

**UFSM**

**TESE DE DOUTORADO**

**EFEITOS DE DIETAS HIPERGLICÍDICAS E HIPERLIPÍDICAS SOBRE  
A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E A ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-  
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM CAMUNDONGOS**

Vanderlei Folmer

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2004

**EFEITOS DE DIETAS HIPERGLICÍDICAS E HIPERLIPÍDICAS SOBRE A  
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E A ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-  
AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM CAMUNDONGOS**

**por**

**Vanderlei Folmer**

**Orientador: João Batista Teixeira da Rocha**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

**DOUTOR EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**PPGBT**

Santa Maria, RS, Brasil

2004

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado  
**EFEITOS DE DIETAS HIPERGLICÍDICAS E HIPERLIPÍDICAS SOBRE A**  
**PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E A ATIVIDADE DA ENZIMA DELTA-**  
**AMINOLEVULINATO DESIDRATASE EM CAMUNDONGOS**

**Elaborada por Vanderlei Folmer como requisito parcial para obtenção do**  
**grau de Doutor em Bioquímica Toxicológica.**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

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

Prof. Dr. Adalto Bianchini

Prof. Dr. José Maria Monserrat

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Profª. Drª. Rosane Gomez

**Santa Maria, Dezembro de 2004.**

## SUMÁRIO

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>vii</b>
<b>1 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>viii</b>
<b>2 RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>3 ABSTRACT.....</b>	<b>xi</b>
<b>4 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
5.1 Diabetes Mellitus .....	3
5.1.1 Histórico.....	3
5.1.2 Classificação .....	4
5.1.3 Prevalência.....	5
5.1.4 Etiologia do Diabetes Mellitus Tipo 1 .....	7
5.1.5 Etiologia do Diabetes Mellitus Tipo 2.....	8
5.1.6 Indução Experimental de Diabetes Mellitus Tipo 1 .....	10
5.1.7 Indução Experimental de Diabetes Mellitus Tipo 2 .....	12
5.2 Estresse Oxidativo.....	18
5.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio .....	18
5.2.2 Mecanismos de Defesa Antioxidantes.....	20

5.2.3 Peroxidação Lipídica .....	22
5.2.4 Estresse Oxidativo & Diabetes Mellitus .....	23
5.2.5 Estresse Oxidativo & Envelhecimento .....	25
5.3 A Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase.....	28
5.3.1 Características Estruturais.....	29
5.3.2 Ação Catalítica .....	32
5.3.3 Importância Toxicológica.....	36
5.3.4 Atividade da $\delta$ -ALA-D no Diabetes Mellitus .....	38
<b>6 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>7 ARTIGOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>58</b>
7.1 Artigo 1 - Oxidative Stress in Mice is Dependent on the Free Glucose Content of the Diet .....	60
7.2 Artigo 2 - A High Fat Diet Inhibits $\delta$ -Aminolevulinate Dehydratase and Increases Lipid Peroxidation in Mice (Mus Musculus) .....	65
7.3 Artigo 3 - High Sucrose Consumption Potentiates the Sub-Acute Cadmium Effect on $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase but not on $\delta$ -Aminolevulinate Dehydratase in Mice .....	70
7.4 Artigo 4 - $\delta$ -Aminolevulinate Dehydratase is a Potential Target For Screening the Protein Oxidations Caused by Both Diabetes and Aging in Mice.....	77
<b>8 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....</b>	<b>124</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>132</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>133</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### ARTIGO 1

<b>Figura 1</b> - Plasma glucose ( <b>1A</b> ) and triglyceride ( <b>1B</b> ) concentrations in mice after a 12-h period of starvation.....	40
<b>Figura 2</b> - TBA-RS content in brain, kidney, and liver.....	41
<b>Figura 3</b> - $\delta$ -ALA-D activity in hepatic tissue ( <b>3A</b> ) and in renal tissue ( <b>3B</b> ) in the absence or the presence of 2 mM DTT.....	42

### ARTIGO 2

<b>Figura 1</b> - Weight gain in mice fed high starch (HS) or high fat (HF) diets for 16 weeks.....	47
<b>Figura 2</b> – TBA-RS concentrations in liver, kidney, and brain in mice fed high starch (HS) high fat (HF) diets for 16 weeks.....	47
<b>Figura 3</b> - Correlations between TBA-RS concentrations and glycated hemoglobin in tissues of mice fed high starch diets for 16 wk. <b>A</b> , hepatic tissue; <b>B</b> , renal tissue; and <b>C</b> , cerebral tissue.....	48
<b>Figura 4</b> - $\delta$ -ALA-D activity in liver ( <b>A</b> ), kidney ( <b>B</b> ), and brain ( <b>C</b> ), in the absence (basal) or presence of 2 mM DTT, of mice fed high starch (HS) or high fat (HF) diets for 16 wk.....	48
<b>Figura 5</b> - Correlations between $\delta$ -ALA-D activity and glycated hemoglobin in tissues of mice fed high starch or high fat diets for 16 wk. <b>A</b> , hepatic tissue; <b>B</b> , renal tissue; and <b>C</b> , cerebral tissue .....	49

## **ARTIGO 3**

<b>Figura 1 – δ-ALA-D activity in testis (A), blood (B), and spleen (C) for control (con), sucrose (suc), cadmium (cd), and sucrose plus cadmium (suc + cd) groups, in the absence (Basal) or the presence of 2 mmol/L DTT.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 2 - Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral (A) and renal (B) tissues.....</b>	<b>57</b>

## **ARTIGO 4**

<b>Figura 1A - Weight gain in mice fed experimental diets for 30 weeks.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 1B - Abdominal fat index (abdominal fat content / body weight ratio).....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 1C - Plasma glucose levels after 12 hours of fasting.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 1D - Correlation between abdominal fat index and serum glucose content... </b>	<b>84</b>
<b>Figura 2A - TBARS content in brain.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 2B - TBARS content in kidney.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 2C - TBARS content in liver.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 2D - TBARS content in spleen.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 3A. δ-ALA-D activity in blood in the absence or the presence of DTT.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3B. δ-ALA-D activity in brain in the absence or the presence of DTT.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 3C. δ-ALA-D activity in kidney in the absence or the presence of DTT.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 3D. δ-ALA-D activity in spleen in the absence or the presence of DTT.....</b>	<b>88</b>
<b>Figura 4. High-glucose and high-sucrose intake, such as the aging process, lead to oxidative stress, occasioning lipid peroxidation and δ-ALA-D inhibition.....</b>	<b>89</b>

## **ÍNDICE DE TABELAS**

### **ARTIGO 1**

<b>Tabela 1</b> - Composition of diets.....	39
<b>Tabela 2</b> - Effect of a high glucose (HG) or high starch (HS) diet on body weight gain of mice.....	40

### **ARTIGO 2**

<b>Tabela 1</b> - Composition of the diets.....	47
---	----

### **ARTIGO 3**

<b>Tabela 1</b> - TBARS levels in brain, liver, kidney, spleen, and testis.....	55
<b>Tabela 2</b> - δ-ALA-D activity reactivation index in blood, brain, liver, kidney, spleen, and testis.....	57

### **ARTIGO 4**

<b>Tabela 1</b> - δ-ALA-D activity reactivation index in blood, brain, liver, kidney, and spleen .....	82
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ADA – American Diabetes Association

$\delta$ -ALA-D – Delta-aminolevulinato desidratase

AGE – Advanced glycation end products

$\delta$ -ALA – Ácido 5-aminolevulínico ou delta-aminolevulínico

CAT – Catalase

DM – *Diabetes mellitus*

DTT – Ditiotreitol

ERO – Espécie reativa de oxigênio

$H_2O_2$  – Peróxido de hidrogênio

GPX – Glutationa peroxidase

GSH –glutationa reduzida

GSSG –glutationa oxidada

$HO^\bullet$  – Radical hidroxila

$O_2^{\bullet-}$  – Radical ânion superóxido

PBG – Porfobilinogênio

PL – Peroxidação lipídica

PTGA – Produto terminal de glicosilação avançada

RAGE – Receptor para os produtos terminais de glicosilação avançada.

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

## **1 APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos, os quais encontram-se no item **ARTIGOS CIENTÍFICOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e representam a íntegra deste estudo.

O item **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrado no final desta tese, apresenta interpretações e comentários gerais sobre todos os artigos científicos apresentados.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** desta tese.

## **2 RESUMO**

A ingestão crônica de dietas com alto teor de glicose, sacarose e lipídios promove o desenvolvimento de resistência à insulina e DM tipo 2. Além disso, altos níveis de glicose podem produzir alterações químicas permanentes em proteínas e peroxidação lipídica. A enzima sulfidrílica  $\delta$ -ALA-D, a segunda enzima da rota de síntese do heme, é altamente sensível a elementos pró-oxidantes e sua atividade pode estar inibida em diabéticos. Desta forma, este estudo foi designado para avaliar os efeitos de dietas hiperglicídicas e hiperlipídicas sobre os níveis de peroxidação lipídica e a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em diferentes tecidos de camundongos.

O consumo de uma dieta rica em glicose, durante 25 semanas, causou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de glicose e triglicerídos, na quantidade de TBARS no rim e no fígado, e um decréscimo na atividade da  $\delta$ -ALA-D hepática quando comparado ao consumo de uma dieta rica em amido. O nível sanguíneo de HbA<sub>1c</sub> e as concentrações hepática, renal, e cerebral de TBARS foram mais altos em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura do que naqueles alimentados com uma dieta rica em amido, após 16 semanas de tratamento. As atividades hepática, renal e cerebral da  $\delta$ -ALA-D também foram menores nos camundongos alimentados com a dieta rica em gordura. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de HbA<sub>1c</sub> e a concentração de TBARS e uma correlação negativa entre os níveis de HbA<sub>1c</sub> e a atividade da  $\delta$ -ALA-D em todos os tecidos analisados.

Os efeitos do alto consumo de sacarose (durante 4 semanas) sobre um tratamento sub-agudo com cádmio também foram analisados. Houve um aumento nos níveis de TBARS no baço e no fígado dos grupos tratados com cádmio ou

sacarose + cádmio. A atividade da  $\delta$ -ALA-D testicular dos animais tratados com cádmio ou sacarose + cádmio foi inibida, enquanto houve um aumento na atividade desta enzima no sangue e no baço dos animais. Além disso, a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase diminuiu no cérebro e no rim dos animais tratados com sacarose + cádmio.

O consumo de dietas ricas em glicose e sacarose, durante 30 semanas, aumentou o peso corporal, o índice de gordura abdominal e a glicemia; e, uma correlação positiva foi observada entre o índice de gordura abdominal e os níveis sanguíneos de glicose. Os níveis de TBARS também foram elevados no cérebro e no rim e houve uma inibição na atividade da  $\delta$ -ALA-D no sangue, no cérebro, no rim e no baço de ambos os grupos. Além disso, os grupos tratados tiveram redução na atividade da  $\delta$ -ALA-D e níveis elevados de TBARS em relação a animais jovens. O DTT, o qual reduz pontes dissulfeto, aboliu o efeito inibitório das dietas sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D; e, a reativação da  $\delta$ -ALA-D pelo DTT nos grupos tratados com glicose e sacarose foi elevada em relação ao controle, indicando um status mais oxidativo desta enzima. Isto também foi observado quando os grupos tratados foram comparados com camundongos jovens.

De uma forma geral, os resultados deste estudo indicam que o consumo de dietas ricas em glicose, sacarose e gordura promove um estresse oxidativo relacionado à hiperglicemia, o que poderia estimular a glicação e a oxidação de proteínas e inibir a  $\delta$ -ALA-D em camundongos. Nossos dados também indicam que o alto consumo de sacarose, mesmo por um curto período, pode agravar a toxicidade do cádmio sobre camundongos. Especificamente, as alterações na atividade da  $\delta$ -ALA-D encontradas nesse trabalho colocam esta enzima como um alvo em potencial para acompanhar as oxidações fisiológicas ou patológicas causadas tanto pelo DM quanto pelo envelhecimento.

### **3 ABSTRACT**

Chronic intake of diets containing high proportion of glucose, sucrose or fat promotes the development of insulin resistance and type 2 *Diabetes mellitus*. Furthermore, high levels of glucose can produce permanent chemical alterations in proteins and lipid peroxidation.  $\delta$ -Aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), which is the second enzyme in the heme pathway, is a sulfhydryl-containing enzyme highly sensitive to the presence of pro-oxidants elements and has been found inhibited in diabetics. Thus, the present study was designed to evaluate the effects of hyperglycemic and hyperlipidic diets on the lipid peroxidation and  $\delta$ -ALA-D activity in different tissues of mice.

High-glucose consumption, during 25 weeks, caused a significant increase in plasma glucose and triglyceride levels, TBARS content in kidney and liver, and a decrease in hepatic  $\delta$ -ALA-D activity in relation to high-starch diet-fed animals. Blood HbA<sub>1c</sub> level and TBARS concentrations (liver, kidney, and brain) were significantly higher in mice fed the high-fat diet compared with those fed the high-starch diet, after 16 weeks.  $\delta$ -ALA-D activity (liver, kidney, and brain) of mice fed the high-fat diet was significantly lower than those of mice fed the high-starch diet. Furthermore, positive correlations were found between the HbA<sub>1c</sub> and TBARS levels and negative correlations were found between the HbA<sub>1c</sub> levels and  $\delta$ -ALA-D activity in all the studied tissues.

The effects of short-term high-sucrose consumption (4 weeks) on sub-acute cadmium treatment also were analyzed. There was a significant increase in TBARS levels (spleen and liver) in cadmium and high-sucrose plus cadmium-treated mice. Testicular  $\delta$ -ALA-D activity of cadmium and sucrose plus cadmium-treated animals was significantly inhibited, whereas the enzyme activity increased in blood and

spleen. Also,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity was significantly decreased in brain and kidney of sucrose plus cadmium-treated animals.

High-glucose or high-sucrose consumption, during 30 weeks, caused an important increase in body weight, abdominal fat index, and plasma glucose levels; and, a positive correlation was observed between the abdominal fat index and blood glucose levels. TBARS levels were significantly increased in brain and kidney of both high-glucose and high-sucrose fed mice. There was a significant inhibition of the  $\delta$ -ALA-D activity in blood, brain, kidney, and spleen of both high-glucose and high-sucrose-fed mice. The aged animals had reduced enzyme activity (kidney and spleen) and increased TBARS levels (kidney, liver) in relation to young mice. DTT-reactivation of  $\delta$ -ALA-D of high-glucose and high-sucrose groups was significantly elevated in relation to control, indicating a more oxidative status of this enzyme. This fact also was observed as control, high-glucose, and high-sucrose groups were compared to young mice.

In general, the results of this study indicate that consumption of high-glucose, high-glucose, and high-fat diet promotes oxidative stress related to hyperglycemia, which in turn can stimulate glycation and oxidation of proteins leading to  $\delta$ -ALA-D inhibition in mice. Furthermore, high-sucrose consumption and sub-acute cadmium treatment have interactive effects on cerebral and renal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, showing that a short-term intake of high quantity of sucrose can aggravate the toxicity of  $\text{Cd}^{2+}$ . Importantly,  $\delta$ -ALA-D activity alterations found in this work stated this enzyme as a potential target for screening the physiologic or pathologic protein glications and oxidations caused by both *Diabetes mellitus* and aging.

## **4 INTRODUÇÃO**

O *Diabetes mellitus* (DM) é considerado um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por um estado de hiperglicemia persistente, podendo ser resultante de uma deficiência na produção de insulina (DM tipo 1), uma resistência dos tecidos à ação deste hormônio (DM tipo 2) ou ambos os fatores (ALBERTI & SIMMET, 1998). O DM tipo 2 compreende em torno de 90% da população diabética, onde são reconhecidos como fatores etiológicos a idade, a predisposição genética e a obesidade (DEFRONZO et al., 1996; KAHN, 1998). Geralmente, a hiperglicemia no DM tipo 2 resulta de graus variáveis de resistência à insulina e/ou deficiência relativa de secreção desse hormônio pelas células beta do pâncreas (DEFRONZO et al., 1996; DEFRONZO, 1997; KAHN, 1998).

De forma semelhante ao que ocorre com humanos, a ingestão de dietas com alta proporção de carboidratos ou de lipídios pode causar resistência à insulina em animais experimentais (STORLIEN et al., 1986; BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996; HANSEN et al., 1998; STORLIEN et al., 2000). Logo, esses representam modelos interessantes para se estudar o desenvolvimento de resistência à insulina, assim como as alterações bioquímicas envolvidas neste processo.

A superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a diminuição das defesas antioxidantes podem estar associadas à manifestação do DM (BROWNLEE et al., 1984; COLLIER et al., 1990; BROWNLEE, 1994). Várias rotas bioquímicas que estão estreitamente associadas com a hiperglicemia podem aumentar a produção de EROS (HUNT et al., 1988; MOHAMED et al., 1999). Além disso, altos níveis de glicose podem produzir alterações químicas permanentes em proteínas e aumento na peroxidação lipídica (DAY et al., 1979; WOLFF & DEAN, 1987; FU et al., 1992; SCHWARTZ, 1995; JAIN & LIM, 2001).

A  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) é uma enzima essencial para todos os organismos aeróbicos, pois participa da rota biossintética dos compostos tetrapirróticos, os quais formam grupos prostéticos de proteínas fisiologicamente importantes como a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos (JAFFE & HANES, 1986; SASSA, 1998). A  $\delta$ -ALA-D é uma enzima que contém grupos sulfidrídicos (-SH) e, consequentemente, sua atividade é altamente sensível à presença de elementos pró-oxidantes, os quais podem oxidar estes grupos (BARBOSA et al., 1998; FARINA et al., 2001, 2003; SOARES et al., 2003).

Uma coexistência freqüente entre DM e doença porfírica tem sido encontrada em humanos e em modelos animais (CABALLERO et al., 1995; CABALLERO et al., 2000), o que pode estar ligado à inibição da enzima  $\delta$ -ALA-D encontrada em diabéticos (POLO et al., 1995; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999). A inibição dessa enzima, além de prejudicar a rota biossintética do heme, pode levar ao acúmulo de seu substrato, o ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA), o qual possui singular capacidade pró-oxidante conforme relatos na literatura (PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993, 1996).

Desta forma, tendo em vista que o DM tipo 2 compreende em torno de 90% da população diabética, onde obesidade e resistência à insulina são reconhecidas como características importantes, o presente estudo visou estudar o efeito de dietas hiperglicídicas e hiperlipídicas sobre o ganho de peso corporal, o nível de glicose no sangue, a peroxidação lipídica e a atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em camundongos.

## 5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 Diabetes Mellitus

#### 5.1.1 Histórico

O DM é um mal conhecido pela humanidade há muito tempo. No papiro de Ebers (1500 A.C.), um documento médico egípcio, é relatada uma doença caracterizada pela emissão anormalmente freqüente de urina (DINSMOOR, 1996). Já no ano 70 da Era cristã, o médico Areteu da Capadócia, descreveu a doença DIABETES, palavra grega que quer dizer sifão (DINSMOOR, 1996). Areteu observou que apesar dos diabéticos comerem muito (polifagia), terem muita sede (polidipsia), beberem muita água e produzirem muita urina (poliúria), cada vez ficavam mais fracos e edemaciados (poliastenia) e entravam quase sempre em coma antes da morte (DINSMOOR, 1996). Era uma doença grave e misteriosa, porque apesar da fartura de alimentos que entravam pela boca, as energias corporais desfaziam-se e saiam pela urina. Todas as calorias que entravam por cima (pela boca), saíam por baixo (pela urina), fazendo do corpo humano um verdadeiro sifão ou DIABETES.

Em aproximadamente 1600 anos, a ciência pouco avançou no estudo do Diabetes. Só em 1670, o médico inglês Thomas Willis descobriu que a urina dos diabéticos era "muitíssimo doce, cheia de açúcar" (DINSMOOR, 1996). Cinco anos mais tarde, Mathew Dobson verificou tratar-se realmente de açúcar. Em 1815, o médico M. Chevreul confirmou que o açúcar específico na urina dos diabéticos era a glicose (DINSMOOR, 1996). A partir dessa altura a doença passou a chamar-se "diabetes açucarada" ou "*Diabetes mellitus*".

Em 1869, Paul Langerhans observou que o pâncreas continha dois tipos de células, as responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e outras, agrupadas em ilhotas ou ilhas, que ele suspeitou terem função endócrina. A evidência dessa função veio no final do século XIX, quando Oskar Minkowski e Joseph von Mering realizaram experimentos com cães pancreatectomizados evidenciando o surgimento dos sinais e sintomas do DM nesses animais. A partir desse ponto o desafio era tentar isolar a substância responsável pela regulação sanguínea da glicose.

Entre 1916 e 1920, o fisiologista romeno Nicolas Paulesco realizou e publicou uma série de experiências com extrato de pâncreas provando que a injeção desse composto tinha a capacidade de diminuir a glicemia. Porém, o principal achado aconteceu em 1921, quando o cirurgião Frederic G. Banting e seu colaborador Charles H. Best descobriram a insulina. Esse fato rendeu o prêmio Nobel de Medicina a Banting e J. J. R. Macleod que era o professor responsável pelos laboratórios de pesquisa (BANTING et al., 1922; MINKOWSKI, 1989). Depois desta descoberta os pacientes diabéticos puderam ter uma melhor qualidade de vida, com a diminuição da morbidade e da mortalidade associadas a esta doença. Entretanto, foi possível observar que os enfermos acabavam sofrendo de complicações renais, vasculares e cardíacas conforme a doença progredia.

### **5.1.2 Classificação**

O DM representa um grupo heterogêneo de desordens metabólicas que têm a hiperglicemia como característica comum. De acordo com o Comitê Executivo para Diagnóstico e Classificação do DM da “American Diabetes Association” (ADA, 1997), ele pode surgir ocasionalmente de forma secundária depois de qualquer tipo de patologia que cause uma extensiva destruição das ilhotas pancreáticas, incluindo pancreatites, tumores, certas drogas, sobrecarga de ferro (hemocromatose),

patologias endócrinas adquiridas ou genéticas e excisões cirúrgicas. Entretanto, as formas mais comuns e importantes de DM resultam de desordens primárias do sistema sinalizador da insulina presente nas ilhotas pancreáticas.

Estas desordens de origem primária podem ser divididas em duas variantes comuns (tipo 1 e tipo 2), as quais diferem nas suas características inerentes, resposta à insulina e origem (ADA, 1997; WHO, 1999):

- *Diabetes mellitus* tipo 1, também conhecida como DM dependente de insulina, previamente referida como diabetes de manifestação juvenil, corresponde à aproximadamente 10% dos casos de DM primária;
- *Diabetes mellitus* tipo 2, ou DM não dependente de insulina, forma mais comum da doença, afetando aproximadamente 90% da população diabética.

### 5.1.3 Prevalência

O DM é um problema de saúde pública mundial. Estima-se que existam atualmente mais de 150 milhões de pessoas com esta síndrome no mundo, sendo que afigura-se uma previsão global futura com um aumento para 220 milhões em 2010 e 300 milhões em 2025 (AMOS et al., 1997; KING et al., 1998). Juntamente com esta projeção, pode ser estimado que 380 milhões de pessoas apresentem algum grau de intolerância à glicose em 2025 (EDELSTEIN et al., 1997). A maioria dos casos será de diabéticos tipo 2, o que está fortemente associado com um estilo de vida sedentário e com a obesidade (ZIMMET, 1999).

Recentemente, os seis países com o maior número de pacientes diabéticos eram: Índia (32,7 milhões), China (22,6 milhões), Estados Unidos (15,3 milhões), Brasil (12 milhões), Paquistão (8,8 milhões) e Japão (7,1 milhões) (KING et al.,

1998). O DM tipo 2 afetava aproximadamente 4.0% dos adultos no mundo em 1995 (HARRIS et al., 1998) e projeções indicam que esta prevalência irá aumentar para 5.4% até 2025 (KING et al., 1998). Sendo que este aumento está ocorrendo de forma desproporcional nos países em desenvolvimento, especialmente aqueles da Ásia e da América Latina (KING et al., 1998).

No Brasil, aproximadamente 50% das pessoas com DM desconhecem sua condição mórbida e 90% delas são portadoras de DM tipo 2 (FRANCO et al., 1998). Adicionalmente, MALERBI & FRANCO (1992) encontraram uma prevalência do DM e da intolerância à glicose de 7.6 e 7.8%, respectivamente, numa amostra da população brasileira; prevalência comparável com os dados de Estados Unidos e Europa. Este estudo foi conduzido com uma amostra representativa da população urbana brasileira com idades entre 30 e 69 anos em nove capitais (de 1986 a 1988), usando os critérios de diagnóstico da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1985).

Outro dado interessante é que, embora o DM tipo 2 seja usualmente caracterizado por um início (frequentemente assintomático) depois dos 50 de idade, nos habitantes das ilhas do Pacífico e em outros grupos de alta prevalência como no sul da Ásia, o início na faixa etária entre 20 e 30 anos está aumentando rapidamente (ROSENBLUM et al., 1999; ZIMMET, 1999). O DM tipo 2 já foi reportado em crianças do Japão, Estados Unidos, ilhas do Pacífico, Hong Kong, Austrália e Reino Unido (ROSENBLUM et al., 1999; FAGOT-CAMPAGNA & NARAYAN, 2001). Entre as crianças japonesas, esta forma já é mais comum do que o DM tipo 1, abrangendo aproximadamente 80% da população diabética nesta faixa etária; a incidência quase dobrou entre 1976–80 e 1991–5 (KITAGAWA et al., 1998).

Esta elevada prevalência do DM tipo 2 em crianças, geralmente associada à obesidade, parece sintomático dos efeitos da globalização e da industrialização, afetando todas as sociedades com estilo de vida sedentário (ZIMMET, 2000;

FAGOT-CAMPAGNA & NARAYAN, 2001).

#### **5.1.4 Etiologia do Diabetes Mellitus Tipo 1**

Esta forma de DM resulta de uma severa ou absoluta diminuição na produção de insulina, causada por uma redução na massa das células  $\beta$  do pâncreas. Usualmente, o DM tipo 1 desenvolve-se na infância com manifestação e severidade na puberdade. Esses pacientes dependem de insulina para sobreviver, por isso, até pouco tempo, o termo DM dependente de insulina era aplicado a esta patologia. Sem a aplicação de insulina esses pacientes costumam desenvolver complicações metabólicas sérias, tais como cetoacidose e coma.

Acredita-se que três mecanismos interligados sejam os responsáveis pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas presente no DM tipo 1: susceptibilidade genética, ataque auto-imune e algum tipo de agressão ambiental (BACH, 1994). A susceptibilidade genética, ligada a alelos específicos do complexo de histocompatibilidade principal da classe II, parece predispor certas pessoas ao desenvolvimento de uma agressão autoimune contra as células  $\beta$  das ilhotas do pâncreas (BACH, 1994). Sustentando os argumentos a favor da susceptibilidade genética, temos os dados de que o DM tipo 1 ocorre mais freqüentemente em pessoas descendentes da região norte da Europa e que a doença é muito menos comum em outros grupos raciais, incluindo negros, americanos nativos e asiáticos (BACH, 1994).

A reação auto-imune desenvolve-se espontaneamente ou, com mais freqüência, está ligada a algum evento ambiental que altera as células  $\beta$ , conferindo características imunogênicas. Estudos epidemiológicos sugerem que a ação de um vírus pode desencadear o processo. De fato, em períodos sazonais que

frequentemente correspondem à prevalência de infecções virais comuns costuma ocorrer um aumento no diagnóstico de novos casos (BENOIST & MATHIS, 1997; CONRAD et al., 1997). O consumo precoce de produtos derivados do leite de vaca e uma elevada ingestão de nitrato e nitrito também têm sido sugeridos (ATKINSON & MACLAREN, 1994).

Apesar da importância dos achados epidemiológicos, os possíveis fatores ambientais que precipitam o DM tipo 1 em indivíduos geneticamente susceptíveis permanecem especulativos. Os agentes ambientais que causam essa injúria são difíceis de identificar em virtude do longo período entre a exposição e o aparecimento da hiperglicemia, da genética complexa da doença e da necessidade aparente de vários insultos para iniciar a insulite (ATKINSON & MACLAREN, 1994).

### **5.1.5 Etiologia do Diabetes Mellitus Tipo 2**

O DM tipo 2 é considerado multifatorial, apresentando heterogeneidade em muitos aspectos. Anteriormente, foi considerado um distúrbio relativamente distinto caracterizado pela resistência tecidual à insulina; mas na realidade, o DM tipo 2 tem demonstrado ser a manifestação de uma desordem muito mais ampla (ZIMMET, 1999). Atualmente, essa desordem é denominada “síndrome metabólica” ou “síndrome X” — um grupo de fatores de risco para doenças cardiovasculares que, além da intolerância à glicose, inclui hiperinsulinemia, dislipidemia, hipertensão, obesidade visceral, hipercoagulabilidade e microalbuminúria (DEFRONZO, 1997; HANSEN, 1999).

Em função da importância clínica atual, existem algumas sugestões de sociedades médicas para detecção dos indivíduos portadores desta síndrome. Por exemplo, um recente consenso (ATP III, 2001) sugere que os indivíduos portadores de três ou mais dos seguintes critérios devam ser considerados como portadores da

síndrome metabólica:

- Obesidade abdominal (visceral), medida ao nível do umbigo: cintura > 102 cm em homens e > 88 cm em mulheres;
- Hipertrigliceridemia:  $\geq 150$  mg/dL;
- HDL colesterol: < 40 mg/dL em homens e < 50 mg/dL em mulheres;
- Hipertensão arterial sistêmica  $\geq 130/85$  mmHg;
- Glicemia de jejum:  $\geq 110$  mg/dL (recentemente, a ADA sugeriu que os valores de normalidade fossem reduzidos para, no máximo, 99 mg/dL).

Além destes, podem ser incluídos outros achados clínicos e laboratoriais como o IMC (índice de massa corporal), o nível de excreção urinária de albumina (microalbuminúria), os níveis sanguíneos de ácido úrico, a proteína C reativa, a homocisteína e a insulina de jejum (HANSEN, 1999).

Há um debate contínuo a respeito de qual seria o fator etiológico primário no desenvolvimento desta síndrome. Fatores genéticos, obesidade visceral, resistência à insulina e disfunção endotelial podem contribuir de forma isolada ou conjunta (REAVEN, 1988; ZIMMET, 1992). Também, além da importância da suscetibilidade de certos grupos étnicos, fatores ambientais e comportamentais como estilo de vida sedentário, distúrbios nutricionais e ganho de peso descontrolado são claramente importantes para o seu surgimento (ZIMMET, 1992).

Alguns pesquisadores postulam que a base para a susceptibilidade ao DM tipo 2 poderia ser o resultado de características genotípicas evolucionariamente vantajosas que promoveram deposição e estocagem de energia na forma de gordura em tempos de abundância, conferindo uma vantagem durante períodos regulares de jejum e desastres naturais (NEEL, 1962). Agora, nós temos um farto abastecimento de dietas com excesso de energia, carboidratos simples e gorduras saturadas, geralmente acompanhado por uma redução na atividade física nas

atividades ocupacionais e de lazer. Desta forma, ambos esses fatores poderiam transformar o perfil metabólico previamente favorável, visto nos “sobreviventes”, num inconveniente desvantajoso, o qual resulta em obesidade e DM tipo 2 (DOWSE & ZIMMET, 1993).

Existe um excelente modelo que retrata este fenômeno — o rato de areia israelense (*Psammomys obesus*) (ZIMMET, 1999). Quando esse animal é removido de seu ambiente natural, caracterizado por uma dieta escassa e submetido a uma dieta abundante e rica em calorias, ele desenvolve todos os componentes da síndrome metabólica, incluindo DM e obesidade. Até mesmo, vários novos genes relacionados ao DM e à obesidade têm sido isolados e seqüenciados a partir do *P. obesus* recentemente (ZIMMET, 1999).

No outro foco da discussão, a hipótese fenotípica está baseada em observações epidemiológicas ligando alterações ambientais com o risco de aparecimento de doenças como obesidade, DM e hipertensão. Certamente, as alterações no tipo de trabalho (de “braçal”, ou pesado, para sedentário), o aumento na computadorização e na mecanização, assim como as melhorias no setor de transportes; são apenas alguns exemplos das alterações que tiveram impacto recente sobre a saúde humana (HU et al., 2001; ZIMMET, 2000).

### **5.1.6 Indução Experimental de Diabetes Mellitus Tipo 1**

Em modelos animais experimentais, o DM tipo 1 pode ser induzido por uma pancreatectomia parcial ou pela administração de drogas diabetogênicas. As substâncias mais usadas para induzir DM em roedores são o aloxano e a estreptozotocina, as quais destroem seletivamente as células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas.

O aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil), um derivado do ácido úrico, causa degeneração e destruição das células  $\beta$  (DUNN et al., 1943; AHRÉN & SUNDKVIST, 1995). Em ratos, a dose mais frequentemente usada dessa droga com o objetivo de induzir DM tipo 1 é de 65 mg/kg para administração intravenosa (LENZEN & PANTEN, 1988). Quando administrado por via intraperitoneal ou subcutânea sua dose efetiva tem que ser 2-3 vezes maior. Uma dose intraperitoneal menor do que 150 mg/kg pode ser insuficiente para induzir DM em ratos (LENZEN & PANTEN, 1988).

A rápida captação pelas células secretoras de insulina parece ser uma das importantes características que determinam a diabetogenicidade do aloxano. Nas células  $\beta$  do pâncreas, ocorre formação de EROs (principalmente  $O_2^{\bullet-}$ ), precedida pela redução do aloxano a ácido dialúrico na presença de diferentes agentes redutores (LENZEN & PANTEN, 1988). Como o aloxano exibe uma alta afinidade por componentes celulares que possuem grupos -SH; a GSH, a cisteína e os grupos sulfidrílicos protéicos (incluindo enzimas que contenham -SH) são muito suscetíveis a sua ação (LENZEN & PANTEN, 1988). Outro alvo das EROs formadas é o DNA das ilhotas pancreáticas, cuja fragmentação ocorre nas células  $\beta$  expostas ao aloxano (LENZEN & PANTEN, 1988).

Recentemente, alguns investigadores têm sugerido que a seletividade de ação do aloxano não é suficientemente satisfatória. Na dose diabetogênica desta droga, foi encontrado um decréscimo nos grupos -SH, acompanhado por um aumento simultâneo na atividade da enzima glutationa peroxidase, no fígado de ratos logo depois de sua administração (SZKUDELSKI et al., 2001). Foi também observado que o aloxano intensifica a lipólise basal e induzida por epinefrina em adipócitos isolados de ratos e a insulina falha em restringir este efeito (SZKUDELSKI, 2001). Desta forma, usando aloxano para induzir DM, os animais

têm que ser examinados depois de um determinado período de tempo para minimizar os efeitos colaterais da ação da droga. Deveria também ser enfatizado que o espectro de dose diabetogênica do aloxano é muito estreito e por isso uma superdosagem pode ser tóxica, causando a perda de muitos animais (SZKUDELSKI, 2001).

A estreptozotocina (ETZ, 2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glicopiranose) é sintetizada pela levedura *Streptomyces achromogenes* e também pode ser usada para indução de DM tipo 1. Geralmente, administra-se uma dose única entre 40 e 60 mg/kg por via intravenosa para induzir DM tipo 1 em ratos adultos (SZKUDELSKI, 2001), mas também doses mais elevadas podem ser usadas. A ETZ é também eficaz depois de administração intraperitoneal de uma dose similar ou maior, já doses únicas inferiores a 40 mg/kg podem ser inefetivas (SZKUDELSKI, 2001).

A principal razão para a morte das células das ilhotas, induzida pela ETZ, parece ser a alquilação do DNA (SZKUDELSKI, 2001). A atividade alquilante da ETZ está relacionada ao seu grupamento nitrosouréia, pois depois da injeção de ETZ em ratos, diferentes purinas metiladas foram encontradas nos tecidos desses animais (SZKUDELSKI, 2001). A ETZ também é capaz de gerar EROs, as quais também contribuem para a fragmentação do DNA e provocam outros efeitos deletérios nestas células (SZKUDELSKI, 2001).

### **5.1.7 Indução Experimental de Diabetes Mellitus Tipo 2**

Diversas pesquisas com animais, particularmente roedores, têm demonstrado de uma forma clara e consistente que dietas ricas em carboidratos e lipídios diminuem a sensibilidade à insulina (STORLIEN et al., 1986; STORLIEN et al., 1988;

BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996; HANSEN et al., 1998; STORLIEN et al., 2000). Com base nesses dados, muitos modelos de roedores têm sido usados para abordar questões específicas da resistência à insulina e do desenvolvimento do DM tipo 2. Inclusive, a grande maioria dos agentes anti-diabéticos tem sido desenvolvida com base na eficácia primária sobre estes modelos.

De acordo com a literatura, ratos alimentados com uma dieta contendo altos níveis de glicose livre desenvolvem hiperglicemia mais rapidamente do que aqueles alimentados com uma dieta a base de amido (BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996). Nesse modelo, a pronta absorção da glicose poderia determinar uma hiperinsulinemia mais rápida e, subseqüente, facilitar o desenvolvimento de resistência à insulina (BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996).

Hamsters alimentados com dietas contendo 60% de frutose ou sacarose também desenvolvem obesidade e intolerância à glicose (KASIM-KARAKAS et al., 1996). Além disso, a ingestão de frutose aumenta os níveis de ácidos graxos não-esterificados no plasma e triglicerídos no plasma e no fígado destes animais (KASIM-KARAKAS et al., 1996). Devido ao fato de que a ingestão de dietas ricas em frutose por apenas duas semanas pode induzir a resistência à insulina nestes animais, este é um modelo bastante conveniente. Ratos alimentados com >60% de frutose pelo mesmo período de tempo também desenvolvem resistência à insulina com hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensão (TOBEY, 1982). Ambos os modelos, ratos e hamsters, têm sido utilizados para testar pequenas moléculas anti-diabéticas que melhoram a sensibilidade hepática à insulina (LEE et al., 1994).

Ratos alimentados com dietas ricas em gordura (60% das calorias como gordura) desenvolvem resistência à insulina, com metabolismo basal da glicose reduzido (KRAEGEN, 1986). A resistência à insulina é exemplificada por uma redução >50% na utilização global de glicose pelo corpo em níveis fisiológicos de

insulina e a falência na supressão da produção hepática de glicose (STORLIEN et al., 1986). Os principais efeitos supressivos sobre o transporte de glicose estão nos músculos esqueléticos oxidativos e no tecido adiposo marrom, sugerindo que esses tecidos contribuem significativamente para a resistência global à insulina (STORLIEN et al., 1986). Camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura também desenvolvem resistência à insulina e intolerância à glicose (AHREN et al., 1997; AHREN & SCHEURINK, 1998).

Têm sido propostos vários mecanismos para explicar os efeitos da ingestão de altas quantidades de gordura sobre a captação de glicose pelos tecidos periféricos. Entre eles estão alterações no ciclo envolvendo ácidos graxos e glicose (RANDLE, et al., 1963), aumento na ação glicocorticóide (KUSUNOKI et al., 1995), ativação da proteína cinase C (SCHMITZ-PEIFFER et al., 1997) e/ou da rota NF- $\kappa$ B (YUAN et al., 2001), desvio da glicose para a rota biossintética da hexosamina (HAWKINS et al., 1997), modulação da expressão de adipocitocininas, como fator de necrose tumoral (HOTAMISLIGIL et al., 1993), resistina (STEPPAN et al., 2001) e adiponectina (HU et al., 1996; WEYER et al., 2001).

O modelo de ingestão de dietas ricas em gordura é útil para estudar a resistência à insulina branda porque ele é mais parecido com os animais normais do que os animais diabéticos. Se a ingestão calórica for controlada cuidadosamente para evitar a obesidade, esse modelo não exibe hiperglicemia mesmo depois de muitas semanas submetidos à dieta (KRAEGEN et al., 1986; STORLIEN et al., 1986). A resistência à insulina desenvolve-se dentro de poucas semanas com hiperinsulinemia e tolerância prejudicada à glicose associados, mas o desenvolvimento de hiperglicemia franca demora mais tempo. As dietas ricas em gordura têm sido usadas largamente para estudar os processos envolvendo o desenvolvimento de resistência à insulina, na investigação dos efeitos anti-

obesidade e anti-diabéticos de drogas e como um estressor ambiental para testar os papéis de genes específicos em camundongos *knockout* e transgênicos.

Como o DM tipo 2 envolve interações complexas entre defeitos metabólicos e genéticos, animais geneticamente modificados também têm sido usados para elucidar as funções gênicas no contexto de um cenário ambiental normal ou alterado propositadamente. A transgenia é empregada para alterar a expressão de genes funcionais, com objetivo de introduzir um gene extrínseco no animal, para alterar a expressão de outros genes ou para recolocar genes com variações (MOLLER, 1994).

Questões como os mecanismos envolvidos na secreção de insulina estimulada pela glicose, o controle da produção hepática da glicose, os papéis funcionais de genes na mediação da ação da insulina e balanço energético *in vivo*, e o desenvolvimento da obesidade podem ser parcialmente ou totalmente respondidas através de estudos com esses modelos (MOLLER, 1994). Entretanto, uma das falhas genéricas da tecnologia transgênica é que a superexpressão ou a subexpressão gênica podem não ser fisiologicamente relevantes e seria difícil tirar conclusões definitivas sobre as funções gênicas com base em informações fenotípicas conseguidas a partir de animais transgênicos (MOLLER, 1994).

A tecnologia *knockout* oferece uma perspectiva diferente na qual pode-se ligar a deficiência ou as deficiências gênicas a um ou mais dos fenótipos do DM tipo 2 (KADOWAKI, 2000). Através desta técnica é possível inserir um gene em uma localização precisa no genoma do animal. Isso permite aos cientistas a substituição de um gene específico com um alelo inativo ou mutado. Deste modo, estes modelos permitem a remoção de um determinado gene de interesse na tentativa de definir qual efeito este gene tem na vida do organismo em questão.

A partir dos achados é possível identificar ou determinar de uma forma

adicional se um gene particular é um possível indutor de resistência à insulina e DM tipo 2, assumindo que os fenótipos refletem a função fisiológica do gene deletado. Deleções homozigóticas permitem estudar a função fisiológica de um gene particular, enquanto que as heterozigóticas ajudam a examinar o efeito da dosagem gênica (KADOWAKI, 2000). Com efeito, os papéis de muitos genes importantes para a sinalização da insulina e para produção ou utilização da glicose tem sido estudados em animais *knockout* (KADOWAKI, 2000).

Os camundongos homozigotos para a mutação *ob* no cromossomo 6, conhecidos como *ob/ob*, desenvolvem um diabetes brando com acentuadas obesidade, hiperfagia e hiperglicemia transitória, sendo usados como modelos para DM tipo 2 (COLEMAN, 1978; JOOSTEN & van der KROON, 1974). Os animais normais para o gene *ob* sintetizam o peptídeo leptina (167 aminoácidos, 14-16 kDa) que tem uma sequência peptídica sinalizadora e é altamente expressado pelo tecido adiposo (ZHANG et al., 1994). A expressão do gene *ob* está marcadamente reduzida nos camundongos *ob/ob* (ZHANG et al., 1994), o que inibe a rota de sinalização da leptina diminuindo o gasto energético (CAMPFIELD et al., 1998).

A mutação autossômica recessiva diabetes (*db*) ocorre no receptor da leptina no cromossomo 4 (COLEMAN, 1978), o qual é necessário para o funcionamento da rota metabólica mediada pela leptina (TARTAGLIA et al., 1995; CHUA et al., 1996). Dada a importância da leptina na homeostase energética, ambas as mutações (*ob* e *db*) resultam em uma redução no gasto energético e levam a DM e obesidade. Os camundongos *db/db*, embora apresentem um grau de obesidade na juventude semelhante aos *ob/ob*, exibem um fenótipo diabético mais severo com hiperglicemia e hiperfagia acentuadas (COLEMAN, 1978). Mesmo que as duas cepas exibam uma hiperinsulinemia significativa nos primeiros meses de vida (muito mais do que o visto nos modelos ambientais de resistência à insulina), o nível plasmático de insulina

elevado é sustentado nos camundongos *ob/ob*, mas transitória nos *db/db*.

Similarmente aos camundongos *db/db*, os ratos obesos Zucker possuem a mutação autossômica recessiva *fa* no receptor da leptina (BOULANGE et al., 1979), sendo modelo de obesidade. Os ratos Zucker, homozigotos para a mutação *fa* (conhecido com *fa/fa*) desenvolvem obesidade massiva depois do desmame, associada com hiperfagia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (BOULANGE et al., 1979). Diferente dos camundongos *db/db*, os ratos obesos Zucker não são diabéticos mas têm tolerância prejudicada à glicose, hiperglicemia branda, hiperinsulinemia pronunciada e uma redução acentuada na sensibilidade à insulina (TERRETTAZ & JEANRENAUD, 1983). Este é, portanto, um modelo largamente usado para testar a tolerância à glicose.

Os ratos obesos diabéticos Zucker apresentam a mesma mutação no receptor da leptina que os obesos Zucker, mas, além disso, eles têm um defeito nas células  $\beta$  pancreáticas, o que afeta a produção de insulina e progride para um estado de deficiência (GRIFFEN et al., 2001). Estes animais desenvolvem DM franco com hiperglicemia, poliúria e polidipsia severas, similarmente aos humanos (GRIFFEN et al., 2001; UPTON et al., 1998). Por isso, os ratos obesos diabéticos Zucker têm sido usados extensivamente para testar compostos antidiabéticos de baixo peso molecular (SREENAN et 1996; UPTON et al., 1998).

## 5.2 Estresse Oxidativo

Durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas existe uma produção constante de espécies reativas de oxigênio (EROs), acompanhada pela sua contínua inativação através da ação de antioxidantes, mantendo a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. Por outro lado, um aumento na produção destas espécies reativas ou uma diminuição das defesas antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo, que está relacionado com a etiologia ou progressão de uma grande variedade de doenças (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; MOSKOVITZ et al., 2002).

### 5.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

As principais EROs produzidas durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas são o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). O principal sítio de formação endógena do  $O_2^{\cdot-}$  parece estar localizado na cadeia respiratória mitocondrial, quando o oxigênio consumido não é reduzido de forma tetravalente até  $H_2O$ , através da ação da citocromo c oxidase mitocondrial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Em condições fisiológicas, cerca de 2% do oxigênio consumido leva à formação de  $O_2^{\cdot-}$ , proporcionalmente ao volume consumido a nível mitocondrial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O  $O_2^{\cdot-}$  ao receber mais um elétron forma o  $H_2O_2$ , processo conhecido como dismutação. Logo, qualquer sistema biológico que gere  $O_2^{\cdot-}$  também pode produzir  $H_2O_2$  pela dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , a não ser que todo o  $O_2^{\cdot-}$  seja interceptado por alguma outra molécula (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL, 1982). O  $H_2O_2$  também

pode ser formado diretamente pela redução divalente do oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL, 1982). Essa ERO é tóxica à maioria das células em concentrações entre 10 e 100  $\mu\text{M}$  e mistura-se facilmente com água, sendo muito difusível dentro e entre as células *in vivo* (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A produção intracelular do  $\text{HO}^\bullet$  a partir da reação do  $\text{O}_2^\bullet-$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reação de Haber-Weiss, postulada em 1934), ou da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com metais de transição como ferro e cobre (reação descrita por Fenton em 1894), tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e nocividade (HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Normalmente, os íons de ferro e de cobre estão impossibilitados de catalisarem reações oxidativas nos organismos vivos, pois estão ligados à transferrina ou à ceruloplasmina, respectivamente. No entanto, durante a injúria celular, o ferro pode ser liberado das proteínas e acelerar o processo de peroxidação pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos em radicais alcoxil e peroxil (HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986). Além disso, esses íons podem ser liberados das ligações com as proteínas após redução pela cisteína, ácido ascórbico ou  $\text{O}_2^\bullet-$ . Também, o  $\text{HO}^\bullet$  pode ser gerado nos sistemas biológicos por outras fontes como: ozônio, decomposição do ácido peroxinitroso, radiação ionizante e ultra-som (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A elevada reatividade do  $\text{HO}^\bullet$ , apesar de suas concentrações intracelulares extremamente baixas e seu reduzidíssimo tempo de vida-média, confere uma toxicidade elevada aos organismos aeróbios. Para atingir sua estabilidade, este radical transforma as moléculas circundantes em outros radicais, que, por sua vez, também precisam estabilizar-se. Neste processo, o  $\text{HO}^\bullet$  pode atacar os lipídios das membranas celulares, além de danificar proteínas e outras moléculas orgânicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

## 5.2.2 Mecanismos de Defesa Antioxidantes

HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) definem como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática. Assim, as EROs e outras espécies reativas são constantemente inativadas através de diferentes mecanismos, de forma a impedir reações posteriores de propagação.

