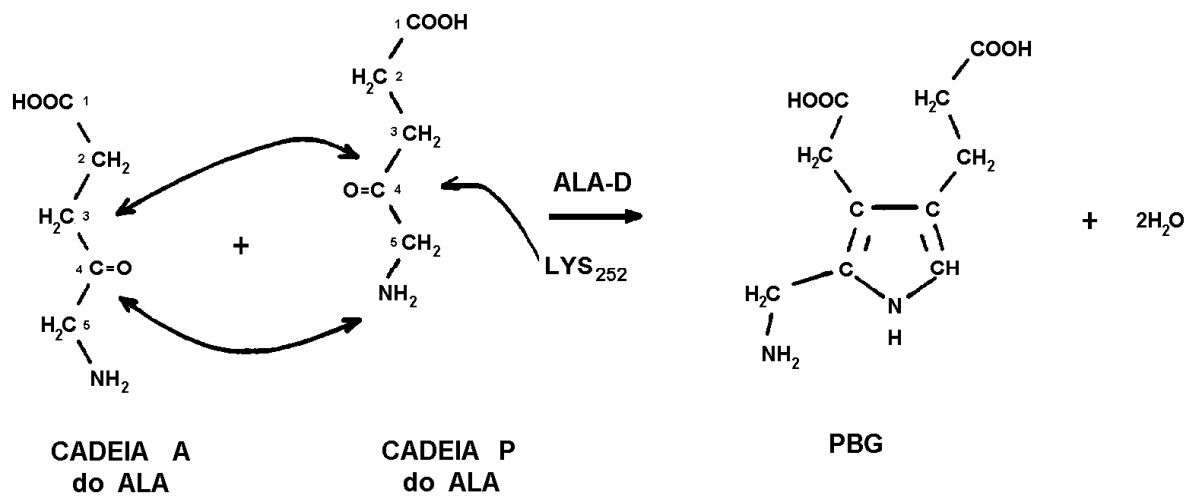
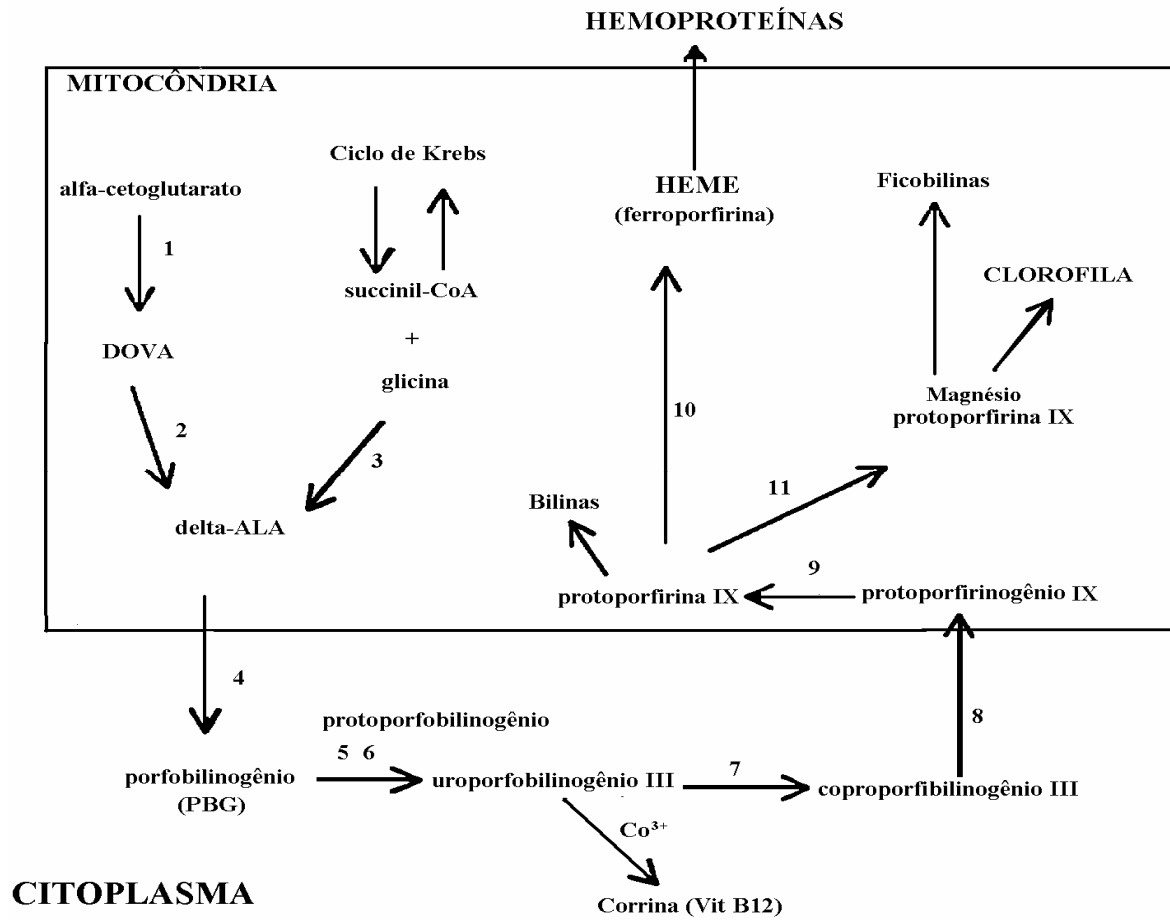


Figura 3. Condensação assimétrica de duas moléculas do ácido 5-aminolevulínico catalisada pela enzima δ -ALA-D. (Castelfranco & Batle, 1983)

- **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.
- **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*).

**Enzimas:**

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

Figura 4. Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos (Castelfranco et al., 1983).

Em mamíferos, os tecidos em que esta enzima apresenta maior atividade são o hepático, o renal e os tecidos hematopoiéticos (Gibson et al., 1955). Também foi demonstrado que a enzima δ -ALA-D é idêntica ao inibidor de proteossoma de 240-kDa (CF-2), fator que estaria relacionado com a degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, oncoproteínas e no processamento de antígenos (Guo et al., 1994).

1.2.2 Estrutura e Funções

Há uma grande semelhança entre as seqüências genéticas da δ -ALA-D isoladas de diversas fontes, como a humana (Wetmur et al., 1986), a bacteriana (Echelard et al., 1988), a animal (Bishop et al., 1989) e a vegetal (Boese et al., 1981), sugerindo que essa enzima possua uma estrutura quaternária e mecanismo catalítico semelhantes em diferentes organismos.

O peso molecular da δ -ALA-D é de 280 KDa, sendo composta por 8 subunidades de 35 KDa (Wu et al., 1974; Fujita et al., 1981), arrançadas em uma estrutura cúbica octamérica com simetria diédrica.

Até o momento, todas as formas da enzima isoladas requerem um íon metálico divalente para atingir a atividade máxima e são na sua maioria inibidas por EDTA (Gibson et al., 1955; Emanuelli et al., 1998), apesar do alto grau de similaridade entre os genes da δ -ALA-D a enzima requer metais diferentes para a sua ativação de acordo com sua fonte.

A δ -ALA-D de animais, leveduras e de algumas bactérias é dependente de zinco (Chen & Neilands, 1973; Finelli et al., 1974), desta maneira acredita-se que resíduos de cisteína da proteína estão envolvidos na união deste metal (Dent et al., 1990; Spencer & Jordan, 1994).

Apesar de possuir similaridade com a enzima de outras fontes a enzima δ -ALA-D proveniente de vegetais não requer zinco e sim magnésio (Shibata & Ochiai, 1977; Tamai et al., 1979). Foi demonstrado que a região rica em cisteínas presente na enzima de origem animal que supostamente liga zinco é substituída na enzima vegetal por uma região rica em aspartato, o qual provavelmente seria o sítio de ligação para o magnésio (Boese et al., 1991; Schaumburg et al., 1991).

Esta enzima, independente de sua fonte, é de natureza sulfidrídica (Shemin et al., 1976; Bevan et al., 1980), portanto é inibida por agentes bloqueadores de grupos tiólicos, tais como

N-etilmaleimida, iodoacetato (Batlle et al., 1967; Jordan et al., 1976; Barnard et al., 1977), paracloromercuriobenzoato, DTNB (Barreiro, 1967; Shibata & Ochiai, 1977) e também por metais pesados que possuem elevada afinidade por grupamentos tiólicos, como o chumbo, cobre e o mercúrio (Gibson et al., 1955; Tamai et al., 1979; Borralho et al., 1990; Rocha et al., 1993, 1995; Emanuelli et al., 1996).

Estudos demonstraram que tanto compostos orgânicos (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001; Bolzan et al., 2002; Farina et al., 2002), como inorgânicos (Barbosa et al., 1998) de selênio e telúrio também podem inibir a enzima δ -ALA-D pela oxidação de seus grupamentos tiólicos.

Para apresentar atividade catalítica máxima a referida enzima requer a presença de agentes redutores sulfidrílicos, como o DTT, cisteína, glutathiona reduzida (GSH) e β -mercaptoetanol (Anderson et al., 1979; Barnard et al., 1977). Também está descrito que essa atividade enzimática é perdida rapidamente com a inativação da enzima por oxidação de grupos -SH ou pela remoção do Zn (Bevan et al., 1980).

1.2.3 Mecanismo catalítico

Algumas evidências sugerem que o sítio ativo da enzima seja composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e alguns resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Tsukamoto et al., 1979; Jaffe et al., 1994).

Basicamente, o mecanismo proposto para a síntese do porfobilinogênio é o de que um resíduo lisil do sítio ativo da δ -ALA-D forma uma base de Schiff com a primeira molécula do substrato (ALA), originando a cadeia lateral P (propiónica), enquanto uma segunda molécula do substrato dá origem à cadeia lateral A (acética) do PBG (Castelfranco et al., 1983).

A união dessa primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamentos sulfidrílicos reduzidos (Jaffe & Hanes, 1986). No entanto, para a união da segunda molécula de ALA, a qual originará a cadeia acética, são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (Jaffe et al., 1990).

Alguns estudos têm demonstrado que além do resíduo de lisina que está envolvido na formação da Base de Schiff da primeira molécula de ALA que se liga a enzima (Gibbs & Jordan, 1986), existem outros resíduos que têm papel fundamental na catálise enzimática, entre eles:

- Um resíduo de histidina, o qual pode sofrer fotooxidação, reduzindo tanto a atividade enzimática quanto a ligação ao zinco (Tsukamoto et al., 1979).
- Pelo menos dois resíduos de cisteína, os quais devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (Chen & Neilands, 1976). A oxidação desses resíduos leva à inativação com concomitante perda do zinco ligado (Tsukamoto et al., 1979).

1.2.4 Toxicológica da enzima δ -ALA-D

Como já citado essa enzima pode ser inibida por metais pesados, tais como chumbo (Rodrigues et al., 1989) e mercúrio (Emanuelli et al., 1996) e também por compostos orgânicos contendo telúrio e selênio (Barbosa et al., 1998; Maciel et al., 2000; Farina et al., 2001; Bolzan et al., 2002; Farina et al., 2002).

A inibição e o índice de reativação por DTT da atividade da δ -ALA-D de eritrócitos são indicadores sensíveis do envenenamento por chumbo, devido a isso a inibição dessa enzima pode ser um indicador de toxicidade a outros compostos.

No entanto, a deficiência da atividade da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em um acúmulo do substrato (ALA) no fígado e no sangue, com conseqüente aumento de sua excreção urinária.

Numerosas observações clínicas têm associado o acúmulo do ALA com a patogênese das porfirias agudas (Kappas et al., 1995). As porfirias podem resultar de uma desordem autossômica recessiva, ou podem ser adquiridas como ocorrem em casos de intoxicação por chumbo (Granick, 1978).

A inibição da δ -ALA-D parece estar relacionada também, com a tirosinemia hereditária (Rank et al., 1991), onde a succinil acetona (análogo estrutural do ALA), se acumula devido a uma deficiência genética da via de degradação da tirosina, inibindo competitivamente a δ -ALA-D (Sassa & Kappas, 1983).

A nível de neurotransmissão gabaérgica, 1 μ M de ALA é capaz de inibir a liberação do neurotransmissor GABA, assim como a sua união as membranas sinápticas (Brennan et al., 1979; 1980) tanto em ratos quanto em humanos (Emanuelli et al., 2001). O acúmulo do ALA também está relacionado com a superprodução de espécies reativas de oxigênio (Bechara et al., 1993).

Estudos realizados por Emanuelli et al. (2000) demonstraram que a administração intraestriatal de ALA induz convulsões e assimetria corporal.

1.2.5 δ -ALA-D e Diabetes Mellitus

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. (Bitar & Weiner, 1984; Striffler et al., 1998; Scassa et al., 1998).

Estudos relatam que 25% dos pacientes com porfirias têm 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. Estas 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).

Outras pesquisas demonstram que algumas enzimas da rota biossintética do heme, tais como a δ -ALA-D, a porfobilinogênio desaminase, e a uroporfobilinogênio descarboxilase, estão inibidas “in vitro” por altas concentrações de glicose, tanto em preparados de eritrócitos (Polo et al., 1993), como em eritrócitos de pacientes diabéticos (Caballero et al., 1995; Fernandes-Cuartero et al., 1999), e em animais com diabetes experimental induzida por estreptozotocina (Polo et al., 1995).

Em experimentos com ratos diabéticos, pesquisas demonstraram que há uma inversa correlação 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). O mesmo acontece em pacientes diabéticos, onde o dano na atividade da δ -ALA-D de eritrócitos é paralelo ao aumento da hemoglobina glicosilada, provavelmente como resultado da glicosilação desta enzima. (Ratnaik et al., 1987; Polo et al., 1993). Em suas pesquisas Folmer et al., 2002 observou que, no tecido renal, hepático e cerebral, houve uma correlação negativa entre a atividade da δ -ALA-D e a porcentagem de HbA_{1c}, e da mesma forma entre a atividade da δ -ALA-D e os níveis de TBARS.

O mecanismo proposto para a inibição da atividade da δ -ALA-D seria a glicação não enzimática de proteínas e o estresse oxidativo (Folmer et al., 2002). A auto-oxidação da glicose que ocorre no estado de hiperglicemia gera radicais livres (Wolf et al., 1987, Hunt et al. 1988), os quais contribuem para a lipoperoxidação celular, logo a inibição enzimática acontece indiretamente (Browlee et al, 1981 e 1981). Outro mecanismo proposto para

explicar a referida inibição seria a glicação do resíduo de lisina, o qual compõe o sítio ativo da enzima (Jaffe & Marckham, 1987).

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

1.3 Selênio

1.3.1 Histórico

Uma das primeiras evidências da intoxicação por plantas seleníferas foi relatada por Marco Pólo na região de Succuir, no oeste da China no séc XIII (1271-1295), ele constatou que animais apresentavam perda de cascos e pêlos após a ingestão destas plantas venenosas.