De uma forma geral, conforme HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999), as defesas antioxidantas são constituídas por:

- a) Agentes enzimáticos que removem radicais livres e outras espécies reativas, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPX);
- b) Proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina que diminuem a eficácia de pró-oxidantes, como os íons de ferro e cobre;
- c) Agentes de baixo peso molecular que são *scavengers* (substâncias que neutralizam a ação de um radical livre ou espécie reativa), como carotenóides, bioflavonóides, indóis, catecóis, glutationa,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (vitamina A), bilirrubina, ácido ascórbico (vitamina C) e ácido úrico.

As enzimas SOD são específicas para a remoção do radical  $O_2^{\cdot-}$  (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As SOD que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD) estão presentes em quase todas as células eucarióticas. Nas células animais, a maior quantidade de CuZn-SOD está no citosol, mas pode estar presente nos peroxissomas, lisossomos, núcleo e no espaço entre as membranas interna e

externa da mitocôndria. Todas as CuZn-SOD aceleram a dismutação do superóxido. A SOD que contém manganês no seu sítio ativo (Mn-SOD) é encontrada em bactérias, plantas e animais. Na maioria dos tecidos animais e leveduras este tipo de SOD está localizado na mitocôndria. Um terceiro tipo de SOD contendo ferro (Fe-SOD) foi encontrado em bactérias, algas e plantas superiores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O peróxido de hidrogênio é removido geralmente por dois tipos de enzimas: a CAT, que catalisa diretamente a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a GPX, a qual remove o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para oxidar outros substratos. A atividade da CAT está localizada em grande quantidade nos peroxissomas. Uma pequena concentração de CAT também pode ser encontrada em mitocôndrias hepáticas, cloroplastos e retículo endoplasmático (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A família das GPX remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acoplando sua redução a água com a oxidação de glutationa reduzida (GSH). Também as enzimas GPX podem agir sobre outros peróxidos além do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elas contêm selênio no sítio ativo e estão vastamente distribuídas nos tecidos animais (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos pode-se destacar a vitamina C (ácido ascórbico) e a GSH. O ácido ascórbico tem demonstrado ser um eficiente neutralizador de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HO<sup>•</sup> e radical peroxil (<sup>•</sup>OOL) (ROSE, 1987). O ascorbato também age protegendo biomembranas contra a peroxidação, através da regeneração da atividade do  $\alpha$ -tocoferol (antioxidante não enzimático lipossolúvel) (ROSE, 1987).

A GSH, um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo tiol (-SH), é substrato para a GPX. Além desta função, a GSH está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ácido ascórbico, comunicação entre células e prevenção da oxidação de grupos -SH de proteínas (evitando pontes

intercadeias) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Em adição, a GSH pode quelar íons cobre e diminuir sua habilidade em gerar radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). *In vivo*, a maior parte da glutatona livre intracelular está na forma reduzida (GSH) e não na forma oxidada (GSSG). Contudo, uma parte pode ser encontrada como dissulfetos mistos com outros compostos que contêm grupos -SH, tais como cisteína, coenzima A e resíduos de cisteína de várias proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

### 5.2.3 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica (PL) é um processo natural de renovação das membranas celulares. A PL também é essencial para a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, assim como na fagocitose, pinocitose e lise das membranas intracelulares (MEERSON et al., 1982). Entretanto, o estresse oxidativo aumenta este processo e provoca dano severo nas membranas celulares.

Esta reação de oxidação pode ser iniciada diretamente pelo radical hidroxila, radical hidroperóxido e, possivelmente, pelo oxigênio singlete, mas não pelo radical superóxido ou peróxido de hidrogênio, os quais são menos reativos (SOUTHORN & POWIS, 1988). Com efeito, o processo de PL envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio, rearranjo das duplas ligações nos lipídios insaturados e a eventual destruição dos lipídios da membrana, produzindo uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres (BUEGE & AUST, 1978). Embora o radical livre inicial produza somente efeitos locais, os radicais posteriores e os produtos de degradação possuem efeitos biológicos distantes do local onde o primeiro foi produzido (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Dentre os produtos liberados está o malondialdeído ou dialdeído malônico, cuja quantificação têm sido utilizada para avaliar a extensão do dano oxidativo. Esta

quantificação pode ser feita pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), a qual tem sido usada como uma medida de PL (OHKAWA et al., 1979).

As membranas das células e das organelas são mais suscetíveis à PL, pois contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. De uma forma geral, a PL pode alterar as biomembranas através de mudanças no microambiente lipídico de enzimas ligadas à membrana e nos canais iônicos e receptores (ativando ou inibindo a atividade destas proteínas), da formação de novos canais de permeabilidade, da formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios (inativando-os irreversivelmente) e da oxidação dos grupos -SH nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, ocasionando perda de suas funções (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Dependendo do grau de severidade, a PL pode causar desde alterações na permeabilidade da membrana até perda da função secretória e morte celular (MEERSON et al., 1982).

#### **5.2.4 Estresse Oxidativo & Diabetes Mellitus**

A hiperglicemia de longa duração e a glicosilação de proteínas parecem ser os principais contribuintes para o estresse oxidativo evidenciado no DM (SATO et al., 1979; BROWNLEE et al., 1984; FU et al., 1992; ANSARI et al., 1996). A autoxidação da glicose é um bom exemplo de ligação entre hiperglicemia e estresse oxidativo. Nesse processo, compostos contendo uma estrutura de alfa-hidroxialdeído podem sofrer oxidação catalisada por metais de transição com geração de  $H_2O_2$ , radicais livres intermediários e cetaldeídos. Segundo WOLFF & DEAN (1987), o monossacarídeo se enolisa e sequencialmente reduz um metal de transição e oxigênio molecular gerando o  $O_2^{\bullet}$  e cetaldeído. A dismutação do  $O_2^{\bullet}$ , promovida pela enzima SOD, gera  $H_2O_2$ , o qual reoxida os metais de transição produzindo  $HO^{\bullet}$ .

A ligação entre a hiperglicemia e o estresse oxidativo, também pode ser mediada pela reação de Maillard (HUNT et al., 1988; BROWNLEE, 1994). A reação de Maillard ou reação de “browning” (escurecimento), iniciada por reações não enzimáticas da glicose ou outros açúcares redutores com proteínas, foi identificada pela primeira vez no início do século passado pela indústria alimentícia. A identificação da presença desse processo no meio biológico ficou evidente somente com a descoberta da hemoglobina glicada e seu aumento no DM. Nessa reação os monossacarídeos reagem com proteínas produzindo modificações estruturais e formação de novas espécies reativas (HUNT et al., 1988; BROWNLEE, 1994).

No início da reação de Maillard, a glicose reage com grupamentos aminas de proteínas formando uma base de Schiff em uma reação reversível. Esse intermediário instável sofre um rearranjo reversível para uma cetoamina, mais estável, também chamada de produto de Amadori. Os produtos de Amadori, após um período de meses, podem reagir com grupamentos aminas de outras proteínas e formar ligações cruzadas irreversíveis como de condensação,  $\beta$  eliminação ou hidratação e, portanto, alterar a estrutura e a função dessas moléculas. Estas reações resultam na formação de produtos irreversíveis, chamados de Produtos Terminais de Glicosilação Avançada (PTGAs) (“Advanced Glycation End Products”), (VLASSARA et al., 1994; BIERHAUS et al., 1998; MOHAMED et al., 1999).

Os PTGAs formam-se lentamente em pessoas normoglicêmicas; entretanto, quando os níveis de glicose aumentam, a formação ocorre mais rapidamente. Assim, em pacientes diabéticos e em modelos animais de DM, essas reações não enzimáticas são aceleradas e, juntamente com a taxa de renovação aumentada de proteínas e lipídeos, causam um aumento da glicosilação e acúmulo de PTGAs em proteínas estruturais de vida longa como o colágeno, fibronectina, tubulina, mielina, actina, hemoglobina, albumina, lipoproteínas e outras (VLASSARA et al., 1994).

Além disso, como o acúmulo dos PTGAs é irreversível, mesmo com o controle do DM e a normalização da glicemia estes produtos continuarão acumulados nas proteínas alvos. Logo, quanto maior a glicemia, o tempo de DM e o descontrole metabólico, maior a produção de PTGAs e maiores serão os danos às proteínas (VLASSARA et al., 1994).

Vários tipos de células como endoteliais, mesangiais, neuronais, além de monócitos/macrófagos, expressam em sua superfície receptores para os PTGAs (BROWNLEE et al., 1988; VLASSARA et al., 1989). A ligação dos PTGAs com seus receptores pode levar a prejuízos no funcionamento celular, culminando nos problemas angiopatológicos existente no DM (MITSUHASHI et al., 1993).

Portanto, a glicose pode ligar-se a proteínas nos meios biológicos, formando PTGAs através da reação de Maillard ou pode ainda sofrer autoxidação. Ambos os processos culminam com a produção de radicais livres e posterior depleção de antioxidantes endógenos levando ao surgimento do estresse oxidativo. A partir do momento em que esses processos acontecem surgem lesões teciduais devido aos danos moleculares promovidos pelo estresse oxidativo e glicosilação. Com o passar do tempo de DM, os pacientes acumulam PTGAs e desenvolvem um envelhecimento vascular generalizado caracterizado principalmente por nefropatia, retinopatia, neuropatia além de complicações vasculares generalizadas (MOHAMED et al., 1999).

### **5.2.5 Estresse Oxidativo & Envelhecimento**

COMMONER et al. (1954) publicaram a primeira evidência direta de que os radicais livres eram produzidos dentro das células vivas e que os níveis destes eram mais altos nos tecidos metabolicamente mais ativos. Subsequentemente, HARMAN juntou suas evidências experimentais com estudos sobre os danos causados pela

radiação pós-Hiroshima (HEMPPELMANN & HOFFMAN, 1953), os achados de Fenton (FENTON, 1894) e teorias contemporâneas, que propunham mecanismos para a oxidação de compostos orgânicos e dismutação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por sais ferrosos (URI, 1952); e publicou a teoria do envelhecimento pelos radicais livres (Free Radical Theory of Aging) (HARMAN, 1956).

HARMAN (1956) propôs que o ferro e outros metais fisiológicos poderiam gerar radicais livres, que seriam formados nas células pela química de Haber–Weiss como um subproduto de reações de redução/oxidação normais. Esses radicais livres poderiam danificar estruturas contíguas incluindo o DNA, os quais poderiam, por sua vez, causar mutações. Ele também predisse que a administração de compostos que pudesse ser facilmente oxidados, como a cisteína, poderia diminuir a velocidade do processo de envelhecimento.

No decorrer das últimas décadas, tornou-se aparente que muitas EROs, como os peróxidos, que não são radicais livres, também desempenham um papel importante no dano oxidativo. Desta forma, a teoria do envelhecimento pelos radicais livres (Free Radical Theory of Aging) foi modificada para teoria do envelhecimento pelo estresse oxidativo (Oxidative Stress Theory of Aging).

As proteínas são os principais componentes dos sistemas biológicos, desempenhando papéis importantes em uma grande variedade de funções celulares. Logo, um aumento no dano oxidativo a estas moléculas relacionado à idade poderia ser fisiologicamente importante para os organismos. A importância fisiológica do dano oxidativo às proteínas foi reconhecida a aproximadamente 20 anos atrás, quando Levine demonstrou a modificação oxidativa de um dos resíduos de histidina da enzima glutamina sintetase com a formação de um grupo carbonila na enzima inativada (LEVINE, 1983). Subsequentemente, OLIVER et al. (1987) demonstraram que as carbonilas presentes nas proteínas aumentavam depois dos

60 anos de idade em culturas de fibroblastos originários de seres humanos saudáveis.

Posteriormente, STADTMAN et al. (1988) propuseram que a oxidação de proteínas era importante no desenvolvimento de várias doenças e no processo de envelhecimento. De fato, esse grupo de pesquisadores têm demonstrado que as proteínas oxidadas (grupos carbonilas) aumentam com a idade em fígado de rato, fibroblastos humanos e retinas humanas (STADTMAN, 1988; OLIVER et al., 1987; STADTMAN, 1992; SMITH et al., 1996). Mais recentemente, MOSKOVITZ et al. (2002) reportaram que o nível global de carbonilas em tecidos humanos (fibroblastos, retinas e cérebro) aumenta como uma função da idade. Além disso, a quantidade global de carbonilas no músculo esquelético de macacos Rhesus (ZAINAL et al., 2000) e o nível de carbonilas em proteínas mitocondriais de insetos (SOHAL & DUBEY, 1994) também aumentam com a idade.

Atualmente, a modificação induzida na estrutura das proteínas mais estudada é a formação de derivados de carbonilas em resíduos de lisina, arginina, prolina, histidina, cisteína e treonina (STADTMAN, 1988). Quase todos os aminoácidos presentes nas proteínas são alvos em potencial para a oxidação (HUGGINS et al., 1993), no entanto, destacam-se os resíduos de metionina e cisteína que são extremamente sensíveis a danos oxidativos (PADGETT & WHORTON, 1997; THOMAS & MALLIS, 2001).

### **5.3 A Enzima Delta-Aminolevulinato Desidratase**







ffbfffffbFFFFFB

fffffbfFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBF

9210129402029400009900009700009700009b00009c00009600009500009e0002

c06d6ef5fbfdfdf9fffff8fffffbfffffaffffffaffffffaffaffff3dee190

2026e4c8c6f6f9fcf5dce2921316a43b3efcf4f6fbf8fedaa8a89b3133fbffffaf9fefbf9ff

ff<sub>f</sub>fffffbfed8b1b29700009500009800009900009400009400

fffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbff

ffffbfffffbffff

fffffbfffffbffff

ffff7ffff7fafdf9

febfb7b7b??502039101009b0000960001a000009e00009900009a00009900009300

00970201a31f23eac4c8fef8fcfbfbef8fbfef8fbfffffafffffafffeaff

fdf7fbb5656ab96d70fbfaf9fff6ffb15a5c890607ebc7c8fcf9fdf6ecee952c2dd9b2b3fef  
7fefbfaffffefbfeffffaffd7b0b09700009500009800009??00009a





9500009b01019b0307d5a2a4fbff9bfef9fffffbfffffbffffbfFFFBFFFFFBFFFFFBFFFFFBFFFFFB

**fbffFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFF**

fbffff

**fbfffffbfffffb**

ffbfffffbfffffb

fffffbfdfcfbff

ffff8fff9fafcd6a4a79304??59202029800019a00009500009600008f01009100009c01

04910205932427e3c1c0f4eceab963688d1d1fdbaeaefff6f8f8fbfbfb







ffffbfffffbfffcfbfefff9fffff9fdbb71749402029b000096000097000096000096000095000  
0960305ae4d50f4e1e2fef8fdfef9fffffbfffdffbfffff9feff  
f9fefdf2f6c98a8a8d161bca8b8efaf5f6fdf7fdfefbfffffbfffff9fbaf6c6db56c6bcf8f9f8f6f  
db450548b0d09e7caccfef7fff7f1f59d343ad4a5a2fff7













fbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbff00ffffbfffffbffff

bfffffbfffffbfffffbfffffbffff

fffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbffffef8fde3c8c69308099600009600009d00

019f01038c0e11c89596fdf6f7fef8fcffff9fffdffafff9fbff  
fafbfffebfbbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffafff9f7fbf<sub>df</sub>9f9e3b9bb851f1fa75b5bf7eaecfaf  
8fcf8e3eb8c1e22e5c3c6fcfafef0d2d48b  
0f0fa74c4cf5f??fff7fee9c9cb8d1e22f2dfe3d5afb19800019a0100891417f1d9defdf  
8ffffcfafffbfbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffb



bfffffbfffffbff



ffffbfffffbffff

fbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbffafbb768699600019500009700029601028e

1415d8a7a8fef7f7fbf8fdfbf9fefefafffff9

ffffdfafffafbfffefbffffdfbfffffbfffffafffffbfffffbfffffbfffffbfffff8fffff8ffffaf9fefef9fbe9c5c6  
8d272ba14c4cf8e5e4fef8fdb96d6eb56669fdf9fa  
ffff6f7a64e4d930c0eebcfd1fdf8fefef7f7a04548ca8c92d7b1af970001990001ab595ef  
ef7fafcfafefbfbdffffbfefbfbffcfbbffffbfffffbfffffbfffff  
fbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbffff

fbfffffbfffffb



**fbfdffffafefffbfefffafeffffbfdffffbfefffbfdffffbfefdfbfefdfbf**  
**fdffffffffdf9feffff9fdffffafdf7fc**  
edcbcc9d2e33a24343f2ddd7ebc8c5931c  
21f2e2e2fefafad9a6a8930406c27e80faf9fdfffffcfd6a5a7983236d5a5a29001009307