No séc XIX, semelhantes sintomas foram relatados em animais que se alimentavam da vegetação próxima ao Rio Missouri, entre Dakota e Nebraska. Em 1928, quando Dr. Kurt Franke estudou estas plantas e seus grãos, identificou que o agente etiológico dos referidos efeitos tóxicos era o selênio (Franke, 1934). Este elemento químico já havia sido descoberto pelo químico sueco J. J. Berzelius, em 1817.

Mais tarde, em 1933, relacionou-se a toxicidade do selênio com a doença denominada “alkali disease” observada em animais que se alimentavam em pastagens crescidas em solos que continham níveis elevados de selênio, nos EUA (Spallholz, 1993). Estes animais apresentavam emagrecimento, perda de pelos e anemia (Franke, 1934). Em contrapartida, o selênio é um elemento traço, essencial para a dieta alimentar, o que foi demonstrado experimentalmente em 1957 (Schwartz & Foltz, 1957).

Na década de 70, um grupo de pesquisadores chineses descreveu a relação entre áreas geográficas com baixas concentrações de selênio (Keshan, China) e uma patologia chamada “Keshan”, descrita como uma cardiomiopatia endêmica (Keshan Disease Research Group, 1979), que pode ser abolida pela suplementação com selênio.

Nos últimos anos, têm sido descritos que baixos níveis de selênio podem levar à predisposição para o desenvolvimento de algumas doenças, tais como câncer, esclerose cardiovascular, cirrose e diabetes (Navarro-Alarcón & López-Martinez, 2000).

1.3.2 Características químicas

O selênio é um elemento do grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}).

A similaridade nas propriedades físicas e químicas (eletronegatividade, potencial de ionização, raio atômico e iônico) do enxofre e do selênio tem estimulado a síntese e o estudo, com fins comparativos, de uma grande variedade de selenomoléculas derivadas de compostos que contenham enxofre (Parnham & Graf, 1991); entretanto, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre selênio e enxofre constituem as bases de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980). Os selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de selênio (Klayman & Günther, 1973).

1.3.3 Atividade antioxidante

O selênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a de maior relevância como antioxidante (Nogueira et al., 2003).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas normalmente durante o metabolismo celular. Os radicais livres possuem uma grande reatividade e podem levar à lipoperoxidação, oxidação de carboidratos, proteínas e DNA (ácido desoxiribonucléico) (Praticò & Delanty, 2000).

As EROs podem ser tóxicas e determinantes do tempo de vida celular. Atualmente está demonstrado que os metabólitos das espécies reativas de oxigênio estão associados com muitos processos degenerativos (Melov et al., 1998). Essas alterações no *status* oxidativo do organismo podem estar implicadas em diversas desordens, tais como o câncer, catarata, isquemia, Diabetes mellitus, envelhecimento e processos de lesão gástrica induzidas experimentalmente (Cohen, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1990; Floyd, 1990).

Com a descoberta do papel essencial o selênio no centro ativo de diversas enzimas e com o aumento do entendimento do papel fisiológico do mesmo na regulação do dano oxidativo (Cadenas & Sies, 1985; Ursini & Bindoli, 1987), aumentou o interesse na síntese de compostos orgânicos contendo selênio que possuam propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnhan & Graf, 1991).

1.3.4 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila é um composto orgânico de selênio que em estudos recentes apresentou atividades antiinflamatórias e antinociceptivas em ratos e camundongos (Nogueira et al., 2003).

O referido composto apresenta atividade tiol peroxidase superior, quando comparado ao Ebselen, outro composto orgânico de selênio (Meotti et al, 2003). Além dessa atividade o disseleneto demonstrou efeitos neuroprotetores, onde fatias de hipocampo de rato foram submetidas à privação de oxigênio e glicose. (Ghisleni et al, 2003).

Desta maneira, sob o ponto de vista farmacêutico torna-se interessante investigar compostos farmacologicamente ativos, com estrutura química simples, e com facilidade de serem sintetizados. De fato, o disseleneto de difenila possui uma estrutura química relativamente simples de ser sintetizada, o que representaria uma vantagem econômica.

1.3.5 Diabetes e selênio

1.3.5.1 Níveis de selênio no diabetes

Não há um consenso quanto aos níveis de selênio em pacientes com diabetes mellitus. Há estudos que mostram uma diminuição na quantificação deste elemento traço (Schlienger et al.,1988;, Twardowska-Sauchá et al.,1994; Holecek et al.,1995; Ruiz et al.,1998; Kljal et al.,2001) enquanto outros relatos demonstram um aumento (Cser et. al.,1993; Wang et al.,1995) e finalmente há os autores que apresentam em seus experimentos nenhuma diferença significativa (Lebedeva et al.,1991; Yadav et al., 1991) na concentração plasmática ou sérica de selênio comparado aos pacientes controles. Relata-se também uma correlação negativa entre os conteúdos plasmáticos de Selênio e HbA1c em pacientes com a referida patologia. (Ruiz et al.,1998).

Na urina, foi encontrada uma associação positiva entre HbA1c e excreção urinária de selênio, indicando que a concentração de selênio urinário é inversamente proporcional ao grau de controle do diabetes (Yazigi et al.,1996). Ao mesmo tempo tem sido relatada uma associação inversa entre administração de insulina e selênio urinário em diabéticos tipo 2 que receberam insulina como parte de seus tratamentos. Desta maneira esses pacientes que

recebiam insulina excretaram menos selênio do que os pacientes que não faziam tratamento com a mesma (Dohi et al., 1988).

1.3.5.2 Proteção contra estresse oxidativo

Como já visto anteriormente, o estresse oxidativo é o centro do processo patogênico das complicações diabéticas (Kennedy et al., 1997). Muitos estudos relatam o desequilíbrio entre o estresse oxidativo e a diminuição das defesas antioxidantes no diabetes mellitus (Maxwell et al., 1997; Nourooz et al., 1997). Assim torna-se interessante o uso de um agente antioxidante, como o selênio, pois este desempenha importante papel fisiológico na estrutura de muitas enzimas envolvidas na decomposição de peróxidos, incluindo glutathione peroxidase e fosfolipídio hidropoxidase glutathione peroxidase, as quais contêm selênio na forma de seleniocisteína (Ursini et al., 1982 e 1987; Neve et al., 1989). Além disso, o selênio também apresenta propriedades antioxidantes em moléculas sintéticas, tais como disseleneto de difenila (Meotti et al., 2004) e ebselen (Rossato et al., 2002; Tiano et al., 2000).

Muitas pesquisas apresentam esse papel de proteção do selênio contra o estresse oxidativo característico do diabetes. Em sua maioria os trabalhos apresentam decréscimos nos níveis de peroxidação lipídica (medido em m/mol de malondialdeído) e nos níveis de GSH (glutathione) no fígado e sangue (Mukherjee et al., 1998; Naziro et al., 2001; Naziroglu & Cay, 2001), testículos (Naziroglu, 2003) e rins (Douillet et al., 1999) de animais tratados com selênio até níveis próximos ao controle. Além disso, outros estudos apresentam o papel protetor do selênio nas alterações estruturais no tecido cardíaco (Ayas et al., 2002), no músculo destrutor (Gur et al., 2003) e no tecido vascular (Douillet et al., 1996; Ersoz et al., 2003).

1.3.5.3 Selênio e a homeostase da glicose

A insulina e agentes que podem imitar sua ação (insulino-miméticos) são necessários para promover a entrada de glicose nos tecidos, onde a mesma poderá ser convertida em energia ou ser armazenada para uso posterior. Tem sido relatado que o selênio pode mediar várias ações semelhantes às da insulina-tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estas ações de mimetizar a ação da insulina incluem tanto a estimulação da captação de glicose quanto à regulação de processos metabólicos (Stapleton, 2000).

A adição de selenato de sódio a adipócitos isolados de rato, estimulou o transporte de glicose, causado pela translocação dos transportadores de glicose GLUT 1 e GLUT 2 localizados na superfície da membrana citoplasmática (Ezaki, 1990). Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, o selenato de sódio mostrou melhorar a homeostase da glicose quando administrado oralmente (McNeill et al., 1991) e intraperitonealmente (Becker et al., 1996; Battell et al., 1998) e o mesmo efeito foi visto em camundongos diabéticos (Ghosh et al., 1994).

Assim, a administração de selenato de sódio reduziu os níveis de glicose sanguínea, a glicosúria, e melhorou as respostas ao teste oral e intravenoso de tolerância a glicose (Becker et al., 1996). Do mesmo modo, a administração de selenito de sódio diminuiu o glicogênio hepático, aumentou a atividade da enzima glicose-6-fosfatase, diminuiu a atividade da proteína quinase, e os níveis de insulina plasmática para valores próximos do controle e ainda não afetaram as referidas medidas nos ratos do grupo controle (Ghosh et al., 1994).

Esses efeitos do selênio poderiam ser explicados por um aumento na atividade de enzimas da via glicolítica como a glicoquinase e a piruvato quinase e por uma diminuição na atividade de enzimas da via gliconeogênica como a fosfoenolpiruvato carboxiquinase em fígado de ratos (Becker et al., 1996).

Concomitantemente a isso é descrito o efeito do selênio em estimular o sinal da cascata de insulina em adipócitos e hepatócitos de rato. Verifica-se um aumento na fosforilação de um resíduo tirosil da subunidade beta do receptor de insulina e do IRS-1 (substrato receptor de insulina 1). Isso poderia produzir uma ativação prolongada das MAPkinases p42 e p44, como também da proteína quinase ribossomal S6. Porém, esses acontecimentos também podem afetar a fosforilação global da célula (Stapleton et al., 1997; Hey et al., 1998). Desta maneira, o selênio participa na homeostase da glicose modificando a fosforilação das proteínas da cascata da insulina, que modifica as atividades das enzimas e o transporte de glicose.

Mais recentemente, em um estudo conduzido por Heart & Sung, 2003 verificou-se que o selênio na forma de selenito de sódio estimulou o transporte de glicose e a antilipólise em adipócitos 3T3-L1. O composto estimula as duas maiores funções metabólicas reguladas pela insulina de maneira PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) dependente, mas independente da ativação do receptor de insulina. Além disso, esta forma de selênio estimula caminhos sinalizados pela insulina com cinética diferente da mesma. Em resumo, o selenito de sódio atuou tanto como um mimético da insulina como também de maneira não mimética da mesma.

2. OBJETIVOS

Considerando os aspectos acima, o presente trabalho teve como objetivos específicos:

- ↪ Analisar o efeito do pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila na atividade da enzima δ -ALA-D de cérebro, fígado, rim e baço de ratos com diabetes mellitus tipo 1, induzidos com aloxano.

- ↪ Avaliar o efeito do pré e pós-tratamento com referido composto no perfil glicêmico desses animais, através da determinação da glicemia e frutossamina sérica.

- ↪ Avaliar o efeito do pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila no peso corporal dos mesmos animais.

- ↪ Verificar a influência do pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila sobre atividade das transaminases glutâmico-pirúvica e glutâmico-oxalacética plasmáticas dos referidos animais.

- ↪ Investigar a influência do pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila nos níveis de uréia, creatinina, colesterol e triglicerídeos dos animais mencionados.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos, adultos pesando entre 200-300g, albinos (da raça Wistar), provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Os animais foram mantidos em um habitat com temperatura controlada (22 °C), iluminação natural, alimentação e água *ad libitum*, em uma sala do prédio do Departamento de Química da UFSM. Os animais foram manuseados de acordo com o que preconiza o Comitê da Escola de Medicina Veterinária e Ciências Animais da Universidade de São Paulo.

3.2. Material

3.2.1. Composto orgânico

O composto estudado, disseleneto de difenila (PM: 323,92), foi sintetizado segundo literatura especializada na área (Paulmier, 1986); em nosso laboratório. A solução de disseleneto de difenila utilizada nos ensaios foi diluída em 25% de Tween 80.

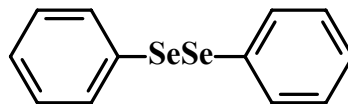


Figura 5: Estrutura do disseleneto de difenila

3.2.2. Reagentes

- ✓ Ácido acético
- ✓ Aloxano
- ✓ Ácido δ - aminolevulínico
- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Ácido perclórico
- ✓ Ácido tricloroacético
- ✓ Anticoagulante heparina

- ✓ Tris/HCl
- ✓ Ácido clorídrico
- ✓ Albumina bovina
- ✓ Álcool etílico
- ✓ Anticoagulante heparina
- ✓ Cloreto de cálcio
- ✓ Cloreto de sódio
- ✓ Éter etílico
- ✓ Fosfato de potássio dibásico
- ✓ Fosfato de potássio monobásico
- ✓ Hidróxido de sódio
- ✓ Kits para medir atividade plasmática das aminotransferases (AST e ALT)
- ✓ Kit para dosar creatinina plasmática
- ✓ Kit para dosar frutossamina sérica
- ✓ Kit para dosar uréia plasmática
- ✓ Tweem 80

3.2.3. Equipamentos

- ✓ Agitador de tubos
- ✓ Agitador magnético
- ✓ Balança – para animais
- ✓ Balança analítica
- ✓ Banho-maria 37°C
- ✓ Cronômetros
- ✓ Destilador de água
- ✓ Espectrofotômetro
- ✓ Eppendorfs
- ✓ Estufa
- ✓ Freezer -20 °C
- ✓ Fitas reagentes para determinar a glicemia
- ✓ Geladeira 4 °C
- ✓ Guilhotina

- ✓ Glicosímetro
- ✓ Homogeneizador de tecidos tipo “potter”
- ✓ Máquina para produção de gelo em escamas
- ✓ Material cirúrgico (tesoura, bisturi, pinças, espátula)
- ✓ pH metro
- ✓ Pipetas automáticas (5 -1000 μ L)
- ✓ Seringas (1 e 5 mL)
- ✓ Tubos capilares
- ✓ Vidraria (béqueres, tubos, provetas, pipetas, balões volumétricos, bastão de vidro)

3.3 Métodos

3.3.1 Experiências *in vivo*

Os animais foram randomicamente divididos nos seguintes grupos:

- ⇒ **Grupo 1)** Controles
- ⇒ **Grupo 2)** Diabéticos
- ⇒ **Grupo 3)** Selênio pré-tratados
- ⇒ **Grupo 4)** Selênio pré-tratados + diabetes
- ⇒ **Grupo 5)** Selênio pós-tratados
- ⇒ **Grupo 6)** Selênio pós-tratados+diabetes

3.3.1.1 Indução de Diabetes Mellitus

Nos Grupos 2, 4 e 6, o diabetes experimental foi induzido pela administração de uma solução de aloxano 2%, diluído em tampão citrato pH 4,5 (Aloxan-Sigma – St. Louis – USA), injetada por via endovenosa, na dose única de 45 mg/kg de peso corporal, utilizando uma das veias penianas do animal. Desta maneira, o mesmo foi anestesiado com éter etílico, imobilizado, tendo sua veia peniana exposta para proceder-se à inoculação da droga, utilizando-se agulhas de calibre 13 x 4,5 mm. Anterior a injeção de aloxano, os animais permaneceram em jejum de 24 horas e posteriormente a injeção do referido composto receberam durante 24 horas uma solução de água com glicose (9%). Nos animais em que não foi induzido o diabetes, grupo 1, 3 e 5, administrou-se somente a salina 0,9% (Esquema 1).

3.3.1.2 Verificação do estado diabético

Para verificar o estado diabético dos animais os níveis plasmáticos de glicose foram monitorados 48 hs após a injeção de aloxano. Após um jejum de 12 horas, a coleta de sangue foi realizada pela introdução de um tubo capilar no plexo retro-orbitário do olho do animal. Logo após, a amostra de sangue (10 μ L) foi introduzida no aparelho glicosímetro GLUCOTREND que emitiu a glicemia instantaneamente. Os animais com glicemia de jejum superior a 250 mg/dL foram considerados diabéticos.

3.3.1.3 Tratamento

O tratamento foi constituído pela administração de 1 dose única diária (via subcutânea) por 6 dias consecutivos de disseleneto de difenila na dose de 10 mg/kg ou 30,9 μ mol/kg de peso corporal (Meotti et al, 2003) nos grupos 3, 4, 5 e 6. Os grupos, controle (grupo 1) e diabético (grupo 2) receberam somente o veículo (25% Tween 80), 1mL/(kg de peso corporal) pela mesma via de administração.

Pré-tratamento																				
Se	Se	Se	Se	Se	Se	A								+						+
01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Dias							→													

Pós-tratamento																				
						A	Se	Se	Se	Se	Se	Se	+							+
01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Dias							→													

Esquema 1- Pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila e indução de diabetes mellitus com aloxano.

A- injeção de aloxano; Se - injeção de disseleneto de difenila; + - sacrifício dos animais

3.3.2 Experiências *ex vivo*

3.3.2.1 Avaliação do perfil glicêmico dos animais

Após um jejum de 12 horas as amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção cardíaca e logo após, uma amostra de sangue total (10 μ L) de cada animal foi introduzida no aparelho glicosímetro GLUCOTREND que emitiu a glicemia instantaneamente.

3.3.2.2 Avaliação dos níveis de frutossamina sérica dos animais

As amostras de sangue para a determinação da concentração de frutossamina foram centrifugadas à 4000g por 12 min para obtenção de soro. A quantificação de frutossamina foi realizada por métodos colorimétricos, utilizando “kits” comerciais LABTEST DIAGNÓSTICA S. A.

3.3.2.3 Avaliação do perfil lipídico dos animais

Os animais foram deixados em jejum de 12 horas, anestesiados com éter etílico para coleta de sangue e em seguida foram sacrificados, um grupo aos sete dias, e outro, aos 14 dias após indução de diabetes (Esquema 1). As amostras de sangue dos animais foram coletadas por punção cardíaca e acondicionadas em tubos heparinizados. Em seguida as mesmas foram centrifugadas à 4000g por 10 min para obtenção de plasma. A concentração de triglicerídeos e colesterol plasmáticos foram quantificados por métodos colorimétricos, utilizando “kits” comerciais LABTEST DIAGNÓSTICA S. A.

3.3.2.4 Avaliação da função hepática e renal dos animais

Como parâmetro para avaliar a influência deste composto sobre a atividade hepática dos animais, mediu-se a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). E como indicador da função renal dosou-se uréia e creatinina em plasma heparinizado dos referidos ratos.

Os animais foram deixados em jejum de 12 horas, anestesiados com éter etílico para coleta de sangue e em seguida foram sacrificados, um grupo aos sete dias, e outro, aos 14 dias após indução de diabetes (Esquema 1). O sangue obtido foi separado por centrifugação 2.000 rpm durante 20 minutos para obtenção do plasma sangüíneo. A atividade das enzimas e a

concentração de uréia e creatinina plasmática foram quantificadas por métodos colorimétricos, utilizando “kits” comerciais LABTEST DIAGNÓSTICA S. A.

3.3.2.5 Determinação da atividade da enzima δ ALA-D nos animais

Os animais foram anestesiados e sacrificados 1 e 2 semanas após a indução de diabetes por aloxano (Esquema 1). Amostras de fígado, rim, cérebro e baço foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas durante 10 min à 4000 g. O sobrenadante obtido foi usado para a dosagem da atividade da enzima δ -ALA-D , a qual foi expressa através da concentração de porfobilinogênio formado, como descrito por Sassa (1982).

3.3.2.6 Avaliação do peso corporal dos animais

Os animais foram pesados nos dia 1, 7, 14 e 21 do período experimental.

3.3.2.7 Determinação de proteínas

O conteúdo protéico das amostras foi medido de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.3.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste Duncan. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Dosagens Bioquímicas

4.1.1 Avaliação do perfil glicêmico dos animais

Foram observados valores significativamente mais altos nos níveis de glicose sanguínea no grupo de diabéticos em comparação ao controle. Porém, os animais diabéticos tratados com disseleneto de difenila antes e depois da administração de aloxano mostraram uma diminuição significativa ($p \leq 0.05$) nos níveis de glicose (tabela I) quando comparados a ratos diabéticos não tratados. Os animais que receberam apenas o composto de selênio tiveram valores de glicemia comparáveis aos do grupo controle (tabela I).

TABELA I - Efeito do pré-tratamento com disseleneto de difenila nos níveis de glicose (mg/dL) em ratos diabéticos induzidos por aloxano .

Grupos	Níveis de Glicose (mg/dL)	
	Uma semana	Duas semanas
Controle	119 ± 0.43	118 ± 0.43
Diabetes	481 ± 0.37*	460 ± 0.5*
Selênio pré-tratado	128 ± 0.18	129 ± 0.78
Se+D pré-tratado	383 ± 0.61* ^a	345 ± 1.17* ^a
Selênio pós-tratado	141 ± 0.56	142 ± 0.52
Se+D pós-tratado	317 ± 0.75* ^a	365 ± 2.6* ^a

Os animais receberam o veículo s.c (grupo controle) ou disseleneto de difenila (10 mg/kg) antes ou depois da indução de diabetes. Dados são expressos como média ± EP (n: 6-12). * $P < 0.05$, comparado ao grupo controle; ^a $P < 0.05$, comparado ao grupo diabetes.

4.1.2 Avaliação dos níveis de frutossamina sérica dos animais

Os animais do grupo diabético tiveram um aumento de 100 % nos níveis de frutossamina em relação ao grupo controle. Entretanto, os animais diabéticos tratados com disseleneto de difenila antes e depois da administração de aloxano mostraram uma diminuição significativa nos níveis de frutossamina sérica quando comparados a ratos diabéticos não tratados (fig 6A, 6B, 7A e 7B). Essa diminuição dos níveis de frutossamina sérica foram de 48% para os animais pré-tratados (fig 6A) e de 62% para os animais pós-tratados (fig 6B) e sacrificados 7 dias após a indução. Para os animais sacrificados 14 dias depois da indução, o efeito foi semelhante, houve um decréscimo de 54% nos níveis de frutossamina para os animais pré-tratados (fig 7A) e uma diminuição de 52% nesses níveis para os animais pós-tratados (fig 7B).

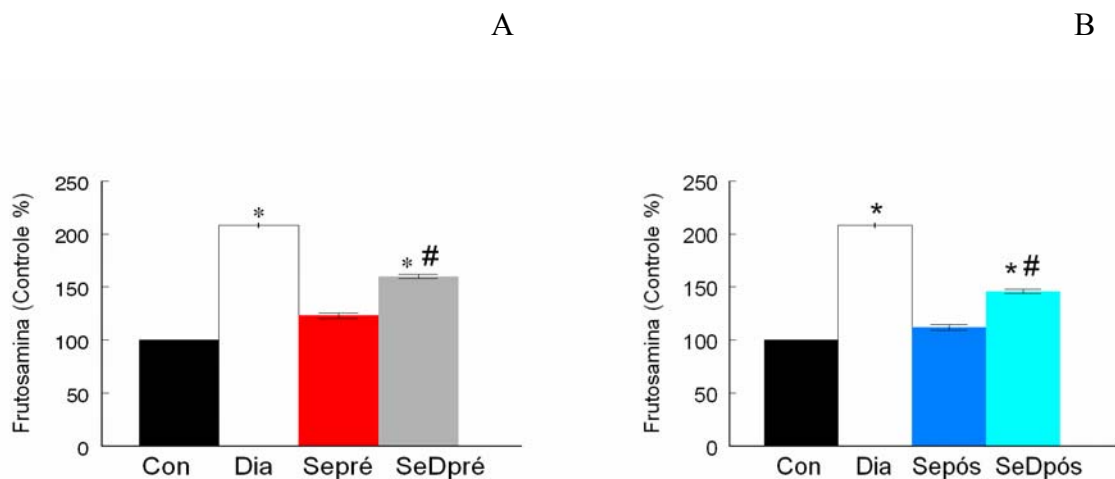


Figura 6: Níveis de frutossamina sérica dos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados + diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados + diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no soro. Valor do grupo controle (mmol/L): $1,34 \pm 0,56$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 4-6). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan). # significativamente diferente do grupo diabético, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan).

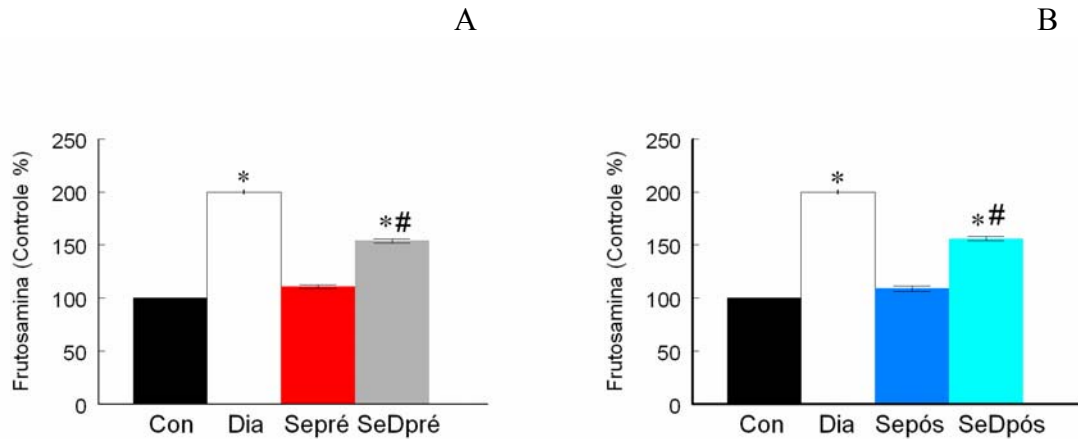
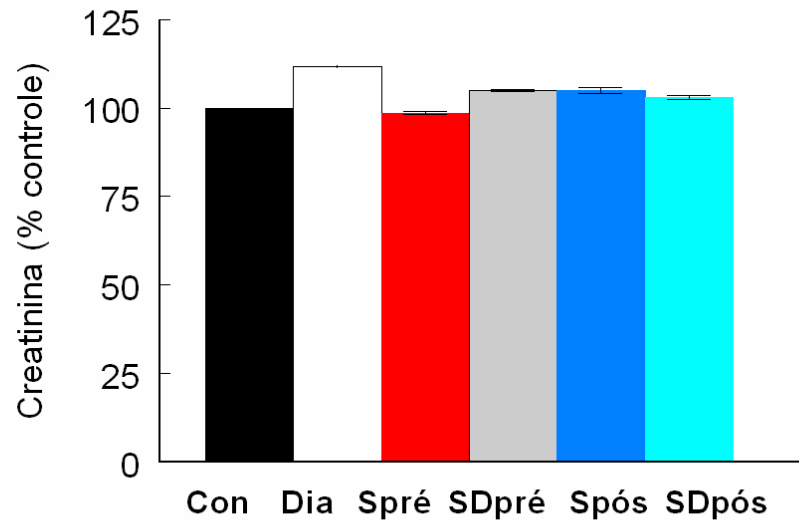


Figura 7: Níveis de frutosamina sérica dos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados + diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados + diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no soro. Valor do controle (mmol/L): $1,34 \pm 0,56$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 4-6). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan). # significativamente diferente do grupo diabético, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan).

4.1.3 Avaliação da função renal dos animais

Não houve diferença significativa nos níveis de creatinina plasmática entre os animais sacrificados 7 (fig 8A) e 14 dias (fig 8B) após a indução de diabetes, obtida pela administração de dose única de 45 mg/kg de aloxano. Assim como, também foi encontrado níveis semelhantes de uréia plasmática entre os grupos de animais sacrificados 7 (fig 9A) e 14 dias após a indução de diabetes (fig 9B).

A



B

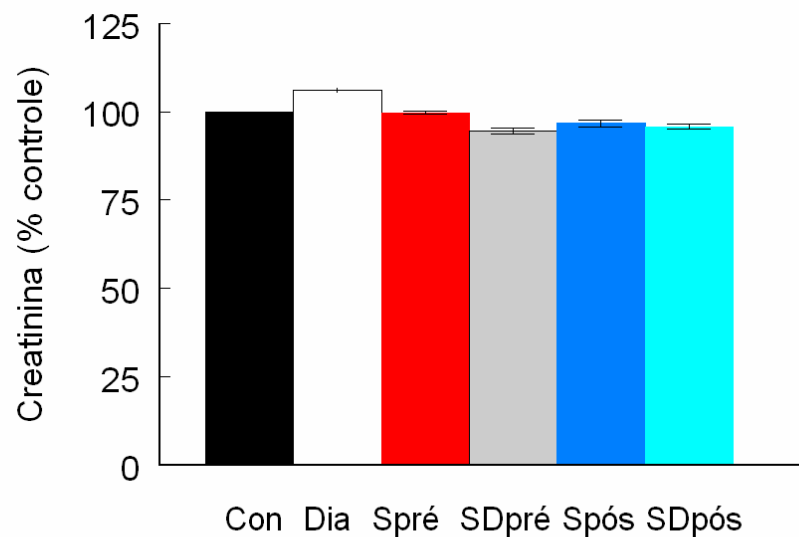
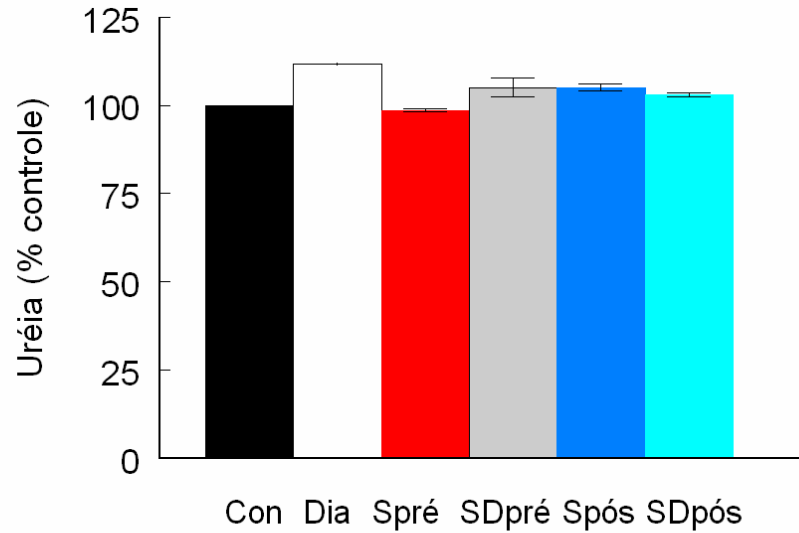


Figura 8: Dosagem de creatinina plasmática nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias (B) após a indução de diabetes Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Spré) Selênio pré-tratados, SDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Spós) Selênio pós-tratados, SDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (mg/dL): $0,82 \pm 0,45$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7).