09e2bec0fbfbfdfdfbfbfeffffafefcfbffffdfbfffffbfffffbff

**ffffbfffffbfffffbfffffbfffffbfffffbffffbfFFFFBFFFFFB**

FFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFFBFFFFFbfffffbfffffbffff



1615970202d19597fcfafbffffafefffbbfffffbfffffbffff



**fffffbfffffbff00ffffb**

fffffbffffbffffbffffbffffbffffbffffbffffBFFFFBF

FFFFBFFFFFBFFFFBFFFFBFFFFBFFFFBFFFFBFFFFBFFF**ff****bff**





**bfffffbfffffbffff**

**9fbfffeffbfffdf7f89d555b8d0d13820d11850e13860D107E0E**

107F0E10810D10810D10810D10840D10830D10820D10830D10820D10830D108



fbfffffbfffffb



bfffffbfffffbffff  
fffffbfffffbffff  
ffffbfffffbffff  
ffbfffffbffff  
fbfffffbffff  
bfffffbffff  
fffffbffff  
ffffbffff  
ffbffff  
fbffff  
bffff  
ffff  
fff  
ff  
f

**fbfffffbfffffafffefafff9fbfffffafffafbffefbffefafefff9fff7fbfffcf6fefff7fefcf8fffcfaf9bd6c6b93**  
**fbfffffbfffffafffefafff9fbfffffafffafbffefbffefafefff9fff7fbfffcf6fefff7fefcf8fffcfaf9bd6c6b930**  
**bfffffbfffffafffefafff9fbfffffafffafbffefbffefafefff9fff7fbfffcf6fefff7fefcf8fffcfaf9bd6c6b9303**  
**fffffbfffffafffefafff9fbfffffafffafbffefbffefafefff9fff7fbfffcf6fefff7fefcf8fffcfaf9bd6c6b93030**  
**ffffbfffffafffefafff9fbfffffafffafbffefbffefafefff9fff7fbfffcf6fefff7fefcf8fffcfaf9bd6c6b930309**  
**ffbfffffafffefafff9fbfffffafffafbffefbffefafefff9fff7fbfffcf6fefff7fefcf8fffcfaf9bd6c6b930309e**

**0309e0b8bafefafefcf9fcfcfafefdfa**



fbfffffbfffffb

**5f7aa3b3b871215efdfe2**







ffbff











**fbfffffbfffffbffff**

**f/fbfffffbffff**



**ffbfffffbfffffb**











9db901514a63e40fef5f8ff









Another interesting point of the present study is that the oxidative stress, as determined by TBARS levels, increased in brain and kidney of both glucose- and sucrose-fed mice as compared with the levels found in control animals. Chronic elevation of plasma glucose causes many of the major complications of diabetes, including nephropathy, retinopathy, neuropathy, and macro- and micro-vascular damage [13]. Hyperglycemia itself can cause excessive liberation of ROS by mitochondria altering several key cellular properties, including nuclear translocation of the transcription factor NF- $\kappa$ B, and activation of protein kinase C [46]. Besides, in hyperglycemic circumstances the glucose auto-oxidation is believed to be an important source of free radicals [47]. ROS formed over the detoxifying capacity of cells could cause oxidative damage to membrane lipid (principally unsaturated fatty acids) in the cells [**Figure 4**] [48].

We observed a widespread inhibition of the  $\delta$ -ALA-D activity (blood, brain,

kidney, and spleen) in both HG- and HS-fed mice. The molecular mechanism underlying  $\delta$ -ALA-D impairment in diabetes is still not completely understood, but may be caused either by glycation of the active site lysine residue involved in Schiff's base formation with the first  $\delta$ -ALA molecule or oxidation of essential reduced cysteinyl residues of the enzyme [11, 12, 32]. Over production of free radicals, whose formation was confirmed by an increase in TBARS production, could be contributing to the formation of adducts between the aldehyde group of glucose and the amino group of lysine in  $\delta$ -ALA-D [**Figure 4**]. In accordance with this, early we found a significant negative correlation between the blood glycated hemoglobin percent and  $\delta$ -ALA-D activity for hepatic, renal, and cerebral tissues [12]. Importantly, this correlation suggests that glycated plasma proteins measurement could be used as a good predictor of intracellular glycation.

$\delta$ -ALA-D inactivation could result not only from Schiff's base formation, but also from the side effects of glucose auto-oxidation involving the formation of free radicals, which might, in turn, indirectly act on the enzyme activity [**Figure 4**]. In fact, because its sulfhydryllic nature, this enzyme can be inhibited by a number of have metals and nonmetals, which have the chemical property of oxidize –SH groups [29-31]. DTT, which acts by reducing disulfide bonds, abolished the inhibitory effect of diets on  $\delta$ -ALA-D activity in blood, brain, and spleen, suggesting that oxidation of essential reduced cysteinyl residues of the enzyme could be occurring. Moreover, the reactivation index for  $\delta$ -ALA-D activity in blood, brain, kidney, and liver of glucose and sucrose groups was significantly elevated in relation to control, indicating that enzyme was exposed to a more oxidative environment.

Control, HG, and HS groups had a reduced  $\delta$ -ALA-D activity (kidney and spleen) and increased TBARS levels (kidney, liver) in relation to young mice Also,

there was a greater reactivation index for  $\delta$ -ALA-D (blood, kidney, and spleen) in these groups as compared to young mice, indicating an oxidation of essential cysteinyl residues of this enzyme. Both glycation and oxidation are spontaneous chemical reactions also implicated in the cumulative modification of macromolecules during aging [Figure 4]. In fact, has been suggested that the basic aging process might be mediated by the Maillard reaction [33, 35].

Short-lived molecules such as those from plasma are expected to be influenced primarily by the early glycation products, whereas long-lasting molecules such as collagen, lens crystalline, myelin and DNA are expected to be altered as they irreversibly accumulate AGE [49]. Thus, the Maillard reaction is a type of post-translational modification of molecules that takes place slowly and continuously throughout the life span and contributes to the development of normal aging or to some complications of diabetes, such as cataract formation, vascular narrowing and stiffening of collagen [49-50]. Such accumulation of oxidative damage has been hypothesized to be a primary causal factor in the senescence-associated attenuation of various physiological proteins functions [Figure 4].

Deficiency in antioxidant defense is constantly associated with oxidative product accumulation and inversely correlates with the concentration of protein sulphhydryls [51]. Because aging is associated with decreased glutathione concentration [34], protection of protein sulphhydryls is probably compromised, as organisms age. In fact, methionine and cysteine residues are extremely sensitive to oxidative damage [51]. Furthermore, oxidative stress induces the formation of carbonyl derivatives on lysine, arginine, proline, histidine, cysteine, and threonine residues [52]. For instance, investigators have shown an age-related increase in oxidative damage to specific proteins, e.g., glucose-6-phosphate dehydrogenase [53], acotinase [54], and  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase [55].

In addition to oxidative modification of δ-ALA-D related to oxidative stress, the inhibition of this enzyme could be leading to an accumulation of substrate [Figure 4]. In fact, acute porphyrias are biochemically characterized by an enzymatic defect in the heme biosynthetic pathway, leading to an increase of porphyrin precursors such as δ-ALA and porphobilinogen in the blood, urine and in several tissues including the brain [56]. Accumulation of δ-ALA, which results from δ-ALA-D inhibition by Pb<sup>2+</sup> or other agents, can have hepatic and neurotoxic effects [56] and part of these effects results from the overproduction of reactive oxygen species [57-59]. δ-ALA undergoes enolization and further metal-catalyzed aerobic oxidation at physiological pH to yield superoxide radical, hydrogen peroxide and hydroxyl radical [60]. Therefore, accumulation of δ-ALA might endogenously enhance ROS levels leading to oxidative stress [Figure 4].

Alterations in δ-ALA-D activity and oxidative stress have been focused in this work, in an attempt to better understand the mechanisms for the pathogenesis of some of the complications in obesity, diabetes, and aging. In general, the pro-oxidizing shift of δ-ALA-D associated to age observed in various organs of the mice can be interpreted to reflect a widening of the imbalance between antioxidants and pro-oxidants during the aging process, as observed from elevated TBARS levels. We argue that δ-ALA-D activity alterations found in this work stated this enzyme, such as hemoglobin, albumin, and collagen, as a potential target for screening the physiologic or pathologic protein oxidations caused by both diabetes and aging [Figure 4].

**ACKNOWLEDGEMENTS:** The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

1. King H, Aubert RE, Herman WH: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431, 1998.
2. Reaven GM: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607, 1988.
3. Kahn BB: Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J. Nutr.* 124:1289S-1295S, 1994.
4. Storlien LH, Higgins JA, Thomas TC, Brown MA, Wang HQ, Huang XF, Else PL: Diet composition and insulin action in animal models. *British J. Nutr.* 83:S85-S90, 2000.
5. Storlien LH, Kraegen EW, Jenkins AB, Chisholm DJ: Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *Am. J. Clin. Nut.* 47:420-427, 1988.
6. Storlien LH, James DE, Burleigh KM, Crisholm DJ, Kraegen EW: Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* 251: E576-E583, 1986.
7. Higgins, J. A., Miller, J. C. B. & Denyer, G. S. (1996) Development of insulin resistance in rats is dependent on the rate of glucose absorption from diet. *J. Nutr.* 126: 596-602.
8. Hansen, PA, Dong HH, Marshall BA, Nolte LA, Chen MM, Mueckler M, Holloszy JO: A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle: Functional evaluation of potential mechanisms. *J. Biol. Chem.* 273:26157-26163, 1998.
9. Busserolles J, Rock E, Gueux E, Mazur A, Grolier P, Rayssiguier Y: Short-term consumption of a high sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats. *Br. J. Nutr.*

87:337–342, 2002.

10. Busserolles J, Zimowska W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A: Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression. *Life Sci.* 71:1303–1312, 2002.
11. Folmer V, Soares JCM, Rocha JBT: Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:1279-1285, 2002.
12. Folmer V, Soares JC, Gabriel D, Rocha JB: A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J. Nutr.* 133:2165-2170, 2003.
13. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L: The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association, and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17:189–212, 2001.
14. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman, EL: Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr. Rev.* 25:612-628, 2004.
15. Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z: The role of macroautophagy in the ageing process, anti-ageing intervention and age-associated diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:2392-2404, 2004.
16. Wiernsperger NF: Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Met.* 29:579-585, 2003.
17. Brownlee M, Cerami A: The biochemistry of the complications of *diabetes mellitus*. *Annu. Rev. Med.* 50:385-432, 1981.
18. Collier A, Wilson R, Bradley H: Free radical activity in type 2 diabetes. *Diab. Med.* 7:27-30, 1990.

19. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB III: Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17:24-38, 2003.
20. Schwartz JG: The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diab. Rev.* 3:269-287, 1995.
21. Day JF, Thorpe SR, Baynes JW: Non-enzymatically glycosylated albumin. *J. Biol. Chem.* 254:595-597, 1979.
22. Fu MX, Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW: Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes* 41:42-48, 1992.
23. Bitar M, Weiner M: Diabetes-induced metabolic alterations in heme synthesis and degradation and various heme-containing enzymes in female rats. *Diabetes* 33: 37-44, 1984.
24. Caballero F, Gerez E, Polo C, Mompo O, Vazquez E, Schultz R, Bernabo J, Batlle A: Alteraciones en el camino metabolico del hemo en pacientes diabeticos. *Medicina* 55:117-124, 1995.
25. Fernández-Cuartero B, Rebollar JL, Batlle A, Salamanca RE: Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:479-488, 1999.
26. Caballero F, Gerez E, Batlle A, Vazquez E: Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. *Chem. Biol. Interact.* 126:215-225, 2000.
27. Polo CF, Vázquez ES, Gerez EN, Caballero FA, Batlle AMC: STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and  $\alpha$ -tocopherol. *Chem. Biol. Interact.* 95:327-334, 1995.
28. Sassa S: ALAD Porphyria. *Sem. Liver Dis.* 18:95-101, 1998.

29. Barbosa NBV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC, Braga AL: Effect of organic forms of selenium on  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149: 243-253, 1998.
30. Farina M, Folmer V, Bolzan RC, Andrade LH, Zeni G, Braga AL, Rocha JBT: Selenoxides inhibit  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicol. Lett.* 119: 27-37, 2001.
31. Soares JCM, Folmer V, Rocha JBT: Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. *Nutrition* 19:627-632, 2003.
32. Caballero FA, Gerez EN, Polo CF, Vazquez ES, Batlle AMC: Reducing sugars trigger  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inactivation: evidence of *in vitro* aspirin prevention. *Gen. Pharmacol.* 31:441-445, 1998.
33. Brownlee M: Advanced protein glycosylation in diabetes and aging: *Annu. Rev. Med.* 46:223-234, 1994.
34. Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS: Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Rad. Biol. Med.* 35:626-635, 2003.
35. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP: Hydroxil radical production and autoxidative glycosilation, Glucose oxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. *Biochem. J.* 256:205-212, 1988.
36. Sassa S: Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28:133-145, 1982.
37. Berlin A, Schaller KH: European standardized method for the determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity in blood. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*

- 389–390, 1974.
38. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358, 1979.
39. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
40. National Institutes of Health: The third report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication 01-3670, 2001. Bethesda, MD: National Institutes of Health.
41. Hansen BC: The metabolic syndrome X. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 892:1–24, 1999.
42. Axen KV, Dikeakos A, Sclafani A: High dietary fat promotes syndrome X in nonobese rats. *J. Nutr.* 133:2244-2249, 2003.
43. Björntorp P: Abdominal fat distribution and disease: an overview of epidemiologic data. *Ann. Med.* 24:15-18, 1992.
44. Kim J-Y, Nolte LA, Hansen PA, Han D-H, Ferguson K, Thompson PA, Holloszy JO: High-fat diet-induced muscle insulin resistance: relationship to visceral fat mass. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279:R2057-R2065, 2000.
45. Kisseebah AH: Insulin resistance in visceral obesity. *Int. J. Obes.* 15:109-115, 1991.
46. Nishikawa T, Edelstein D, Du X-L, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek M, Beebe D, Oates P, Hammes H-P, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature* 404:787–790, 2000.
47. Wolff SP, Dean RT: Glucose autoxidation and protein modification - The potential

- role of 'autoxidative glycosilation' in diabetes. *Biochem. J.* 245:243-250, 1987.
48. Jain SK: Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 937:205-210, 1988.
49. Vlassara H, Bucala R, Striker L: Biology of disease. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Investig.* 70:138-151, 1994.
50. Monnier VM, Sell DR, Abdul-Karim FW, Emancipator SN: Collagen browning and cross-linking are increased in chronic experimental hyperglycemia relevance to diabetic and aging. *Diabetes* 37:867-872, 1988.
51. Thomas JA, Mallis RJ: Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls, *Exp. Gerontol.* 36:1519–1526, 2001.
52. Stadtman ER, Levine RL: Protein oxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899:191–208, 2002.
53. Agarwal S, Sohal RS: Relationship between aging and susceptibility to protein oxidative damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:1203–1206, 1993.
54. Das N, Levine RL, Orr WC, Sohal RS: Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 360:209–216, 2001.
55. Chakraborty H, Sen P, Sur A, Chatterjee U, Chakrabarti S: Age-related oxidative inactivation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp. Gerontol.* 38:705–710, 2003.
56. Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y: The porphyrias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds.), *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, 7th Edition. McGraw Hill, New York, p. 2103–2160, 1995.
57. Bechara EJH, Medeiros MHG, Monteiro HP, Hermes-Lima M, Pereira B, Demasi M, Costa CA, Adballa DSP, Onuki J, Wendel CMA, Nasci PD: A free radical

- hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Química Nova* 16:385-392, 1993.
58. Monteiro HP, Bechara EJH, Abdalla DSP: Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. *Mol. Cell. Biochem.* 103:73-83, 1991.
59. Hermes-Lima M, Valle VGR, Vercesi AE, Bechara EJH: Damage to rat mitochondria promoted by  $\delta$ -aminolevulinic acid generated oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. *Biochim. Biophys. Acta*. 1056:57-63, 1991.
60. Onuki J, Teixeira PC, Medeiros MH, Dornemann D, Douki T, Cadet J, Di Mascio P. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? *Cell. Mol. Biol.* 48:17-26, 2002.