A



B

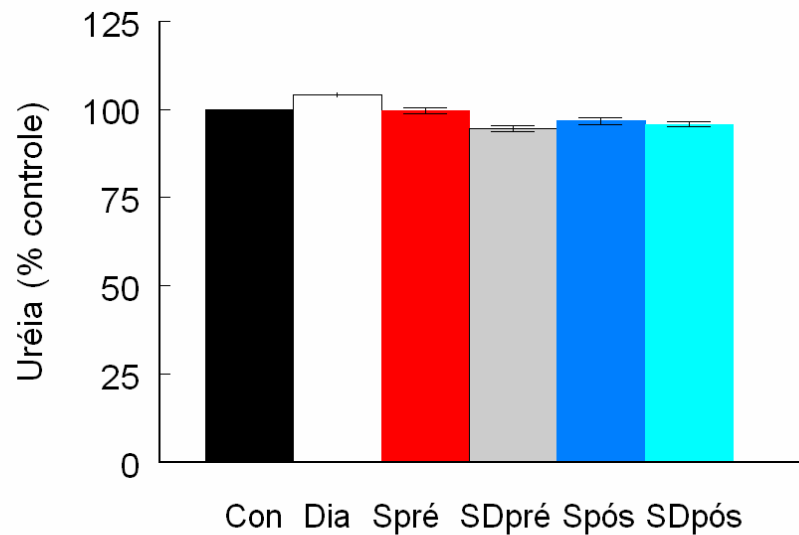
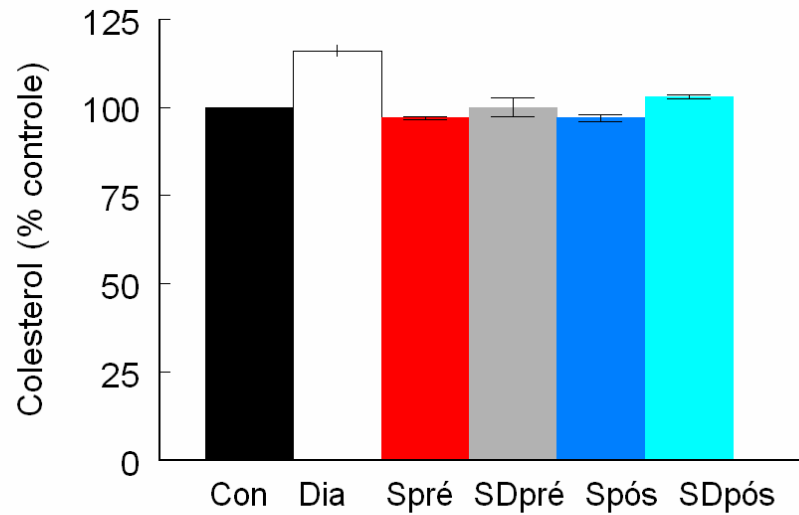


Figura 9: Dosagem de uréia plasmática nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias (B) após a indução de diabetes Os ratos foram tratados com $(\emptyset\text{Se})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Spré) Selênio pré-tratados, SDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Spós) Selênio pós-tratados, SDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (mg/dL) $38,6 \pm 0,45$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7).

4.1.4 Avaliação do perfil lipídico dos animais

As concentrações plasmáticas de colesterol dos animais tratados, diabéticos e diabéticos tratados não apresentaram alterações significativas quando comparadas ao grupo controle e também quando comparadas entre si. Este efeito foi visualizado tanto nos animais sacrificados 7 (fig 10A) e 14 dias (fig 10B) após a indução da referida patologia. Efeito similar foi visto na determinação dos níveis de triglicerídeos, não houve diferença significativa dentre todos os grupos, nos animais sacrificados 7 (fig 11A) e 14 dias (fig 11B) após a indução de diabetes.

A



B

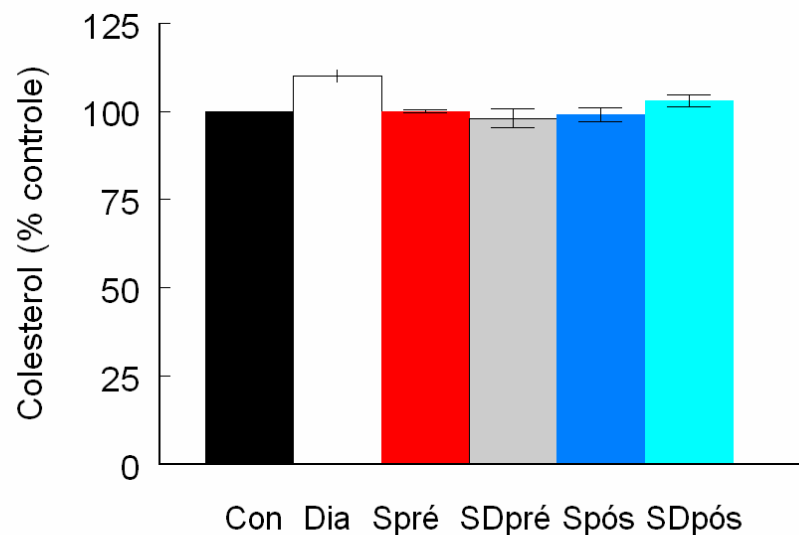
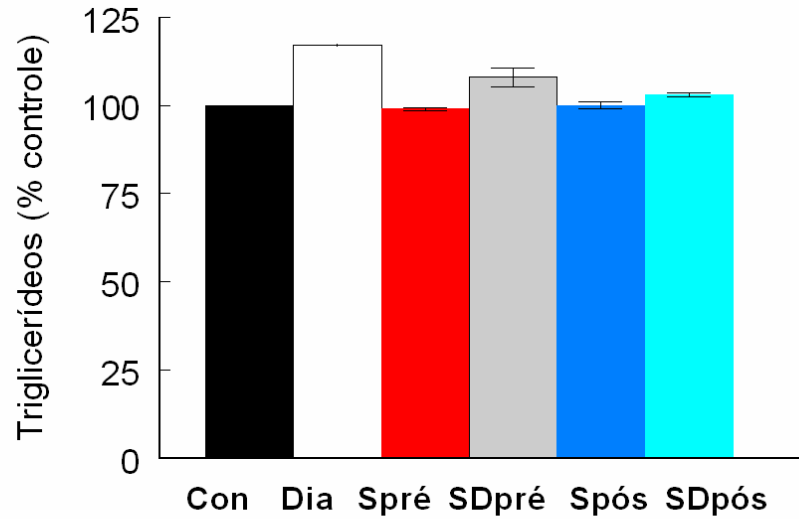


Figura 10: Dosagem de colesterol plasmático nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias (B) após a indução de diabetes Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Spré) Selênio pré-tratados, SDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Spós) Selênio pós-tratados, SDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (mg/dL) $55,9 \pm 0,54$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7).

A



B

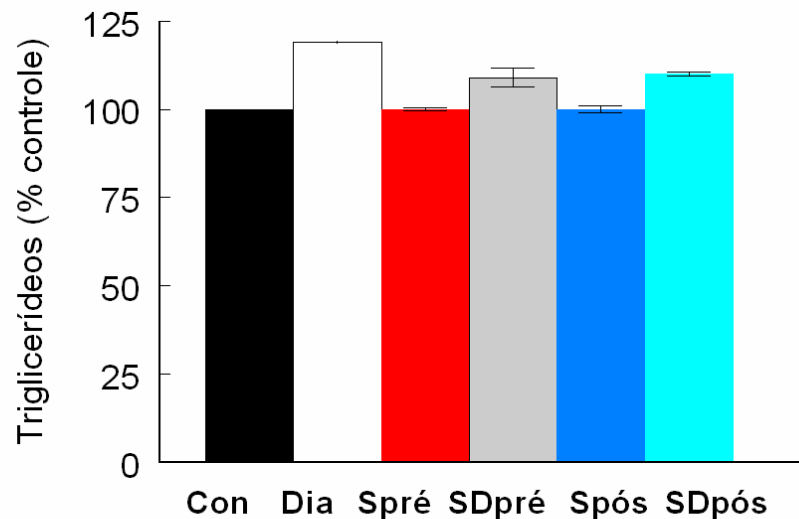


Figura 11: Dosagem de triglicerídeos plasmáticos nos animais sacrificados 7 (A) e 14 dias (B) após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Spré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados +diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (mg/dL) $124,4 \pm 0,56$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7).

4.1.5 Avaliação da função hepática dos animais

Nos animais sacrificados 7 dias após a indução de diabetes, a atividade da enzima AST apresentou um aumento de 72 % nos animais diabéticos (fig 12A e 12B) se comparada ao grupo controle. Já os animais diabéticos que foram pré (fig 12A) e pós- tratados (fig 12B) com o referido composto não apresentaram aumento na atividade enzimática, verificando-se atividade comparável a do grupo controle. Também não foi verificado acréscimo na atividade enzimática no grupo que recebeu apenas o composto de selênio, tanto nos pré (fig 12A) quanto nos pós-tratados (fig 12B).

Nos animais sacrificados 14 dias após a indução de diabetes, a atividade da enzima AST apresentou um aumento de 59 % nos animais diabéticos (fig 13A e 13B) quando comparada ao grupo controle. Os animais diabéticos que foram pré (fig 13A) e pós-tratados (fig 13B) com o referido composto apresentaram um aumento na atividade enzimática, com valores de 68 % e 70 % de acréscimo respectivamente quando comparados ao controle. Também não foi verificado um acréscimo significativo na atividade enzimática no grupo que recebeu apenas o composto de selênio, tanto nos pré (fig 13A) quanto nos pós-tratados (fig 13B).

Nos animais sacrificados 7 dias após a indução de diabetes, a atividade da enzima AST apresentou um aumento de 63 % nos animais diabéticos (fig 14A e 14B) em relação ao grupo controle. Já os animais diabéticos que foram pré (fig 14A) e pós-tratados (fig 14B) com o referido composto não apresentaram um aumento significativo na atividade enzimática, verificando-se atividade comparável a do grupo controle. Além disso, não foi verificado um acréscimo na atividade enzimática no grupo que recebeu apenas o composto de selênio, tanto nos animais pré (fig 14A) quanto nos pós-tratados (fig 14B).

Verificou-se também que nos animais sacrificados 14 dias após a indução de Diabetes, a atividade da enzima AST apresentou um aumento de 59 % nos animais diabéticos (fig 15A e fig 15B), se comparado ao grupo controle. Os animais diabéticos que foram pré (fig 15A) e pós-tratados (fig 15B) com o referido composto apresentaram um aumento na atividade enzimática, com valores de 60 % e 59 % de acréscimo respectivamente quando comparados ao controle. Além disso, não foi verificado um acréscimo significativo na atividade enzimática no grupo que recebeu apenas o composto de selênio, tanto pré (fig 15A) quanto pós-tratados (fig 15B)

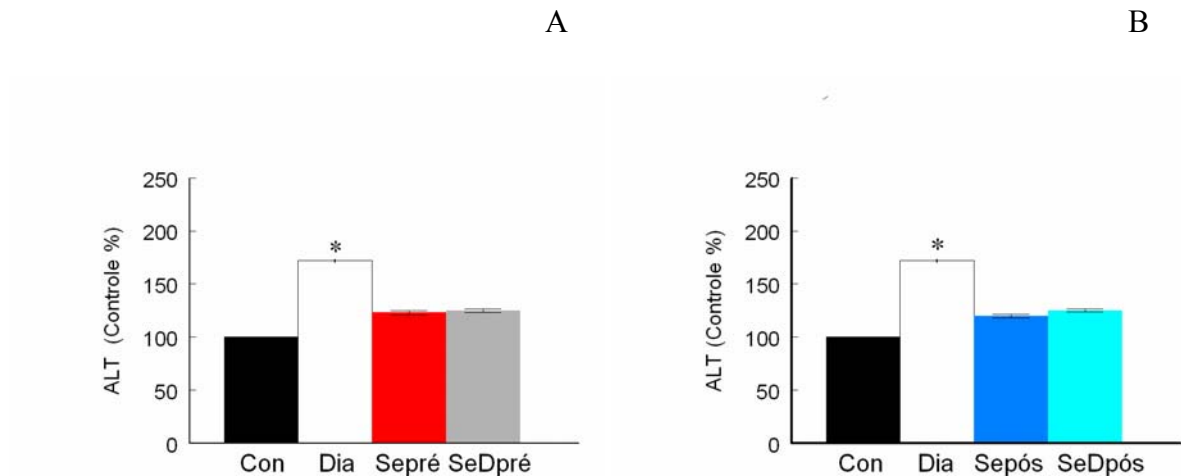


Figura 12: Atividade da enzima alanina aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (mg/dL) $12,44 \pm 0,78$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan).

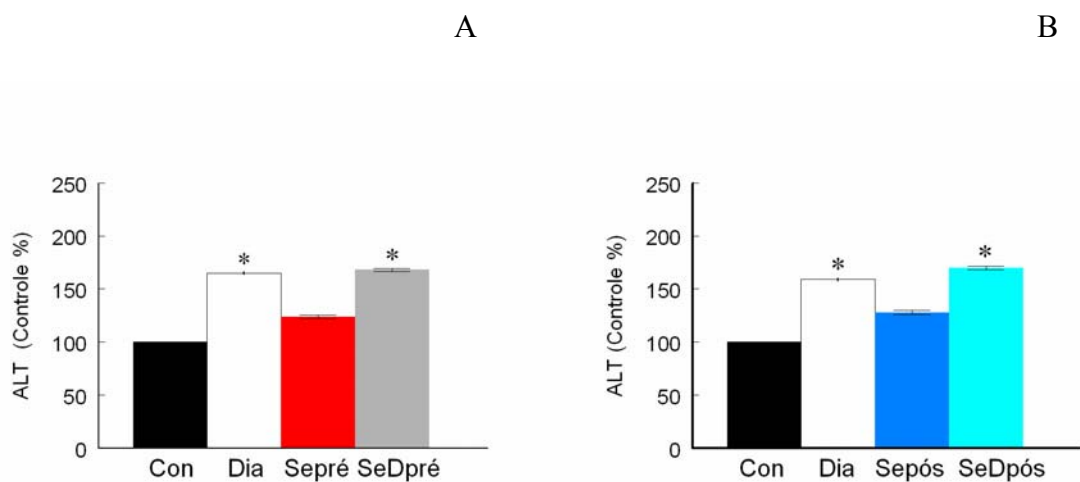


Figura 13: Atividade da enzima alanina aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (mg/dL) $12,44 \pm 0,78$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan).

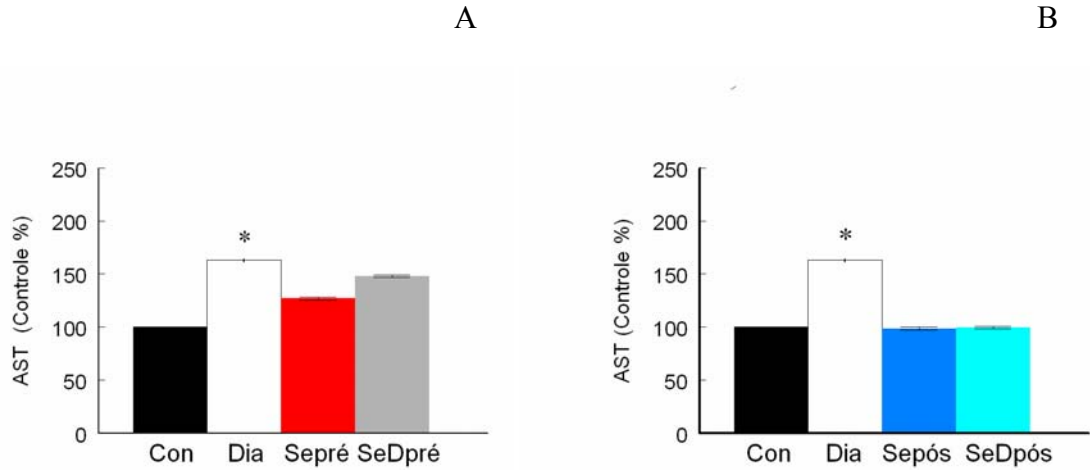


Figura 14: Atividade da enzima aspartato aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (U/L): $20,14 \pm 0,98$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0.05$ (ANOVA/Duncan).

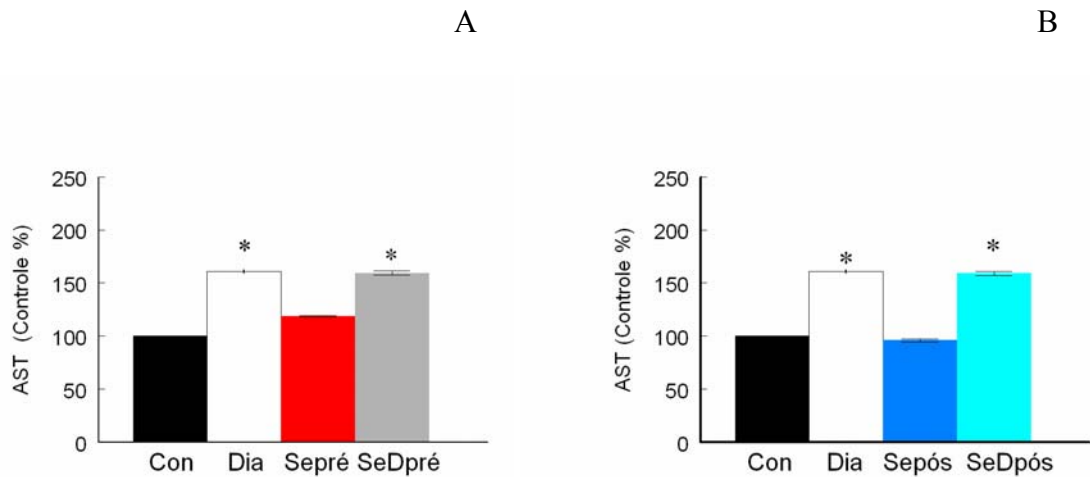


Figura 15: Atividade da enzima aspartato aminotransferase plasmática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. Após jejum de 12 horas realizou-se a coleta de sangue, e as dosagens foram realizadas no plasma heparinizado. Valor do controle (U/L): $20,14 \pm 0,98$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-7). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0.05$ (ANOVA/Duncan).

4.2 Avaliação da atividade da enzima δ -ALA-D tecidual dos animais

4.2.1 Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-D hepática dos animais

Não houve diferença significativa na atividade da enzima δ ALA-D hepática entre os animais pré (fig 16A) e pós-tratados (fig 16B) após a indução de diabetes e sacrificados 7 dias após a mesma indução. Entretanto nos animais que foram pré-tratados e sacrificados 14 dias após a indução, houve uma redução da atividade enzimática de 40% no grupo diabético, 29 % no grupo Sepré e 37 % no grupo SeDpré em relação ao grupo controle (fig 17A). Efeito semelhante foi encontrado nos animais pós-tratados com o composto e sacrificados 14 dias após a geração do estado diabético (fig 17B) constatou-se uma inibição da atividade enzimática de 40 % para o grupo diabético, 26% para o grupo Sepós e 34,3% para o grupo SeDpós comparando-se a atividade do grupo controle. Verificou-se também que o Selênio apresentou um efeito inibitório *per se* sobre a atividade enzimática dos animais pré (fig 17A) e pós-tratados com $(\text{OSe})_2$ (fig 17B) após a indução de diabetes e sacrificados 14 dias após a mesma indução.

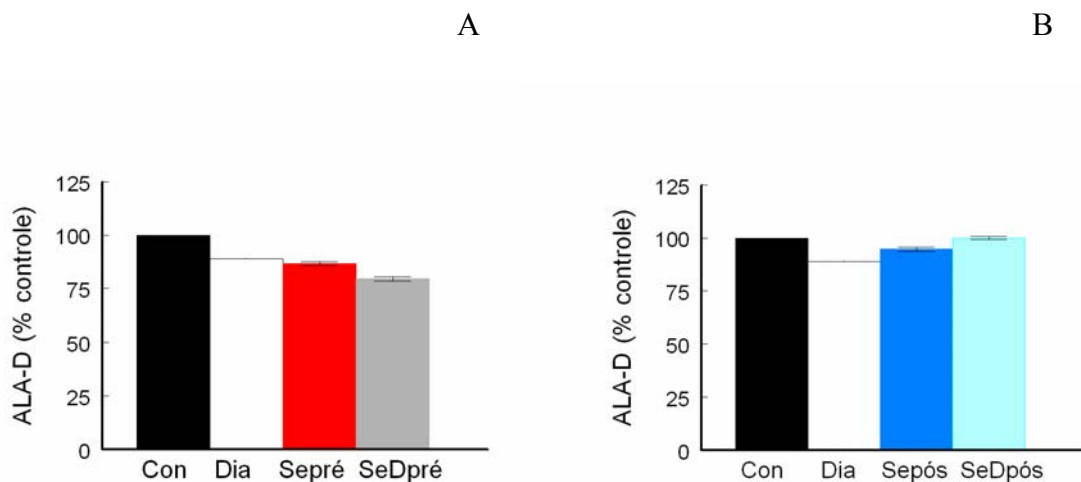


Figura 16: Atividade da enzima δ ALA-D hepática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados + diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h): $59,3 \pm 0.39$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-10).

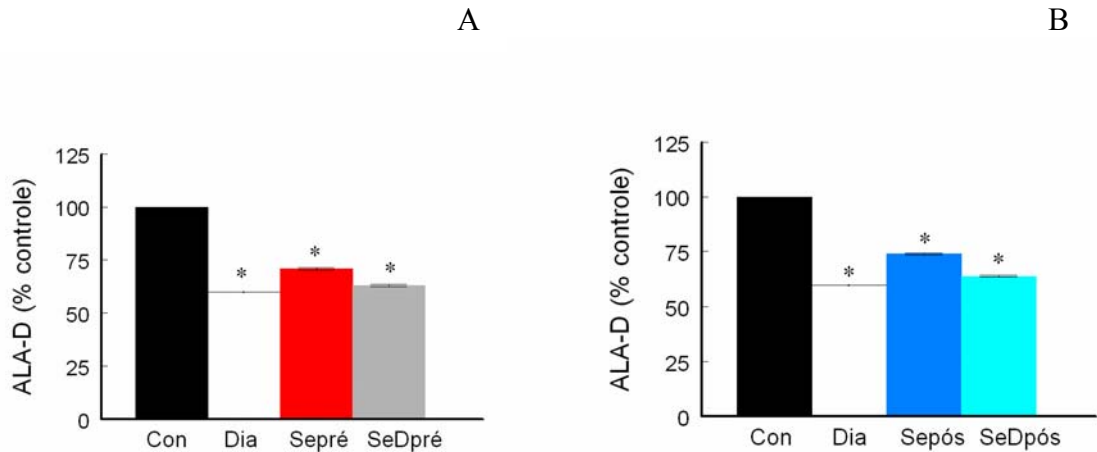


Figura 17: Atividade da enzima δ ALA-D hepática nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi $59,3 \pm 0,39$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-10). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan).

4.2.2 Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-D renal dos animais

Diferenças significativas não foram encontradas na atividade da enzima δ ALA-D renal entre os animais pré (fig 18A) e pós-tratados (fig 18B) após a indução de diabetes e sacrificados 7 dias após a mesma indução. Entretanto nos animais que foram sacrificados 14 dias após a indução, houve uma redução da atividade enzimática de 35% no grupo diabético, 25 % no grupo Sepré e 33,3 % no grupo SeDpré em relação ao grupo controle (fig 19A). Efeito semelhante foi encontrado nos animais pós-tratados com o composto e sacrificados 14 dias após a geração do estado diabético (fig 19B), constatou-se uma inibição da atividade enzimática de 35% para o grupo diabético, 20% para o grupo Sepós e 23,5% para o grupo SeDpós comparando-se a atividade do grupo controle. Além disso, pode-se verificar que o selênio apresentou um efeito inibitório *per se* sobre a atividade enzimática dos animais pré (fig 9A) pós-tratados com $(\text{OSe})_2$ (fig 9B) e sacrificados 14 dias após a mesma indução.

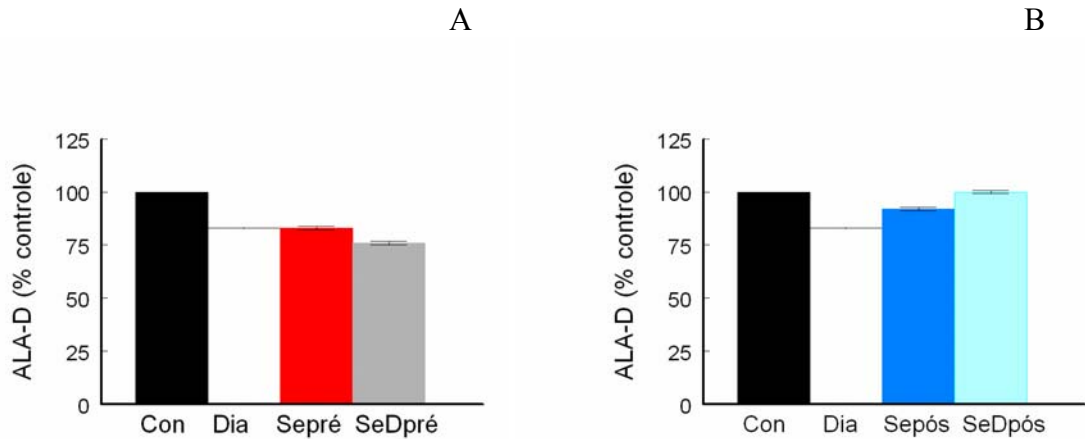


Figura 18: Atividade da enzima δ ALA-D renal nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi $11,9 \pm 0,34$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-8).

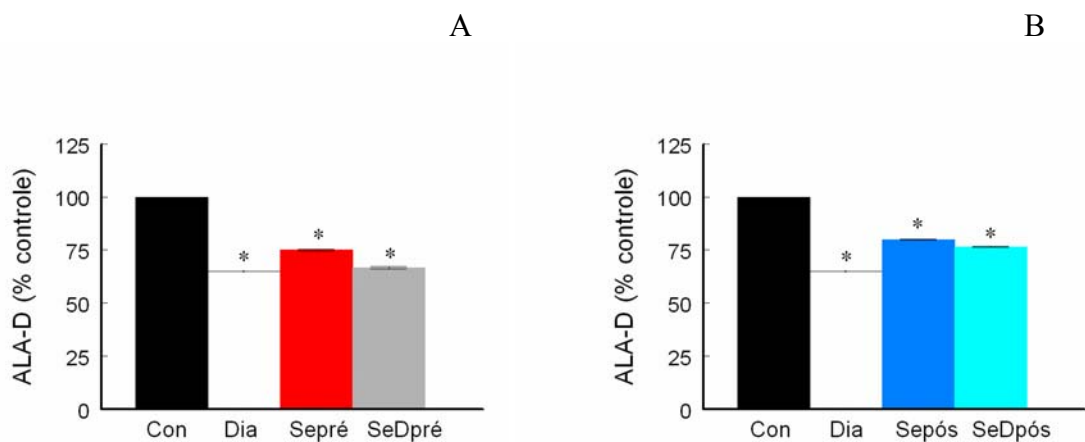


Figura 19: Atividade da enzima δ ALA-D renal nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi $11,9 \pm 0,34$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 6-8). *significativamente diferente do controle, nível de significância $p \leq 0,05$ (ANOVA/Duncan).

4.2.3 Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-D cerebral dos animais

Todos os grupos, incluindo os animais que receberam o tratamento ($(\text{OSe})_2$), aqueles que receberam apenas o aloxano e aqueles que receberam ambos, não apresentaram alterações na atividade da δ ALA-D em comparação ao grupo controle e quando comparados entre si. Este efeito foi visualizado em ambos os animais pré (fig 20A) e pós-tratados com $(\text{OSe})_2$ e sacrificados 7 dias após a indução de diabetes (fig 20B). Efeito idêntico foi encontrado na atividade da mesma enzima, onde não houve diferença significativa dentro de todos os grupos, nos animais pré (fig 21A) e pós-tratados (fig 21B) com $(\text{OSe})_2$ e sacrificados 14 dias após a indução da referida patologia.