**TABLE 1**

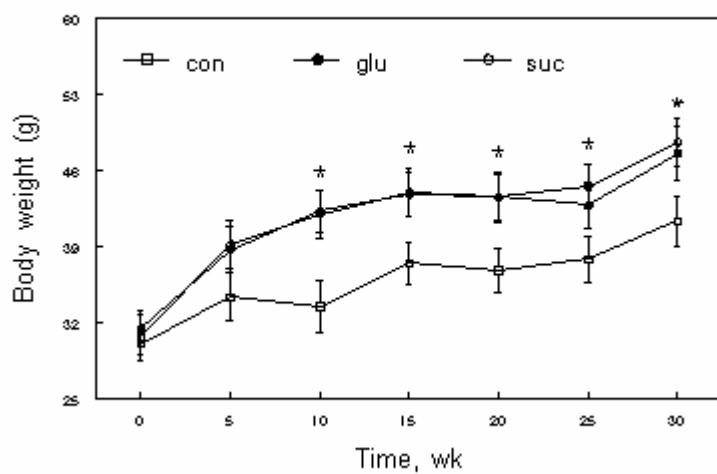
$\delta$ -ALA-D activity reactivation index in blood, brain, liver, kidney, and spleen <sup>a</sup>

Tissues	Groups			
	Young	Control	Glucose	Sucrose
Blood	14.32 ± 6.4	99.76 ± 26.3 <sup>#</sup>	175.48 ± 47.2 **#	190.01 ± 25.8 **#
Brain	23.85 ± 4.7	16.69 ± 7.2	82.77 ± 20.5 **#	82.42 ± 10.9 **#
Kidney	80.44 ± 13.4	297.12 ± 33.9 <sup>#</sup>	1,117.5 ± 92.2 **#	354.25 ± 57.4 **#
Liver	41.73 ± 2.4	69.55 ± 11.1 <sup>#</sup>	92.94 ± 20.4 **#	102.24 ± 14.5 **#
Spleen	28.23 ± 1.8	81.68 ± 10.4 <sup>#</sup>	112.3 ± 11.9 <sup>#</sup>	131.94 ± 20.9 <sup>#</sup>

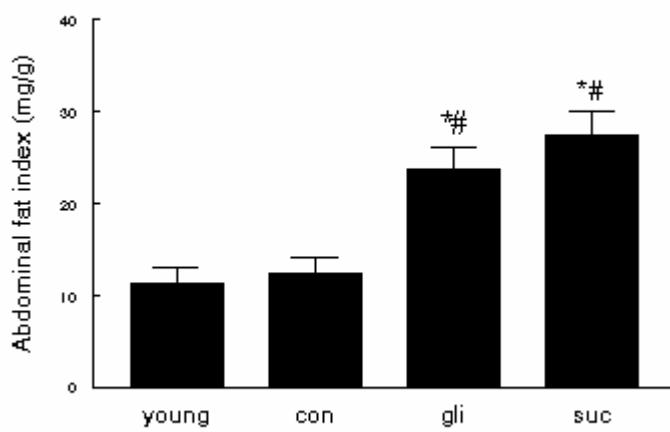
<sup>a</sup> This index indicates the extent of the reactivation of  $\delta$ -ALA-D activity by DTT and is defined as:  $(\delta\text{-ALA-D activity with DTT} - \delta\text{-ALA-D activity without DTT}) \times 100$   
 $\delta\text{-ALA-D activity with DTT}$ .

Data are presented as percentage of basal  $\delta$ -ALA-D activity, means ± SEM, n= 5-9. \*

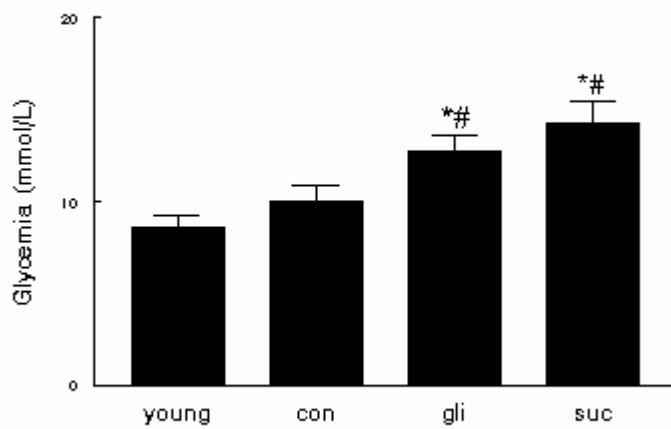
P < 0.05 vs. control group, <sup>#</sup> P < 0.05 vs. young group.



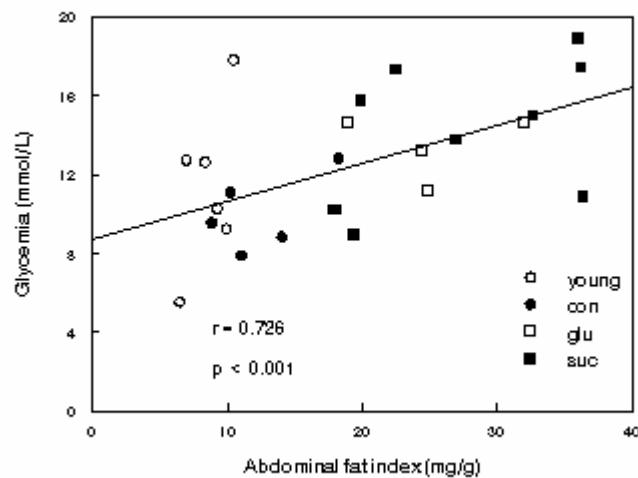
**Figure 1A.** Weight gain in mice fed experimental diets for 30 weeks. Results are expressed as mean  $\pm$  SD for 10 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group.



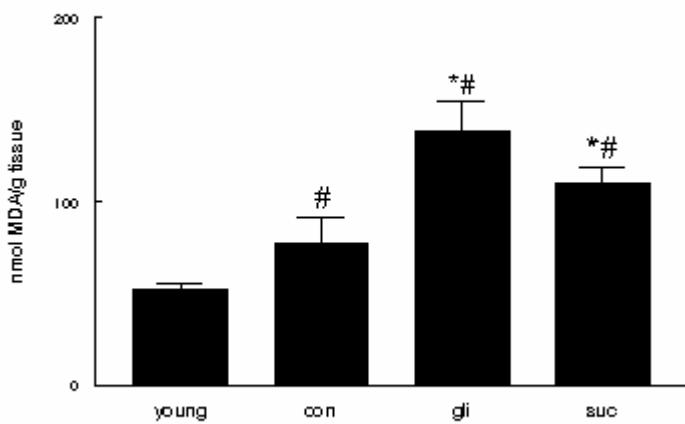
**Figure 1B.** Abdominal fat index (abdominal fat content / body weight ratio, mg/g), data are expressed as mean  $\pm$  SEM,  $n = 5-9$ . \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



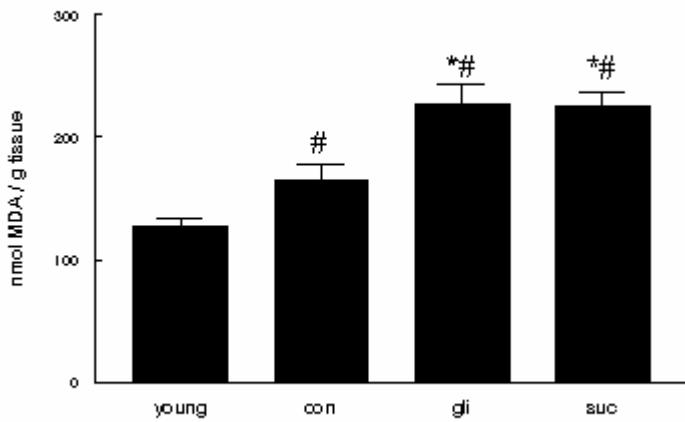
**Figure 1C.** Plasma glucose levels after 12 hours of fasting (mean  $\pm$  SEM, n = 5-9). \* P < 0.05 vs. control group; # P < 0.05 vs. young group.



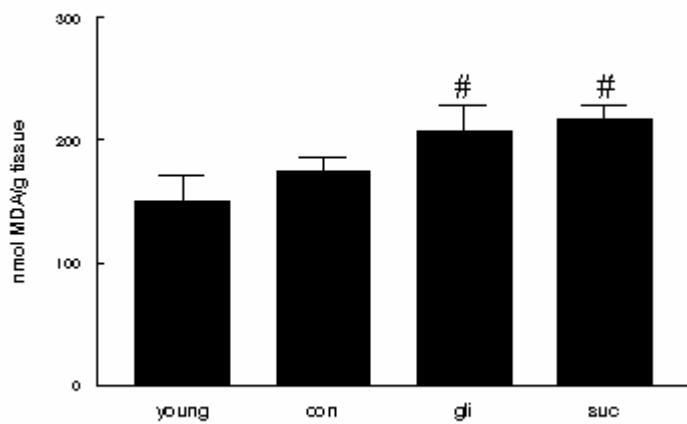
**Figure 1D.** Correlation between abdominal fat index and serum glucose content (n = 5-9).



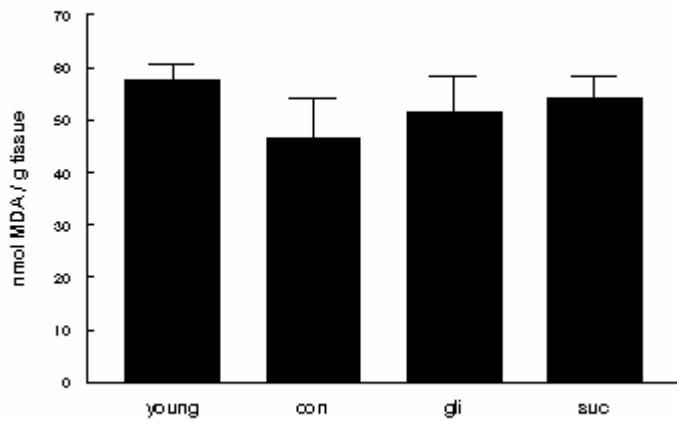
**Figure 2A.** TBARS content in brain. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



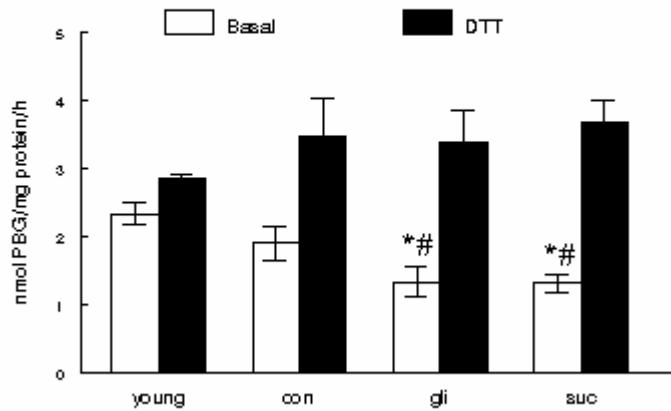
**Figure 2B.** TBARS content in kidney. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



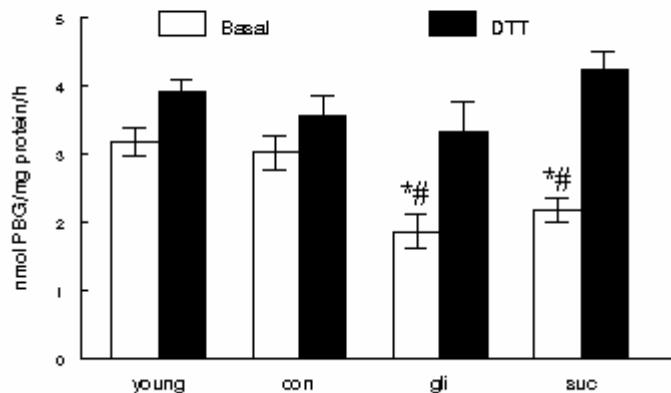
**Figure 2C.** TBARS content in liver. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \* P < 0.05 vs. young group.



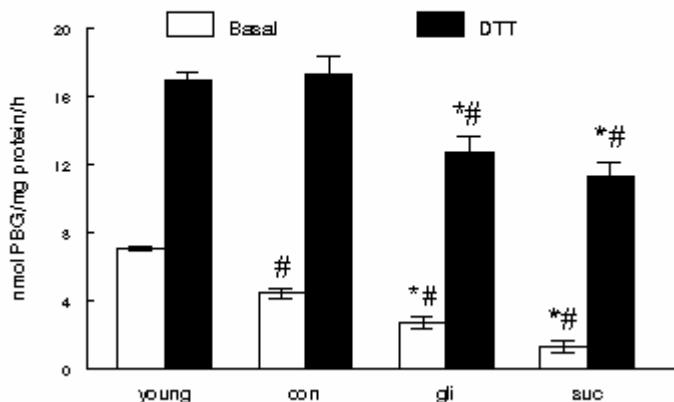
**Figure 2D.** TBARS content in spleen. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group.



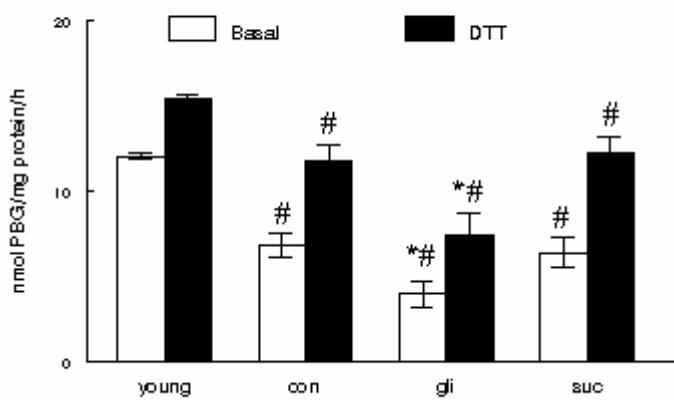
**Figure 3A.**  $\delta$ -ALA-D activity in blood in the absence or the presence of DTT (2 mmol/L). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



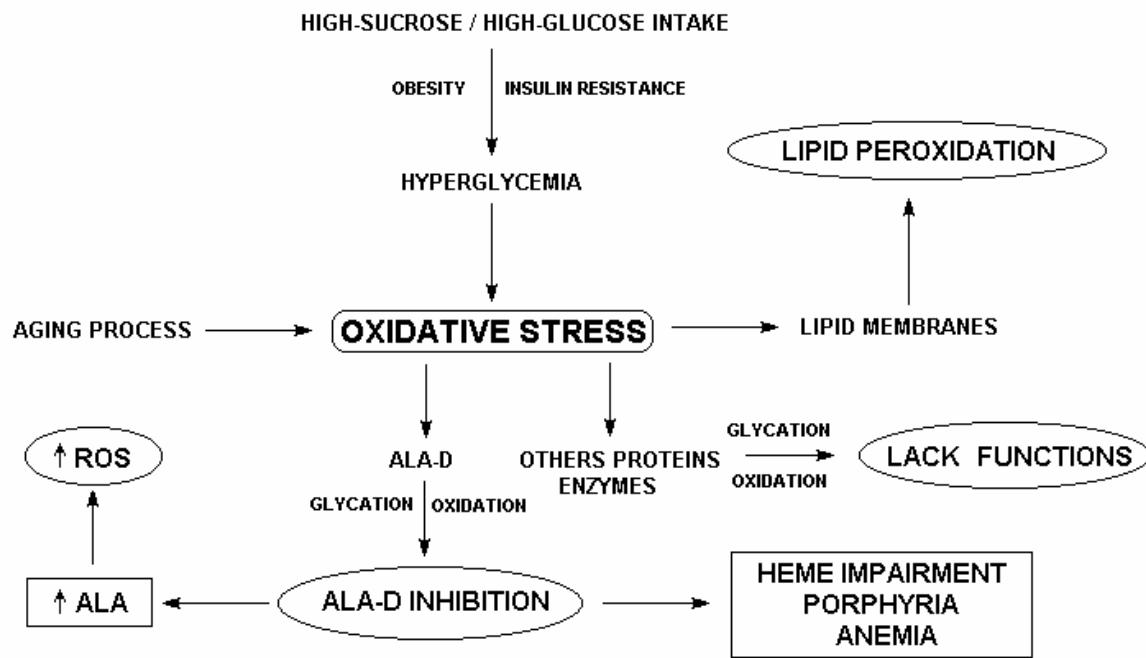
**Figure 3B.**  $\delta$ -ALA-D activity in brain in the absence or the presence of DTT (2 mmol/L). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



**Figure 3C.**  $\delta$ -ALA-D activity in kidney in the absence or the presence of DTT (2 mmol/L). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



**Figure 3D.**  $\delta$ -ALA-D activity in spleen in the absence or the presence of DTT (2 mmol/L). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM for 5-9 animals per group. \*  $P < 0.05$  vs. control group; #  $P < 0.05$  vs. young group.