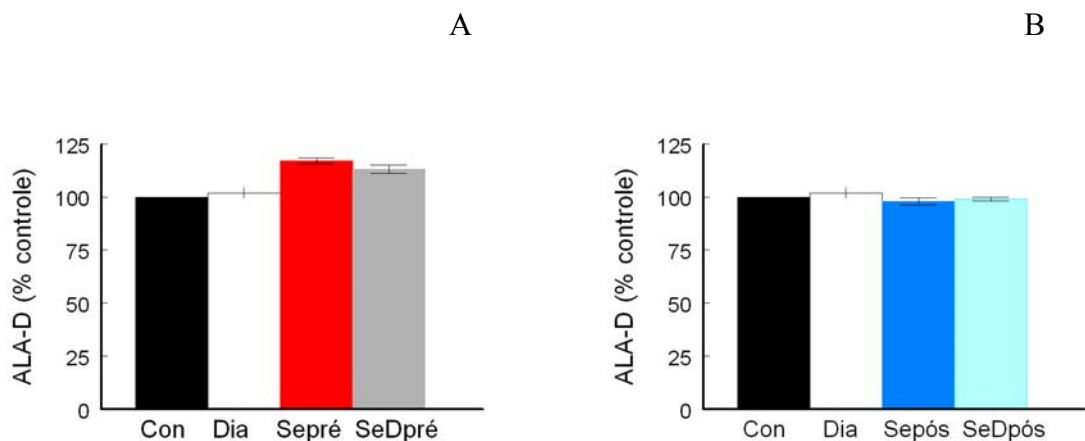


Figura 20: Atividade da enzima δ ALA-D cerebral nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi $4,2 \pm 0,45$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 5-6).

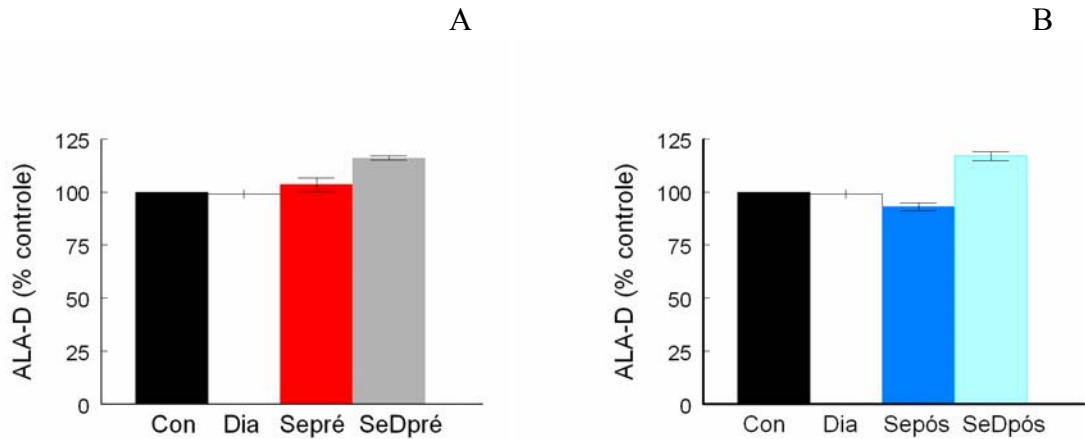


Figura 21: Atividade da enzima δ ALA-D cerebral nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes . Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi. $4,2 \pm 0,45$ Dados são expressos como média \pm EP (n = 5-6).

4.2.4 Avaliação do efeito do disseleneto de difenila na atividade da enzima δ ALA-D esplênica dos animais

De maneira análoga aos resultados obtidos no tecido cerebral, não foram verificadas alterações significativas na atividade da enzima δ ALA-D dentre todos os grupos. Essa ausência de efeito foi constatada tanto nos animais que receberam o pré-tratamento (fig 22A e 23A) quanto àqueles animais que receberam o pós-tratamento (fig 22B e 23B). após a injeção de aloxano nos diferentes dias de sacrifício.

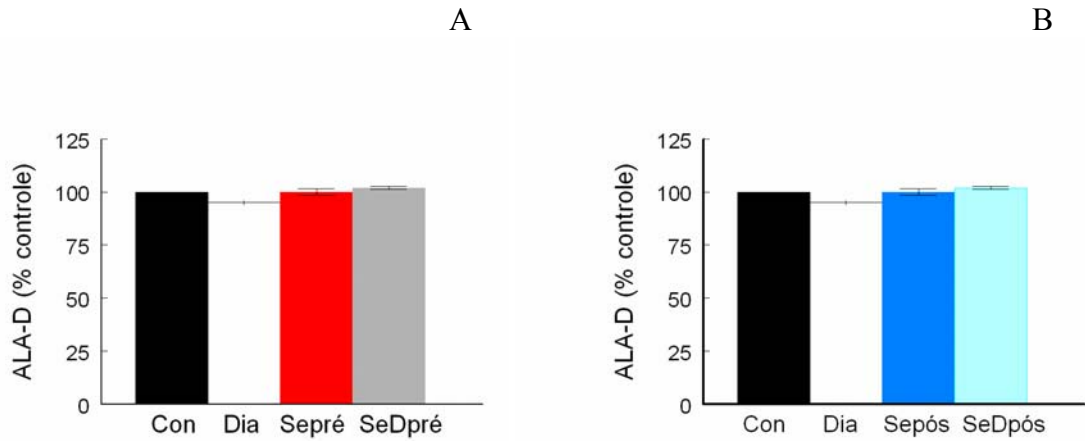


Figura 22: Atividade da enzima δ ALA-D esplênica nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 7 dias após a indução de diabetes. Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante.. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi $8,4 \pm 0.41$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 4-5).

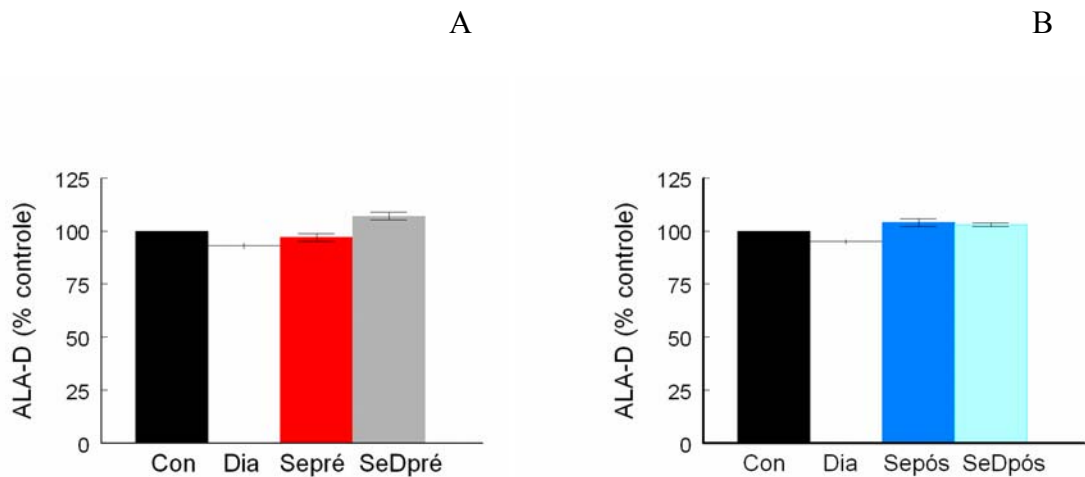


Figura 23: Atividade da enzima δ ALA-D esplênica nos animais que receberam pré (A) e pós-tratamento (B) e foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes . Os ratos foram tratados com $(\text{OSe})_2$ (10 mg/kg). Os grupos são: Con) Controles, Dia) Diabéticos, Sepré) Selênio pré-tratados, SeDpré) Selênio pré-tratados+diabetes, Sepós) Selênio pós-tratados, SeDpós) Selênio pós-tratados+diabetes. As amostras teciduais foram retiradas, homogeneizadas em salina e então centrifugadas para a obtenção do sobrenadante. Atividade enzimática do grupo controle (nmol PBG/mg protein/h) foi $8,4 \pm 0.41$. Dados são expressos como média \pm EP (n = 4-5).

4.3. Avaliação do peso corporal dos animais

Verificou-se uma significativa perda no peso corporal dos ratos diabéticos no decorrer do experimento quando comparado ao próprio grupo. Efeito similar foi constatado nos ratos diabéticos tratados com $(\text{OSe})_2$ tanto antes (tab II), quanto depois (tab III) da indução da referida patologia. Nos ratos que receberam apenas o disseleneto de difenila, em ambos os tratamentos (tab II; tab III), observou-se também uma redução no peso corporal, entretanto, essa perda de peso é revertida ao final do experimento. Observar também esquema 1.

TABELA II- Peso corporal dos ratos pré-tratados com $(\text{OSe})_2$

<i>Grupos</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 6</i>	<i>Dia 14</i>	<i>Dia 21</i>
<i>Controle</i>	241 ± 6.50	236 ± 8.84	255 ± 9.51	260 ± 10.4
<i>$(\text{OSe})_2$</i>	229 ± 18.8	205 ± 11.7*	229 ± 14.0	261 ± 12.1
<i>Diabetes</i>	255 ± 12.0	242 ± 14.8	222 ± 9.87*	208 ± 11.7*
<i>Db + Se</i>	215 ± 11.1	207 ± 6.05	174 ± 4.55*	171 ± 14.7*

Dados são expressos como média ± EP (n = 6-10) * comparado ao próprio grupo, nível de significância $p \leq 0.05$ (ANOVA 2 vias).

TABELA III- Peso corporal dos ratos pós-tratados com $(\text{OSe})_2$

<i>Grupos</i>	<i>Dia 1</i>	<i>Dia 6</i>	<i>Dia 14</i>	<i>Dia 21</i>
<i>Controle</i>	231 ± 6.50	239 ± 8.84	245 ± 9.51	255 ± 10.4
<i>$(\text{OSe})_2$</i>	207 ± 7.57	205 ± 7.40	199 ± 7.06*	209 ± 9.00
<i>Diabetes</i>	255 ± 12.0	242 ± 14.8	222 ± 9.87*	208 ± 11.7*
<i>Db + Se</i>	193 ± 6.25	191 ± 6.83	177 ± 6.59*	171 ± 4.56*

Dados são expressos como média ± EP (n = 6-10).* comparado ao próprio grupo, nível de significância $p \leq 0.05$ (ANOVA 2 vias).

5. Discussão

O presente trabalho mostrou claramente que a atividade da enzima δ -ALA-D hepática e renal foi inibida nos animais diabéticos, diabéticos tratados com disseleneto de difenila e nos animais que receberam apenas o referido composto. O efeito do composto é visualizado apenas nos animais que foram sacrificados 14 dias após a indução de diabetes. Além disso, o tecido alvo parece ser relevante para esse efeito inibitório, uma vez que, não houve ação do mesmo sobre os tecidos esplênico e cerebral.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram os efeitos inibitórios da hiperglicemia, causados pela injeção de aloxano sobre a atividade da enzima δ -ALA-D hepática e renal dos animais. Essas alterações somente são visualizadas aos 14 dias após a indução, isso indica que as alterações teciduais do diabetes são dependentes do tempo de estado de hiperglicemia. Esses achados estão em concordância com pesquisas realizadas em camundongos que receberam dietas com alto valor de carboidratos ou alto-valor energético e apresentaram uma inibição da enzima δ -ALA-D (Folmer et al., 2002; Folmer et al., 2003). Efeitos semelhantes são encontrados também em pacientes humanos diabéticos tipo 1 e 2, onde a atividade da δ -ALA-D também está inibida no estado hiperglicêmico (Cuartero et al, 1999). O mecanismo proposto para esta inibição seria a glicação não enzimática de proteínas e o estresse oxidativo (Folmer et al., 2002). A auto-oxidação da glicose que ocorre no estado de hiperglicemia gera radicais livres (Wolf et al., 1987, Hunt et al.1988), os quais atuariam indiretamente na inibição da atividade enzimática. (Browlee et al, 1984 e 1995). Outro mecanismo proposto para explicar a referida inibição seria a glicação do resíduo de lisina, o qual compõe o sítio ativo da enzima (Jaffe & Marckham, 1987).

Além da inibição enzimática causada pela hiperglicemia, o presente trabalho demonstrou que o disseleneto de difenila inibiu *per se* a atividade da δ -ALA-D dos animais que receberam apenas este composto duas semanas após a indução de diabetes. Esse efeito inibitório seria explicado pela ação oxidante do selênio em resíduos cisteinil no sítio β da enzima, os quais são considerados essenciais para a atividade da mesma (Barbosa et al, 1998; Nogueira et al, 2003).

Em contrapartida, o selênio desempenha importante papel fisiológico na estrutura de muitas enzimas envolvidas na decomposição de peróxidos, incluindo glutathiona peroxidase e fosfolipídio hidroperoxidase glutathiona peroxidase, as quais contêm selênio na forma de seleniocisteína (Ursini et al.,1982 e 1987; Neve et al.,1989). Além disso, o selênio também

apresenta propriedades antioxidantes em moléculas sintéticas, tais como disseleneto de difenila (Meotti et al, 2004) e ebselen (Rossato et al., 2002; Tiano et al., 2000).

Concomitantemente ao achados anteriores, o disseleneto de difenila tem demonstrado atividades antiinflamatórias e antinociceptivas em ratos e camundongos (Nogueira et al., 2003), atividade neuroprotetora (Ghisleni et al, 2003) e efeitos anti-secretor e antiúlcera em ratos (Trevisan, 2004).

Os resultados obtidos na determinação da atividade das enzimas alanina aminotransferase (AST) e aspartato aminotransferase (AST) no plasma de ratos demonstraram que o disseleneto de difenila não apresentou efeito hepatotóxico na dose testada (10mg/kg ou 30,9 μ mol/kg) tanto no pré quanto pós-tratamento e nos diferentes dias de sacrifício. O mesmo ocorreu em relação às dosagens de uréia e creatinina, onde não foi verificada nefrotoxicidade em todos os animais tratados. Esses achados estão de acordo com o recente estudo conduzido por Meotti et al, 2003, que apresenta a relativa segurança do referido composto em diferentes doses. Além disso, Meotti et al também apresenta a importância da via de administração da droga escolhida, demonstrando que a toxicidade via subcutânea é inferior a via intraperitoneal. Verificou-se também que o estado hiperglicêmico parece não alterar os demais parâmetros bioquímicos, como os triglicerídeos e o colesterol total, fazendo-se necessário a realização de experimentos com maior tempo de estado hiperglicêmico. Outros dados obtidos neste trabalho são os valores da atividade das aminotransferases (AST e ALT) nos animais pré e pós-tratados e sacrificados após uma semana da indução. Os referidos valores mantiveram-se nos níveis normais, fato que não é apresentado pelo grupo diabético. Esses resultados parecem atribuir ao disseleneto de difenila um papel hepatoprotetor neste período.

Além dos resultados verificados nas aminotransferases, o presente estudo demonstrou os efeitos do disseleneto de difenila e do aloxano no peso corporal dos animais, onde foi verificada uma severa diminuição desse parâmetro. Além disso, o pós e o pré-tratamento com disseleneto de difenila causaram *per se* uma diminuição no peso corporal desses animais, entretanto o peso é recuperado ao final do período experimental. Esses últimos achados podem ser sinais de intoxicação causada pelo composto e estão de acordo com estudos realizados por Tinggi, 2003 e Stangherlin et al., 2004.

O interesse em diminuir os efeitos da hiperglicemia no processo celular tem sido crescente, devido às possíveis implicações no tratamento para diabéticos. De fato, os resultados aqui encontrados demonstram que tanto o pré quanto o pós-tratamento com o

disseleneto de difenila foram efetivos em reduzir a glicemia e a frutossamina sérica em ratos diabéticos. Esses achados são apoiados por vários estudos que indicaram que a administração de formas inorgânicas de selênio como selenito e selenato de sódio a ratos diabéticos, induzidos com estreptozotocina, podem ser efetivas em reduzir a concentração de glicose sanguínea, estimulando a captação de glicose em tecidos insulino-dependentes (McNeill et al., 1991; Berg et al., 1995; Ezaki, 1991, Stapleton et al., 1997).

O mecanismo pelo qual o selênio atuaria na homeostase da glicose poderia ser explicado pela estimulação das duas maiores funções metabólicas reguladas pela insulina de maneira PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) dependente, mas independente da ativação do receptor de insulina. Além disso, esta forma de selênio estimula caminhos sinalizados pela insulina com cinética diferente da mesma. Em resumo, o selenito de sódio atuou tanto como um mimético da insulina como também de maneira não mimética da mesma (Heart & Sung, 2003).

Desta maneira, o disseleneto de difenila não foi eficaz em proteger a inibição da atividade da enzima ALA-D verificada nesta dose e protocolo testados, entretanto ele parece possuir atividade hepatoprotetora aos 7 dias após indução e propriedade de reduzir o estado de hiperglicemia. Assim novos estudos poderiam ser realizados para investigar as propriedades do disseleneto de difenila, levando também em consideração que o mesmo possui uma estrutura química relativamente simples, com facilidade de ser sintetizada, o que de fato representaria uma vantagem econômica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que :

↪ O pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila inibiram *per se* a atividade das enzimas δ -ALA-D hepática e renal dos animais diabéticos e não diabéticos sacrificados 14 dias após a indução de diabetes.

↪ O pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila não alteraram a atividade das enzimas δ -ALA-D hepática e renal nos animais diabéticos e não diabéticos sacrificados 7 dias após a indução de diabetes.

↪ O pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila não alteraram a atividade das enzimas δ -ALA-D cerebral e esplênica nos animais diabéticos e não diabéticos sacrificados 7 e 14 dias após a indução de diabetes.

↪ A hiperglicemia parece inibir a atividade das enzimas δ -ALA-D hepática e renal nos animais diabéticos sacrificados 14 dias após a indução de diabetes.

↪ O pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila foram efetivos em reduzir a glicemia e a frutossamina sérica nos ratos diabéticos.

↪ O pré e pós-tratamento com o composto de selênio causaram *per se* uma diminuição no peso corporal dos animais tratados, entretanto o peso é recuperado ao final do período experimental.

↪ O disseleneto de difenila parece não apresentar efeito hepatotóxico na dose testada tanto no pré quanto pós-tratamento e nos diferentes dias de sacrifícios.

↪ O disseleneto de difenila parece apresentar um papel hepatoprotetor nos animais diabéticos que receberam o selênio antes e após a indução de diabetes e foram sacrificados 7 dias após a referida indução.

↪ O estado de hiperglicemia não foi capaz de alterar os parâmetros bioquímicos uréia, creatinina, colesterol e triglicerídeos dos animais no período de 7 e 14 dias de estado diabético.

↪ O pré e pós-tratamento com disseleneto de difenila também não alteraram os parâmetros bioquímicos uréia, creatinina, colesterol e triglicerídeos dos animais sacrificados 7 e 14 dias após a indução.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, M. et al. **Evidence for direct action of alloxan to induce insulin resistance at the cellular level.** Diabetologia, 1998. v. 41, n. 11, p. 1327-1336.

AKERBLOOM, H. K. et al. **Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes.** American Journal of Medical Genetics, 2002. v. 115, n. 1, p. 18-29.

AMAZARRAY, M. T. R. **Efeito de metais pesados em plantas: delta-aminolevulinato desidratase em Ricinus communis.** 1986. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Clinical Practice Recommendations.** Diabetes Care, 2000. Supplement I.

ANDERSON, P. M.; DESNICK, R. J. **Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from human erythrocytes.** Journal of Biological Chemistry, 1979. v. 254, n. 15, p. 6924-6930.

ARNER, P.; POLLARE, T.; LITHEL, H. **Different etiologies of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in obese and non-obese subjects.** Diabetologia, 1991. v. 34, n. 7, p. 483-487.

AYAZ, M. et al. **Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations.** Biological Trace Element Research, 2002. v. 89, n. 3, p. 215-226.

BARBOSA, N. B. V. et al. **Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats.** Toxicology and Applied Pharmacology, 1998. v. 149, p. 243-253.

BARNARD, et al. **Mechanism of porphobilinogen synthase - Possible role of essential thiol groups.** Journal of Biological Chemistry, 1977. v. 252, p. 8965-8974.

BARREIRO, O. L. C. **5-Aminolaevulinic acid hydro-lyase from yeast. Isolation and purification.** Biochimica et Biophysica Acta, 1967. v. 139, p. 479-486.

BATLLE, A. M. del C.; FERRAMOLA, A. M.; GRINSTEN, M. **Purification and general properties of delta-aminolaevulinic acid dehydratase from cow liver.** The Biochemical Journal, 1967. v. 104, p. 244-249.

BATTELL, M. L.; DELGATTY, H. L.; Mc NEILL J. H.; **Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats.** Molecular and Cellular Biochemistry, 1998. v. 179, p. 27–34.

BECHARA, E. J. H. et al. **A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overloads.** Química Nova, 1993. v. 16, p. 385-392.

BECKER, D. J. et al. **Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats.** Diabetologia, 1996. v. 39, p. 3–11.

BEISSWENGER, P. J. et al. **Formation of immunochemical advanced glycosilation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes.** Diabetes, 1995. v. 44, p. 824-829.

BELLINASSO, M. L. **Estudo comparativo da delta-aminolevulinato desidratase em eritrócito humano e fígado de peixes (*Pimelodus maculatus*) e o efeito de metais pesados.** 1985. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1985.

BEVAN, D. R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. **Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn²⁺ for enzyme activity.** Journal of Biological Chemistry, 1980. v. 255, n. 5, p. 2030-2035.

BIERHAUS, A. et al. **Advanced glycation endproducts (AGEs) induced activation of NF- κ B is suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells.** Diabetes, 1997. v. 46, p. 1481-1490.

BIERHAUS A. et al. **The AGE/RAGE pathway in vascular disease and diabetes mellitus. Part I. The AGE-concept.** Cardiovascular Research, 1998. v. 37, n. 3, p. 586-600.

BIESSELS, G. J. et al. **Ageing and diabetes: implications for brain function.** European Journal of Pharmacology, 2002. v. 441, n. 1-2, p. 1-14.

BISHOP, T. R. et al. **Cloning and sequence of mouse erythroid delta-aminolevulinic acid dehydratase cDNA.** Nucleic Acids Research, 1989. v. 17, n. 4, p. 1775.

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

BOESE, Q. F. et al. **δ -Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme.** *Journal of Biological Chemistry*, 1991. v. 266, n. 26, p. 17060-17066.

BOLZAN, R. C. et al. **Delta-aminolevulinate dehydratase inhibition by phenyl selenoacetylene: effect of reaction with hydrogen peroxide.** *Pharmacology & Toxicology*, 2002. v. 90, n. 4, p. 214-219.

BORRALHO, L. M. et al. **Purification of delta-aminolevulinate dehydratase from genetically engineered yeast.** *Yeast*, 1990. v. 6, p. 319-330.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 1976. v. 72, p. 248-254.

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

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

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. **Inhibition of heparin-catalyzed human antithrombin III activity by non-enzymic glycosylation.** *Diabetes*, 1984. v. 32, n. 6, p. 532-535.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. **Nonenzymatic glycation and the pathogenesis of diabetic complications.** *Annals of Internal Medicine*, 1984. v. 101, n. 4, p. 527-537.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. **Advanced Glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications.** *New England Journal of Medicine*, 1988. v. 318, n. 20, p. 1315-1321.

BROWNLEE, M. **The pathological implications of proteins glycation.** *Clinical and Investigative Medicine*, 1995. v. 18, p. 275-281.

CABALLERO, F. A. et al. **Alteraciones en el camino metabolico del hemo en pacientes diabéticos.** Medicina (Buenos Aires), 1995. v. 55, p. 117-124.

CABALLERO, F. A. et al. **Reducing Sugars Trigger δ -Aminolevulinic Dehydratase Inactivation: Evidence of *In Vitro* Aspirin Prevention.** General Pharmacology, 1998. v. 31, n. 3, p. 441-445.

CADENAS, E.; SIES, H. **Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity.** Advances in Enzyme Regulation, 1985. v. 23, p. 217-237.

CASTELFRANCO, P. A.; BATLE, A. M.. **Aminolevulinatase dehidratasa: Propiedades y mecanismo de acción.** Nuevos Archivos de la Facultad de Medicina, 1983. v. 45, p. 61-70.

CHEH, A.; NEILANDS, J. B. **Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinatase dehidratasa.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 1973. v. 55, p. 1060-1063.

COHEN, M. V. **Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials?** Annals of Internal Medicine, 1989. v. 111, p. 918-931.

CSER, A. et al. **Selenium status and lipoproteins in healthy and diabetic children.** Clinical Chemistry, 1993. v. 34, p. 1306.

DAGOGO, J. S.; ALBERTI, K. G. M. M. **Management of Diabetes Mellitus in Surgical Patients.** Diabetes Spectrum, 2002. v. 15, n. 1, p. 44-48.

DENT, A. J. et al. **Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinatase dehidratasa distinguished by extended X-ray absorption fine structure.** Biochemistry, 1990. v. 29, p. 7822-7828.

DOHI, T. et al. **Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxidase enzymes in streptozotocin-induced rats.** Hormone and Metabolic Research, 1988. v. 20, p. 671-675.

DOUILLET, C. et al. **High dosage vitamin E effect on oxidative status and serum lipids distribution in streptozotocin-induced diabetic rats.** Biochemical Medicine and Metabolic Biology, 1993. v. 50, p. 265-276.

ECHELARD, Y. et al. **Nucleotide sequence of the hem B gene of Escherichia coli K12.** Molecular & General Genetic, 1988. v. 214, n. 3, p. 503-508.

EL YAZIGI, A.; LEGAYADA, E. **Urinary selenium in healthy and diabetic Saudi Arabians.** *Biological Trace Element Research*, 1996. v. 52, p. 55–63.

EMANUELLI, T. et al. **Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinate dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice.** *Pharmacology & Toxicology*, 1996. v. 79, p. 136-143.

EMANUELLI, T. et al. **Intrastratial administration of 5-aminolevulinic acid induces convulsions and body asymmetry through glutamatergic mechanisms.** *Brain Research*, 2000. v. 868, n. 1, p. 88-94.

EMANUELLI, T. **Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain.** *Neurochemistry International*, 2001. v. 38, n. 3, p. 213-218.

ERSÖZ, G.; YAKARYILMAZ, A.; TURAN, B. **Effect of sodium selenite treatment on platelet aggregation of streptozotocin-induced diabetic rates.** *Thromboses Research*, 2003. v. 111, p. 363-367.

ESPOSITO, C. et al. **Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties.** *The Journal of experimental Medicine*, 1989. v. 170, p. 1387-1407.

EZAKI, O. **The insulin like effect of selenate in rat adipocytes.** *The Journal of Biological Chemistry*, 1990. v. 265, p. 1124–1128.

FARINA, M. et al. **Selenoxides inhibit delta-aminolevulinic acid dehydratase.** *Toxicology Letters*, 2001. v. 119, n. 1, p. 27-37.

FARINA, M. et al. **Reaction of diphenyl diselenide with hydrogen peroxide and inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase from rat liver and cucumber leaves.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002. v. 35, n. 6, p. 623-31.

FERNÁNDEZ-CUARTERO, B. et al. **Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus.** *Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 1999. v. 31, p. 479-488.

FINELLI, V. N. et al. **Delta-aminolevulinate dehydratase, a zinc dependent enzyme.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1974. v. 60, p. 1418-1424.

FLOYD, R. A. **Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia.** The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1990. v. 4, p. 2587-2597.

FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; ROCHA, J. B. T. **Oxidative estresse in mice is dependent on the free glucose content in the diet.** Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2002. v. 34, n. 10, p. 1279-85.

FOLMER, V. et al. **A high fat diet inhibits delta-aminolevulinatase and increases lipid peroxidation in mice (Mus musculus).** The Journal of Nutrition, 2003. v. 1337, p. 2165-2170.

FRANKE, K. W. **A new toxicant occurring naturally in certain samples of plants foodstuffs. I. Results obtained in preliminary feeding trials.** The Journal of Nutrition, 1934, v. 8, p. 597-608.

FU, M. X. et al. **Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose.** Diabetes, 1992. v. 41, p. 42-48.

FUJITA, H.; ORII, Y.; SAND, S. **Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats.** Biochimica et Biophysica Acta, 1981. v. 678, n. 1, p. 39-50.

GANNON, M. **Molecular genetic analysis of diabetes in mice.** Trends in Genetics, 2002. v. 17, n. 10, p. 23-28.

GARRO, J. C. et al. **Glucose effect on haem metabolism.** Molecular Aspects of Medicine, 1990. v. 11, p. 28.

GERICH, J. E. **The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity.** Endocrine Reviews, 1998. v. 19, n. 4, p. 491-503.

GIBBS, P. N. B.; JORDAN, P. M. **Identification of lysine at the active site of human delta-aminolaevulinatase dehydratase.** Biochemical Journal, 1986. v. 236, p. 447-451.

GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. **The purification and properties of delta-aminolaevulinic acid dehydratase.** Biochemical Journal, 1955. v. 61, n. 4, p. 618-29

GHISLENI, G. et al. **Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoccontent.** Brain Research, 2003. v. 986, p. 196-9.