**Figure 4.** High-glucose and high-sucrose intake, such as the aging process, lead to oxidative stress, occasioning lipid peroxidation and  $\delta$ -ALA-D inhibition.

## 8 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De uma forma geral, nossos modelos crônicos de resistência à insulina, através da ingestão de dietas com alto teor de carboidratos ou lipídios, comprovaram ser eficazes em elevar os níveis sanguíneos de glicose em camundongos (**Artigos 1, 2, 4**). Estes achados estão de acordo com os resultados encontrados por vários autores que trabalharam com diferentes protocolos, usando roedores como modelo animal (STORLIEN et al., 1986; BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996; HANSEN et al., 1998; STORLIEN et al., 2000). Além disso, a elevação da glicemia esteve relacionada a algum grau de aumento na PL e inibição da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D em vários tecidos analisados nos três trabalhos (**Artigos 1, 2, 4**).

O mecanismo exato pelo qual a elevação da glicemia leva à PL em diabéticos ainda não está bem claro. Porém, relatos da literatura evidenciam que a promoção do estresse oxidativo está ligada, fundamentalmente, à elevada concentração de glicose e suas possíveis reações no organismo (WOLFF & DEAN, 1987; HUNT et al., 1988). De uma forma geral, a glicação não-enzimática de proteínas e a auto-oxidação da glicose têm sido postuladas como explicações possíveis para a relação entre hiperglicemia e PL.

Com relação à glicação não-enzimática de proteínas, existem várias evidências de que a glicose é capaz de ligar-se a proteínas e que esse processo pode levar a um aumento na produção de radicais livres (VLASSARA et al., 1994; MOHAMED et al., 1999). De fato, esse processo é capaz de gerar radicais e oxidantes altamente reativos a partir das proteínas glicadas mesmo sob condições fisiológicas (DAY et al., 1979; FU et al., 1992; CARUBELLI et al., 1994; SCHWARTZ, 1995).

A glicose também pode sofrer auto-oxidação formando cetaldeídos e  $O_2^{\bullet-}$ , os

quais sofrem uma série de reações químicas produzindo HO<sup>•</sup> e radicais centrados no carbono (WOLFF & DEAN, 1987; HUNT et al., 1988). Esses radicais depletam os antioxidantes endógenos e, posteriormente, atacam proteínas e elementos celulares provocando dano aos tecidos (WOLFF & DEAN, 1987; HUNT et al., 1988; MOHAMED et al., 1999).

Desta forma, a glicação não-enzimática de proteínas e a auto-oxidação da glicose podem levar a um aumento na produção de EROs, estabelecendo a relação entre hiperglicemia e PL. A formação de EROs além da capacidade de neutralização das células poderia causar o dano oxidativo aos lipídios das membranas (principalmente os ácidos graxos poliinsaturados) nas células (JAIN, 1998), o que já foi demonstrado em estudos com eritrócitos *in vitro* (JAIN & LIM, 2001) e em pacientes diabéticos *in vivo* (BROWNLEE & CERAMI, 1981; BROWNLEE, 1994).

O mecanismo molecular envolvido na inibição da δ-ALA-D no DM também ainda não está completamente compreendido. No entanto, tanto a glicação do resíduo de lisina presente no sítio ativo quanto a oxidação dos resíduos de cisteína, essenciais para a atividade desta enzima, poderiam ser as causas principais (MISRA, 1974; AFONSO et al., 1996; CABALLERO et. al., 1998).

A glicose pode ligar-se a enzimas como a δ-ALA-D produzindo mudanças conformacionais, as quais prejudicam sua ação catalítica. Além disso, a glicação de enzimas citosólicas, como a δ-ALA-D, poderia levar a uma produção adicional de radicais livres. Nossos argumentos baseiam-se em dados recentes da literatura demonstrando que a glicação de proteínas costuma ocorrer intracelularmente (BROWNLEE, 1994; GUGLIUCCI & ALLARD, 1996). Certamente, a glicação e a carbonilação de proteínas pode inativar enzimas, o que pode ter um papel importante nos efeitos da hiperglicemia a longo prazo (MORGAN et al., 2002).

Essa tese é reforçada por dados que evidenciam uma correlação entre o

aumento de hemoglobina glicada e a baixa atividade da  $\delta$ -ALA-D *in vitro* (CABALLERO et. al., 1998). Da mesma forma, no nosso trabalho foi observada uma correlação negativa entre a percentagem de HbA<sub>1c</sub> e a atividade da  $\delta$ -ALA-D nos tecidos estudados (**Artigo 2**), sugerindo que os níveis de proteínas glicadas no plasma poderiam ser usados como um bom indicador do nível de glicação intracelular. De fato, em trabalhos anteriores a glicação de proteínas citosólicas foi fortemente associado com as proteínas glicadas no plasma durante curtos períodos de DM experimental (GUGLIUCCI & BENDAYAN, 1995; GUGLIUCCI & ALLARD, 1996). Desta forma, acreditamos que a inibição da  $\delta$ -ALA-D está estreitamente associada com a glicação desta enzima nos tecidos estudados.

Da mesma forma, a adição de DTT *in vitro* não aboliu a inibição da  $\delta$ -ALA-D (**Artigos 1 e 2**), sugerindo que a hiperglicemia associada à ingestão crônica das dietas ricas em glicídios e lipídios pode causar glicação da lisina do sítio ativo. Por outro lado, esses resultados também poderiam sugerir que houve uma redução na síntese enzimática ou um aumento na sua degradação, ou ambos (CABALLERO et al., 1998; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999).

A inativação da  $\delta$ -ALA-D poderia resultar também de efeitos paralelos da auto-oxidação da glicose envolvendo a formação de EROs, as quais poderiam atuar indiretamente sobre a enzima. Pois, devido a sua natureza sulfidrílica, esta enzima pode ser inibida por um grande número de elementos pró-oxidantes (BARBOSA et al., 1998; FARINA et al., 2001, 2003; SOARES et al., 2003). Com efeito, em um dos experimentos (**Artigo 4**), o DTT aboliu o efeito inibitório das dietas sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D na maioria dos tecidos estudados, sugerindo que a oxidação dos resíduos cisteinil da enzima poderia estar ocorrendo. Além disso, o índice de reativação da  $\delta$ -ALA-D observado neste trabalho (**Artigo 4**) foi significativamente

elevado, indicando que a enzima foi exposta a um ambiente mais oxidativo.

Os radicais livres podem interagir diretamente com os tióis, oxidando-os a dissulfetos (MISRA, 1974; AFONSO et al., 1996). Logo, as EROs produzidas pelos altos níveis de glicose podem oxidar grupos tióis críticos localizados próximos ao sítio ativo da  $\delta$ -ALA-D de mamíferos (AFONSO et al., 1996), inativando esta enzima.

A inibição da  $\delta$ -ALA-D poderia também resultar em acumulação de  $\delta$ -ALA o que, sob condições fisiológicas, pode ter efeitos pró-oxidantes (PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993) e pode exacerbar o estresse oxidativo causado pela hiperglicemia. De fato, a acumulação de  $\delta$ -ALA, durante a inibição da  $\delta$ -ALA-D por  $Pb^{2+}$  ou outros agentes, pode ter efeitos tóxicos sobre o fígado e sobre o cérebro (BECHARA, 1996; EMANUELLI et al., 2003) e parte desses efeitos resulta da produção aumentada de EROs (MONTEIRO et al., 1991; HERMES-LIMA et al., 1991; BECHARA et al., 1993). Assim, a acumulação de  $\delta$ -ALA poderia aumentar ainda mais a produção endógena de EROs, acentuando o estresse oxidativo (ONUKI et al, 2002).

Em um dos experimentos (**Artigo 4**), os animais tratados durante 30 semanas apresentaram uma atividade da  $\delta$ -ALA-D reduzida e um nível aumentado de TBARS em relação aos animais mais jovens. Da mesma forma, houve um maior índice de reativação para a  $\delta$ -ALA-D nesses animais do que em camundongos jovens, indicando uma maior oxidação dos resíduos cisteinil essenciais da enzima.

Tanto a glicação quanto a oxidação são reações químicas espontâneas também implicadas nas modificações cumulativas de macromoléculas durante o envelhecimento (BROWNLEE, 1994). A sobrevivência das células aeróbicas depende da presença de defesas antioxidantes suficientes para modular as concentrações de EROs geradas endogenamente. Mesmo assim, um nível basal de macromoléculas oxidativamente danificadas tem sido detectado sob condições

fisiológicas normais, sugerindo que um certo nível de estresse oxidativo prevalece mesmo em animais saudáveis (VLASSARA et al., 1994). Adicionalmente, as quantidades de macromoléculas modificadas oxidativamente estão aumentadas em tecidos mais velhos de diferentes espécies (STADTMAN & LEVINE, 2002). Também, alguns investigadores têm demonstrado que o dano oxidativo aumenta com a idade em algumas proteínas específicas, como glicose-6-fosfato desidrogenase (AGARWAL & SOHAL, 1993), adenina nucleotídio translocase (YAN & SOHAL, 1998), aconitase (YAN et al., 1997; DAS et al., 2001), arginina cinase (YAN et al., 1998), albumina e transferrina (JANA et al., 2002),  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (LUCAS & SZWEDA, 1999) e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (CHAKRABORTY et al., 2003). Tal acumulação de danos oxidativos poderia ser um fator causal primário na diminuição das funções fisiológicas associada ao envelhecimento (STADTMAN & LEVINE, 2002).

A ingestão de dietas ricas em sacarose é um fator importante no desenvolvimento de resistência à insulina, hiperglicemia e estresse oxidativo (PAGLIASSOTTI et al., 1996; FAURE et al., 1997). Da mesma forma, o  $\text{Cd}^{2+}$  perturba o metabolismo celular da glicose *in vivo*, induzindo ou agravando a hiperglicemia em animais experimentais (BELL et al., 1990; HAN et al., 2003). Assim, nós investigamos os efeitos do consumo de uma dieta rica neste açúcar aliado a um tratamento sub-agudo com Cd sobre a produção de TBARS, a atividade da  $\delta$ -ALA-D e a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em vários tecidos de camundongos (**Artigo 3**).

Conforme trabalhos anteriores, embora altos níveis plasmáticos e urinários de TBARS possam ser encontrados em ratos alimentados com dietas ricas em sacarose, sugerindo uma produção aumentada dessas substâncias a partir da PL *in vivo* (PAGLIASSOTTI et al., 1996; FAURE et al., 1997); o prejuízo na homeostase da

glicose e a insensibilidade à insulina que acompanham tais dietas são dependentes da quantidade do carboidrato e do tempo de exposição a este tipo de dieta (BERNAL et al., 1995; LOMBARDO et al., 1996). Estes autores argumentam que estas alterações ocorreriam somente depois de longos períodos de ingestão, o que poderia justificar o fato de não termos observado um efeito *per se* da ingestão de sacarose sobre os parâmetros analisados neste experimento.

O Cd<sup>2+</sup> é um poluente ambiental, que pode induzir um largo espectro de efeitos tóxicos, tais como alterações em proteínas sulfidrílicas, inibição do metabolismo energético, alterações estruturais e funcionais em DNA e membranas e dano oxidativo excessivo (SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, 2001). A inibição da δ-ALA-D testicular nos grupos de animais tratados com Cd<sup>2+</sup> (**Artigo 3**) também confirmou o efeito prevalente do Cd<sup>2+</sup> sobre os sistemas reprodutivos *in vivo*, os principais órgãos-alvo para a sua toxicidade (GOERING et al., 1995; SANTOS et al., 2004).

A δ-ALA-D de mamíferos é uma metaloenzima que requer Zn<sup>2+</sup> para exercer a atividade catalítica máxima e dados suportam a hipótese de uma competição direta entre metais bivalentes, como Cd<sup>2+</sup> e Pb<sup>2+</sup>, e o Zn<sup>2+</sup> presente no sítio ativo da δ-ALA-D (TSUKAMOTO et al., 1979; SOMMER & BEYERSMANN, 1984; EMANUELLI et al., 1998). Assim, este parece ser o mecanismo mais plausível para a inibição desta enzima observada neste experimento (**Artigo 3**).

Neste trabalho (**Artigo 3**), houve uma importante interação entre os efeitos da ingestão de sacarose e a intoxicação com Cd<sup>2+</sup> sobre a atividade Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, mesmo depois de um curto período de consumo desse tipo de dieta. A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, uma enzima sulfidrílica importante para a manutenção de uma distribuição adequada de íons celulares, está entre as enzimas que são particularmente afetadas por Pb<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup> (RAJANNA et al., 1990; CARFAGNA et al., 1996). Um dos possíveis

mecanismos envolvidos na inibição induzida pelo Cd<sup>2+</sup> pode ser o aumento na degradação da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, proporcionado por um elevado dano oxidativo (THEVENOD & FRIEDMANN, 1999).

Diferenças nas interações entre membranas lipídicas e proteínas também têm sido levado em conta nas alterações de enzimas ligadas a membranas, induzidas pelo Cd<sup>2+</sup>. Com efeito, a acumulação de Cd<sup>2+</sup> resulta em um decréscimo no conteúdo de componentes importantes das membranas tais como colesterol e fosfolipídios (KATTI & SATHYANEASAN, 1984; GULATI et al., 1986). Além disso, a composição de ácidos graxos nos fosfolipídios das membranas, assim como a sua taxa de renovação, são alterados devido a uma inibição na biossíntese dos ácidos graxos resultante da acumulação de Cd<sup>2+</sup> (CHELOMIN & BELCHEVA, 1991).

Desta forma, a acumulação de Cd<sup>2+</sup> tem influências sobre o funcionamento das membranas através de um distúrbio no ambiente membranoso, o que poderia ser significativamente prejudicial às enzimas ligadas às membranas, mesmo que de forma subliminar. Acreditamos que a exposição concomitante ao Cd<sup>2+</sup> e à sacarose poderia causar uma situação pró-oxidativa, o que poderia ter efeitos cumulativos sobre a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, contribuindo para a inibição desta enzima. Entretanto, estudos adicionais são necessários para entender o(s) mecanismos(s) envolvido(s) nos efeitos interativos desses fatores sobre a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nesta tese, podemos inferir o seguinte:

- O consumo crônico de dietas com alto teor de carboidratos ou lipídios leva a um aumento na PL (indicando uma situação de estresse oxidativo) e à inibição da enzima δ-ALA-D, fatos que atribuímos ao desenvolvimento de hiperglicemia;
- Se a inibição da δ-ALA-D fosse unicamente uma consequência da

oxidação dos seus grupos -SH, o DTT deveria reverter esta inibição em todos os experimentos. Por outro lado, o DTT não poderia reverter esta inibição, se os resíduos críticos de lisina da enzima estivessem glicados. Desta forma, acreditamos que ambos os mecanismos estão presentes na inibição desta enzima em nossos modelos;

- A atividade da  $\delta$ -ALA-D testicular foi significativamente inibida nos grupos tratados com  $Cd^{2+}$ , confirmando o efeito prevalente do  $Cd^{2+}$  sobre este tecido *in vivo*. Por isso, acreditamos que a inibição da  $\delta$ -ALA-D participa, pelo menos em parte, das manifestações sub-agudas da toxicidade causada pelo  $Cd^{2+}$ . Assim, a  $\delta$ -ALA-D testicular é um alvo potencial para o  $Cd^{2+}$  e sua inibição poderia causar sérios danos a este tecido, o qual é altamente dependente do metabolismo oxidativo;
- Nossos dados também apontam que a exposição ao  $Cd^{+2}$  associada a um alto consumo de sacarose pode agravar a toxicidade desta metal sobre a enzima  $Na^+/K^+$ -ATPase;
- A tendência a pró-oxidação da enzima  $\delta$ -ALA-D associada à idade observada em vários órgãos pode ser interpretada como um reflexo de um desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes durante o processo de envelhecimento, favorecendo o estresse oxidativo;
- As alterações na atividade da  $\delta$ -ALA-D encontradas neste trabalho colocam esta enzima, tal como hemoglobina, albumina e colágeno, como um alvo potencial para detecção das oxidações fisiológicas ou patológicas causadas tanto pelo DM quanto pelo envelhecimento.

## **9 PERSPECTIVAS**

Tendo em vista que os principais mecanismos moleculares relacionados com os efeitos maléficos da hiperglicemia no DM são a glicação não-enzimática de proteínas e a auto-oxidação da glicose, poderíamos ampliar os conhecimentos nesta área específica de estudo a partir da concretização dos seguintes objetivos:

- Identificar, detalhadamente, o mecanismo envolvido nas alterações sobre a atividade da  $\delta$ -ALA-D encontradas neste trabalho, empregando modelos experimentais semelhantes;
- Identificar e quantificar as EROs que poderiam estar sendo produzidas nestes modelos e poderiam estar levando à PL à inibição da  $\delta$ -ALA-D;
- Determinar se o desenvolvimento da hiperglicemia e do estresse oxidativo associados ao DM, em nossos modelos, podem estar ligados a uma diminuição na quantidade e na qualidade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos de importância fisiológica reconhecida.