GHOSH, R.; MUKHERJEE, B.; CHATTERJEE, M. **A novel effect of selenium on streptozotocin-induced diabetic mice.** Diabetes Research, 1994. v. 25, p. 165–171.

GRANICK, S.; MAUZERALL, D. **Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen.** The Journal of Biological Chemistry, 1958. v. 232, p. 1119-1140.

GRECO, D.; STABENFELDT, G. H. **Endocrinology.** In: TEXTBOOK OF VETERINARY PHYSIOLOGY. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. p. 404-411.

GREENBERG, A. S.; McDANIEL, M.L. **Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes,** European Journal of Clinical Investigation, 2002. v. 32, Suppl 3, p. 24-34.

GROSS, T. M.; TER VEER, A. **Continuous glucose monitoring in previously unstudied population subgroups.** Diabetes Technology & Therapeutics, 2000. v. 2, Suppl 1, p. 27-34.

GUO, G. G.; GU, M.; ETLINGER, J. D. **240 kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase.** The Journal of Biological Chemistry, 1994. v. 269, n. 17, p. 12399-12402.

GUR, S.; CINEL, I. **Sodium selenate partially corrects impaired functional responses in detrusor muscle in streptozotocin-induced diabetic rats.** Biological Trace Element Research, 2003. v. 93, n. 1-3, p. 171-188.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.** Methods in Enzymology, 1990. v. 186, p. 1-5.

HEART, E.; SUNG, C. K. **Insulin-Like and Non-Insulin-Like Selenium Actions in 3T3-L1 Adipocytes.** Journal of Cellular Biochemistry, 2003. v. 88, p. 719-731.

HEY, Y. J. et al. **Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes.** Molecular and Cellular Biochemistry, 1998. v. 178, p. 367–375.

HOFMANN, M. A. et al. **Insufficient glycemic control increases NF- κ B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetes mellitus.** Diabetes Care, 1998. v. 21, p. 1310-1316.

HOFMANN, M. A. et al. **Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy demonstrate increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B.** Diabetologia, 1999. v. 42, p. 222-232.

HOLECEK, Y.; RACEK, J.; JERABEK, Z. **Administration of multivitamin combinations and trace elements in diabetes.** Casopis Lekarů Ceskych, 1995. v. 134, p. 80–83.

INOUYE, M. et al. **Levels of lipid peroxidation product and glycated hemoglobin A_{1c} in the erythrocytes of diabetic patients.** Clinica chimica Acta, 1998. v. 276, p. 163-172.

JAFFE, E. K.; HANES, D. **Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalysed reaction - Requirement for Schiff 's base formation.** The Journal of Biological Chemistry, 1986. v. 261, p. 9348-9353.

JAFFE, E. K.; MARKHAM, G. D.; RAJAGOPALAN, J. S. **¹⁵N and ¹³C 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.** Biochemistry, 1990. v. 29, p. 8345-8350.

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

JOHNSON, R. **Standardization of hemoglobin A_{1c} (letter).** Clinical Chemistry, 1998. v. 44, p.1068.

JORDAN, P. M.; GORE, M. G.; CHAUDHRY, A. G. **Subunit modification of 5-aminolevulinic acid dehydratase involving cysteine residues.** Biochemical Society Transactions, 1976. v. 4, p. 762-763.

KANEKO, J. J.; MATTEEUWS, D.; ROTTIERS, R. P. **A renal function, insulin secretion and glucose tolerance in mild streptozotocin (a broad-spectrum antibiotic and anti-tumor agent derived from *I Streptomyces achromogenes*) diabetes in dog.** American Journal of Veterinary Research, 1978. v. 39, n. 5, p. 807-809.

KAPPAS, A. et al. Direct comparison of Sn-mesoporphyrin, an inhibitor of bilirubin production, and phototherapy in controlling hyperbilirubinemia in term and near-term newborns. *Pediatrics*, 1995. v. 95, n. 4, p. 468-474.

KENNEDY, A. L.; LYONS, T. J. **Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications.** *Metabolism*, 1997. v. 46, p. 14–21.

KLAYMAN, D. L.; GÜNTHER, W. H. **Organic selenium compounds: their chemistry and biology**, Wiley-Interscience, 1973. v. 68, 157pp.

KLJAL, K.; RUNJE, R. **Selenium and glycogen levels in diabetic patients.** *Biological Trace Element Research*, 2001. v. 83, p. 223-9

LEBEDEVA, E. A. **Relationship between serum selenium level and lipid spectrum in patients with diabetes mellitus type I.** *Prol Endokrinol*, 1991. v. 3, p. 23–25.

LINDER, M. C. **Nutrition and metabolism of the trace elements.** *Nutritional Biochemistry and Metabolism*, 1990. v. 7, p. 216-277.

MACIEL, E. N. et al. **Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect δ -Aminolevulinatase from liver, kidney and brain of mice.** *Journal of Biochemical and Molecular*, 2000. v. 14, p. 310-319.

MALAISSÉ, W. J., et al. **Determinants of the selective toxicity of aloxan to the pancreatic β cell.** *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1982. v. 79, p. 927-930.

MATHEUS, C. E.; LEITER, E. H. **Constitutive differences in antioxidant defense status distinguish alloxan-resistant and alloxan-susceptible mice.** *Free Radical Biological Medical*, 1999. v. 27, n. 3, p. 449-455.

MAXWELL, S. R. et al. **Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *European Journal of Clinical Investigation*, 1997. v. 27, p. 484–490.

Mc NEILL, J. H.; DELGATTY, H. L. M.; BATTELL, M.L. **Insulinlike effects of sodium selenate in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Diabetes*, 1991. v. 40, p. 1675–1678.

MELOV, S. et al. A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*, 1998. v. 18, p. 159-163.

MEOTTI, F. C. et al. **Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice.** Toxicology Letters, 2003. v. 143, n. 1, p. 9-16.

MEOTTI, F. C. et al. **Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation.** Environment Research, 2004. v. 94, n. 3, p. 276-282.

MOHAMED, A. K. et al. **The role of oxidative estresse and NF- κ B activation in late diabetic complications.** BioFactors, 1999. v. 10, n. 2-3, p. 157-167.

MONEVA, M. H.; DAGOGO-JACK, S. **Multiple drug targets in the management of type 2 diabetes.** Current Drug Targets , 2002. v. 3, n. 3, p. 203-221.

MONNIER, V. M. et al, **Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence.** The New England Journal of Medicine, 1986. v. 13314, n. 7, p. 403-408.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPEZ-MARTINEZ, M. C. **Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases.** The Science of the Total Environment, 2000. v. 249, p. 347-371.

NAZIROGLU, M. **Enhanced testicular antioxidant capacity in streptozotocin-induced diabetic rats: protective role of vitamins C and E and selenium.** Biological Trace Elements Research, 2003. v. 94, n. 1, p. 61-72.

NAZIROGLU, M.; CAY, M. **Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin.** Biological Trace Elements Research, 2001. v. 79, n. 2, p. 149-59.

NEVE, J.; FAVIER, A. **Selenium in medicine and biology.** In: PROCEEDINGS OF THE SECOND INTERNATIONAL CONGRESS ON TRACE ELEMENTS IN MEDICINE AND BIOLOGY, Berlin: Walter de Gruyter, 1989, p. 97-111.

NIELSEN, K. et al. **Beta-cell maturation leads to in vitro sensitive to citotoxins.** Diabetes, 1999. v. 48, n. 12, p. 2323-2332.

NOGUEIRA, C. W. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide.** Inflammation Research, 2003. v. 52, n. 2, p. 56-63.

NOGUEIRA, C.W. et al. **Organochalcogens effects on delta aminolevulinatase activity from human erythrocytic cells in vitro.** Toxicology, 2003. v. 191, p. 169-178.

NOUROOZ ZADEH, J. et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. Diabetologia, 1997. v. 40, p. 647–653.

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

PAULMIER, C. **Selenium reagents and intermediates in organic synthesis.** Pergamon Books, 1986.

PEMBERTON, L. B.; MANAX, W. G. **Problems in producing alloxan diabetes.** Surgery, 1970. v. 68, n. 2, p. 375-378.

POLO, C. F. et al. **Haem biosynthesis in streptozotocin-induced diabetic mice.** Molecular Aspects of Medicine, 1990. v. 11, p. 29.

POLO, C. F. et al. **Further studies on the non-enzymatic glycosilation of ALA-D, PBG-D and rhodenase,** Abstracts International Conference of Porphyrins, Porphyria and Photodynamic therapy, 1993. Melbourne, Australia.

POLO, C. F. et al. **STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and alfa-tocopherol.** Chemico-Biological Interactions, 1995. v. 95, p. 327-334.

PRATICÒ, D.; DELANTY, N. **Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease.** Physiology in Medicine, 2000. v. 109, p. 577-585.

RANK, J. M. et al. **Hematin therapy for the neurologic crisis of tyrosinemia.** The Journal of Pediatrics, 1991. v.118, n. 1, p. 136-139.

RATNAIKE, S.; BLAKE, D.; SHEVENAN, P. **Enzymic glycation may decrease activity of erythrocytocy delta aminolevulinatase in diabetes mellitus.** Clinical Chemistry, 1987. v. 33, p. 1807-1810.

ROCHA, J. B. T. et al. **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 Journal of Medical and Biological Research, 1993. v. 26, p. 1077-1083.

ROCHA, J. B. T. et al. **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, 1995. v. 100, p. 27-37.

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).** Comparative Biochemistry and Physiology, 1989. v. 94B, p. 65-69.

ROSSATO, J. I. et al. **Antioxidant properties of new calcogenites against lipid peroxidation in rat brain.** Neurochemistry Research, 2002. v. 3, p. 297-303.

RUIZ, C. et al. **Selenium, zinc, and copper in plasma of patients with type I diabetes mellitus in different metabolic control states.** Journal of trace elements in medicine and biology, 1998. v. 12, p. 91-95.

SASSA, S. **Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay.** Enzyme, 1982. v. 28, p. 133-145

SASSA, S.; KAPPAS, A. **Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone.** The Journal of Clinical Investigation, 1983. v. 71, n. 3, p. 625-634.

SCASSA, M. E. et al. **Insulin inhibits δ -aminolevulinic acid synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells.** Experimental Cell Research, 1998. v. 244, p. 460-469.

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

SCHLIENGER, J. L. et al. **Perturbation des oligoéléments plasmatiques dans le diabète.** La Presse Médicale, 1988. v. 17, p. 1076-1079.

SCHWARTZ, K.; FOLTZ, C. M. **Selenium as a integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.** Journal of the American Chemical Society, 1957. v. 79, p. 200-214.

SCHWARZ, K. **A possible site of action for vitamin E in intermediary metabolism.** The American Journal of Clinical Nutrition, 1961. v. 9, p. 71.

SCHWARTZ, J. G. **The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management.** Diabetes/metabolism Reviews, 1995. v. 3, p. 269-287.

STADTMAN, T.C. **Selenium-dependent enzymes.** Annual Review of Biochemistry, 1980. v. 49, p. 93-110.

SHEMIN, D. **5-Aminolaevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism.** Philosophical transactions of the Royal Society of London, 1976. v. 273B, p. 109-115.

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

SMID, E.; FERENCZ, A.; FODOR, M. **Use of pooled human serum in the standardization process of the serum fructosamine determination for the estimation of glycosylated serum proteins.** Clinica Chimica Acta, 1986. v.156, p.215-219.

SPALLHOLZ, J. E. **On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity.** Free Radical Biology & Medicine, 1993. v. 20, p. 131-145.

SPENCER, P.; JORDAN, P. M. **Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*.** Biochemical Journal, 1994. v. 300, p. 373-381.

STANGHERLIN, E. C. **Teratonic vulnerability of rates fetuses to diphenyl ditelluride: prenatal assessment.** Toxicology, 2004. *Im press.*

STAPLETON, S. R. et al. **Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase.** Biochimica at Biophysica Acta, 1997. v. 1355, p. 259–269.

STAPLETON, S. R. **Selenium: an insulin-mimetic.** Cellular and Molecular Life Sciences, 2000. v. 57, p. 1874–1879.

STEPPAN, C. M.; LAZAR, M. A. **Resistin and obesity-associated insulin resistance.** Trends in Endocrinology and Metabolism, 2002. v. 13, p. 18-23.

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

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. Physiological Research, 2001. v. 50, p. 536-546.

TAMAI, H.; SHIOI, Y.; SASA, T. **Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*.** Plant & Cell Physiology, 1979. v. 20, n. 2, p. 435-444.

TIANO, L. et al. **Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro.** Mutation Research, 2000. v. 464, n. 2, p. 269-277.

TIMBRELL, J. A. **Principles of Biochemical Toxicology.** 2nd Ed, London: Taylor & Francis, 1991. pp. 180.

TINGGI, U. **Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review.** Toxicology Letters, 2003. v. 137, p. 103-110.

TREVISAN, M. **Efeito do disseleneto de difenila em lesões induzidas em lesões de ratos.** 2004. Dissertação (mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

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.** Biochemical and Biophysical Acta, 1979. v. 570, p. 167-178.

TURPEINEN, U.; KARJALAINEN, U.; STENMAN, U. **Three assays for glycohemoglobin compared.** Clinical Chemistry, 1995. v. 41, p. 191-195.

TWARDOWSKA-SAUCHA, K. et al. **Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and trace elements concentrations in II and III trimester of pregnancy in pregnant women with diabetes.** Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, 1994. v. 92, p. 313–321.

URSINI, F. et al. **Purification of pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxidase.** *Biochemica and Biophysica Acta*, 1982. v. 710, p. 197-211.

URSINI, F.; BINDOLI, A. **The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes.** *Chemistry and Physics of Lipids*, 1987. v. 44, p. 255-276.

VISHWANATH, V. et al. **Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus: correlation with long-term complications.** *Diabetes*, 1986. v. 35, p. 916-921.

VLASSARA, H.; BUCALA, R.; STRIKER, L. **Pathogenetic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging.** *Laboratory Investigation*, 1994. v. 70, n. 2, p. 138-151.

VLASSARA, H. **The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications.** *Diabetes-metabolism research and reviews*, 2001. v. 17, n. 6, p. 436-443.

WANG, N. C. et al. **Serum selenium levels in diabetic children: a follow up study during selenium-enriched agricultural fertilization in Finland.** *Biological Trace Element Research*, 1995. v. 47, p. 355-364.

WETMUR, J. G. et al. **Human delta-aminolevulinatase dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone.** *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 1986. v. 83, n. 20, p. 7703-7707.

WU, W. et al. **The quaternary structure of delta-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver.** *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 1974. v. 71, p. 1767-1770.

YADAY, S. et al. **Selenium and diabetes in the tropics.** *Pancreas*, 1991. v. 6, p. 528-533.

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.** *European Journal of Clinical Investigation*, 1997. v. 27, p. 179-181.