Como nossos resultados e os de muitos outros investigadores demonstram uma participação efetiva do estresse oxidativo no desenvolvimento e na progressão dos danos do DM, também poderíamos investigar:

- Se o desenvolvimento da hiperglicemia e do estresse oxidativo associados ao DM, em nossos modelos, podem ser atenuados efetivamente por alguns antioxidantes naturais como as vitaminas C e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), associados ou individualmente;
- O possível papel protetor de antioxidantes sintéticos, como compostos orgânicos de selênio, contra o desenvolvimento e a progressão do DM nestes modelos animais.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Alexandria, V. A. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diab. Care**, v. 20, p. 1183, 1997.
- AFONSO, S. G.; POLO, C. F.; SALAMANCA, R. E.; BATLLE, A. Mechanistic studies on uroporphyrin I-induced photoinactivation of some heme-enzymes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 28, p. 415-420, 1996.
- AGARWAL, S. & SOHAL, R. S. Relationship between aging and susceptibility to protein oxidative damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 194, p. 1203-1206, 1993.
- AHREN, B. & SCHEURINK, A. J. Marked hyperleptinemia after high-fat diet associated with severe glucose intolerance in mice. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 139, p. 461-467, 1998.
- AHREN, B.; SIMONSSON, E.; SCHEURINK, A. J.; MULDER, H.; MYRSEN, U.; SUNDLER, F. Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 46, p. 97-106, 1997.
- AHRÉN, R. & SUNDKVIST, G. Long term effects of aloxan in mice. **Int. J. Pancreatol.**, v. 2, p. 197-201, 1995.

ALBERTI, K. G. & SIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. **Diabet. Med.**, v. 15, p. 539-553, 1998.

AMOS, A.; MCCARTY, D.; ZIMMET, P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. **Diab. Med.**, v. 14, p. S1-S85, 1997.

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

ATKINSON, M. & MACLAREN, N. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, 1428–1436, 1994.

ATP III, ADULT TREATMENT PANEL III. National Institutes of Health (NIH): The third report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **NIH Publication** 01–3670, 2001.

BACH, J. F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr. Rev.**, v. 15, p. 516-542, 1994.

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

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

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

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

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

BECHARA, E. J. H. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 841-851, 1996.

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

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

BELL, R. R.; EARLY, J. L.; NONAVINAKERE, V. K.; MALLORY, Z. Effect of cadmium on blood glucose level in the rat. **Toxicol. Lett.**, v. 54, p. 199-205, 1990.

BENOIST, C. & MATHIS D. Autoimmune diabetes. Retrovirus as trigger, precipitator or marker? **Nature**, v. 388, p. 833-834, 1997.

BERNAL, C. A.; GUTMAN, R. A.; LOMBARDO, Y. B. The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in-vitro effects of insulin and fructose on rat-liver triglyceride-metabolism. **J. Nutr. Biochem.**, v. 6, p. 422-430, 1995.

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

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

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

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

BOULANGE, A.; PLANCHE, E.; DE GASQUET, P. J. Onset of genetic obesity in the absence of hyperphagia during the first week of life in the Zucker rat (*fa/fa*). **J. Lipid Res.**, v. 20, p. 857-864, 1979.

BROWNLEE, M. & CERAMI, A. The biochemistry of the complications of *diabetes mellitus*. **Annu. Rev. Med.**, v. 50, p. 385-432, 1981.

BROWNLEE, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annu. Rev. Med.**, v. 46, p. 223-234, 1994.

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

BUEGE, J. A. & AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302-309, 1978.

BURNHAM, T. K. & FOSSNAUGH, R. P. Porphyria, diabetes, and their relationship. A case report. **Arch. Dermatol.**, v. 83, p. 717-722, 1961.

BYRNES, S. E.; MILLER, J. C. B.; DENYER, G. S. Amylopectin starch promotes the development of insulin resistance in rats. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1430-1437, 1995.

CABALLERO, F. A.; GEREZ, E. N.; POLO, C. F.; VAZQUEZ, E. S.; BATLLE, A. M. C. Reducing sugars trigger  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase inactivation: evidence of *in vitro* aspirin prevention. **Gen. Pharmacol.**, v. 31, p. 441-445, 1998.

CABALLERO, F.; GEREZ, E.; BATLLE, A.; VAZQUEZ, E. Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. **Chem. Biol. Interact.**, v. 126, p. 215-225, 2000.

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

CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J.; BURN, P. Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. **Science**, v. 280, p. 1383-1387, 1998.

CARFAGNA, M. A.; PONSLER, G. D.; MUHOBERAC, B. B. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. **Chem. Biol. Interact.**, v. 100, p. 53–65, 1996.

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

CHAKRABORTY, H.; SEN, P.; SUR, A.; CHATTERJEE, U.; CHAKRABARTI, S. Age-related oxidative inactivation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in rat brain crude synaptosomes. **Exp. Gerontol.**, v. 38, p. 705–710, 2003.

CHANCE, B.; SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, V. 59, P. 527-605, 1979.

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

CHELOMIN, V. P. & BELCHEVA, N. N. Alterations of microsomal lipid synthesis in gill cells of bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* in response to cadmium accumulation. **Comp. Biochem. Physiol. Comp. Pharmacol.**, v. 99, p. 1-5, 1991.

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

CHUA, S. C. J.; CHUNG, W. K.; WU-PENG, X. S.; ZHANG, Y.; LIU, S. M.; TARTAGLIA, L.; LEIBEL, R. L. Phenotypes of mouse *diabetes* and rat *fatty* due to mutations in the ob (leptin) receptor. **Science**, v. 271, p. 994-996, 1996.

COLEMAN, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v. 14, p. 141-148, 1978.

COLLIER, A.; WILSON, R.; BRADLEY, H. Free radical activity in type 2 diabetes. **Diab. Med.**, v. 7, p. 27-30, 1990.

COMMONER, B.; TOWNSEND, J.; PAKE, G. E. Free radicals in biological materials.  
**Nature**, v. 174, p. 689–691, 1954.

CONRAD, B.; WEISSMAHR, R. N.; BONI, J.; ARCARI, R.; SCHUPBACH, J.; MACH, B. A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. **Cell**, v. 90, p. 303-313, 1997.

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

DAS, N.; LEVINE, R. L.; ORR, W. C.; SOHAL, R. S. Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. **Biochem. J.**, v. 360, p. 209–216, 2001.

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

DEFRONZO, R. A. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis, **Nether. J. Med.**, v. 50, p. 191-197, 1997.

DEFRONZO, R. A.; BONADONNA, R. C.; FERRANNINI, E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. **Diab. Care**, v. 15, p. 318–368, 1996.

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

DINSMOOR, R. The history of Diabetes. Publicado em **C.F.K. Magazine Fall**, maio de 1996 (Informação capturada em 20/08/2002, disponível na Internet na seguinte página <http://www.jdf.org/kids/searchforacure/2000/05/history.html>).

DOWSE, G. & ZIMMET, P. The thrifty genotype in non-insulin-dependent diabetes. The hypothesis survives. **Br. Med. J.**, v. 306, p. 532–533, 1993.

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

DUNN, J. S.; SHEEHAN, H. L.; McLETHIE, N. G. B. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. **Lancet**, v. 1, p. 484-487, 1943.

EDELSTEIN, S. L.; KNOWLER, W. C.; BAIN, R. P.; ANDRES, R.; BARRETT-CONNOR, E. L.; DOWSE, G. K.; HAFFNER, S. M.; PETTITT, D. J.; SORKIN, J. D.; MULLER, D. C.; COLLINS, V. R.; HAMMAN, R. F. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: An analysis of six prospective studies. **Diabetes**, v. 46, p. 701–710, 1997.

EMANUELLI, T.; PAGEL, F.W.; PORCIÚNCULA, L.O.; SOUZA, D.O. Effects of 5-aminolevulinic acid on the glutamatergic neurotransmission. **Neurochem. Int.**, v. 42, p. 115–121, 2003.

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

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

FAGOT-CAMPAGNA, A. & NARAYAN, K. Type 2 diabetes in children. **Br. Med. J.**, v. 322, p. 377–387, 2001.

FARINA, M.; BRANDÃO, R.; DE LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; SOUZA, D. O. G.; ROCHA, J. B. Profile of nonprotein thiols, lipid peroxidation and delta-aminolevulinate dehydratase activity in mouse kidney and liver in response to acute exposure to mercuric chloride and sodium selenite. **Toxicology**, v. 184, p. 179-187, 2003.

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

FAURE, P.; ROSSINI, E.; LAFOND, J. L.; RICHARD, M. J.; FAVIER, A.; HALIMI, S. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J. Nutr.*, v. 127, p. 103–107, 1997.

FENTON, H. J. H. The oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Proc.*, v. 10, p. 157–158, 1894.

FERNÁNDEZ-CUARTERO, B.; REBOLLAR, J. L.; BATLLE, A.; SALAMANCA, R. E. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 31, p. 479-488, 1999.

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

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

FRANCO, L. J.; MILECH, A.; BRAGA, C. D. C.; MALERBI, D.; CAMPOS, G. P.; ALMEIDA, L.; SCHMIDT, M. I.; ALBUQYERQUE, R. H. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do Diabetes Mellitus no Brasil. **Ministério da Saúde. Censo de Diabetes**, p. 1-32, 1998.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, v. 201, p. 875-880, 1978.

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

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

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

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

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

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

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

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

GOERING, P. L.; WAALKES, M. P.; KLAASSEN, C. D. Toxicology of cadmium. In: Goyer, R. A. & Cherian, M. G. (Eds.), **Handbook of Experimental Pharmacology**, Springer-Verlag, New York, p.189–213, 1995.

GRIFFEN, S. C.; WANG, J.; GERMAN, M. S. A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. **Diabetes**, v. 50, p. 63-68, 2001.

GUGLIUCCI, A. & ALLARD, M. F. Glycation of hepatocyte cytosolic proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v. 229, p. 952-958, 1996.

GUGLIUCCI, A. & BENDAYAN, M. Histones from diabetics rats contain increased levels of advanced-glycation end-products. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 212, p. 56-62, 1995.

GULATI, S.; GILL, K. D.; NATH, R. Effect of cadmium on lipid composition of the weanling rat brain. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 59, p. 89–93, 1986.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. In: **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press Inc. N. Y. 3th ed, 1999.

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

HALLIWELL, B. Superoxide-dependent formation of hydroxil radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxil radicals in vivo. **Biochem. J.**, v. 205, p. 462-472, 1982.

HAN, J. C.; PARK, S. Y.; HAH, B. G.; CHOI, G. H.; KIM, Y. K.; KWON, T. H.; KIM, E. K.; LACHAAL, M.; JUNG, C. Y.; LEEA, W. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 413, p. 213–220, 2003.

HANSEN, B.C. The metabolic syndrome X. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** , v. 892, p. 1–24, 1999.

HANSEN, P. A.; DONG, H. H.; MARSHALL, B. A.; NOLTE, L. A.; CHEN, M. M.; MUECKLER, M.; HOLLOSZY, J. O. A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle: Functional evaluation of potential mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 26157-26163, 1998.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J. Gerontol.**, v. 11, p. 298–300, 1956.

HARRIS, M. I.; FLEGAL, K. M.; COWIE, C. C.; EBERHARDT, M. S.; GOLDSTEIN, D. E.; LITTLE, R. R.; WIEDMEYER, H. M.; BYRD-HOLT, D. D. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults: The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–1994. **Diab. Care**, v. 28, p. 518–524, 1998.

HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; LIU, R.; HU, M.; CHEN, W.; ROSSETTI, L. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2173-2382, 1997.

HEMPPELMANN, L. & HOFFMAN, J. Practical aspects of radiation injury. **Annu. Rev. Nucl. Sci.**, v. 3, p. 369–389, 1953.

HERMES-LIMA, M.; VALLE, V. G. R.; VERCESI, A. E.; BECHARA, E. J. H. Damage to rat mitochondria promoted by  $\delta$ -aminolevulinic acid generated oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead-poisoning. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1056, p. 57-63, 1991.

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

HIGGINS, J. A.; MILLER, J. C. B.; DENYER, G. S. Development of insulin resistance in rats is dependent on the rate of glucose absorption from diet. **J. Nutr.**, v. 126, p. 596-602, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, p. 87-91, 1993.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 10697-10703, 1996.

HU, F. B.; MANSON, J. E.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G.; LIU, S.; SOLOMON, C. G.; WILLETT, W. C. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N. Engl. J. Med.**, v. 345, p. 790–797, 2001.

HUGGINS, T. G.; WELLSKNECHT, M. C.; DETORIE, N. A.; BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Formation of O-tyrosine and dityrosine in proteins during radiolytic and metal-catalyzed oxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12341–12347, 1993.

HUNT, J. V.; DEAN, R. T.; WOLFF, S. P. Hydroxil radical production and autoxidative glycosilation: Glucose oxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. **Biochem. J.**, v. 256, p. 205-212, 1988.

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

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

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

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

JAIN, S. K. & LIM, G. Pyridoxine and pyridoxiamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 30, p. 232-237, 2001.

JAIN, S. K. Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 937, p. 205-210, 1988.

JAIN, S.K. & PALMER, M. The effect oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosilation of proteins. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 22, p. 593-596, 1997.

JANA, C. K.; DAS, N.; SOHAL, R. S. Specificity of age-related carbonylation of plasma proteins in the mouse and rat. **Arch. Biochem. Biophys.**, 397, 433–439, 2002.

JOOSTEN, H. F. P.; van der KROON, P. H. W. Enlargement of epididymal adipocytes in relation to hyperinsulinemia in obese hyperglycemic mice (*ob-ob*). **Metabolism**, v. 23, p. 59-66, 1974.

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

KADOWAKI, T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p. 459-465, 2000.

KAHN, B. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. **Cell**, v. 92, p. 593–596, 1998.

KASIM-KARAKAS, S. E.; VRIEND, H.; ALMARIO, R.; CHOW, L. C.; GOODMAN, M. N. Effects of dietary carbohydrates on glucose and lipid metabolism in golden Syrian hamsters. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 128, p. 208-213, 1996.

KATTI, S. R. & SATHYANESAN, A. G. Changes in tissue lipid and cholesterol content in the catfish *Clarias batrachus* (L.) exposed to cadmium chloride. **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, v. 32, p. 486–490, 1984.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diab. Care**, v. 21, p.1414-1431, 1998.

KITAGAWA, T.; OWADA, M.; URAKAMI, T.; YAMANCHI, K. Increased incidence of non-insulin dependent diabetes mellitus among Japanese school children correlates with an increased intake of animal protein and fat. **Clin. Pediatr.**, v. 37, p. 111–116, 1998.

KRAEGEN, E. W.; JAMES, D. E.; STORLIEN, L. H.; BURLEIGH, K. M.; CHISHOLM, D. J. In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. **Diabetologia**, v. 29, p. 192-198, 1986.

KUSUNOKI, M.; COONEY, G. J.; HARA, T.; STORLIEN, L. H. Amelioration of high-fat feeding-induced insulin resistance in skeletal muscle with the antiglucocorticoid RU486. **Diabetes**, v. 44, p. 718-720, 1995.

LEE, M. K.; MILES, P. D.; KHOURSHED, M.; GEO, K. M.; MOSSA, A. R.; OLEFSKY, J. M. Metabolic effects of troglitazone on fructose-induced insulin resistance in the rat. **Diabetes**, v. 43, p. 1435-1439, 1994.

LENZEN, S. & PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v. 31, p. 337-342, 1988.

LEVINE, R. L. Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. **J. Biol. Chem.**, v. 258, 11823–11827, 1983.

LOMBARDO, Y. B.; DRAGO, S.; CHICCO, A.; FAINSTEIN-DAY, P.; GUTMAN, R.; GAGLIARDINO, J. J.; GOMEZ DUMM, C. L. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. **Metabolism**, v. 45, p. 1527-1532, 1996.

LUCAS, D. T. & SZWEDA, L. I. Declines in mitochondrial respiration during cardiac reperfusion: age-dependent inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 6689–6693, 1999.

MACIEL, E. N.; BOLZAN, R. C.; BRAGA, A. L.; ROCHA , J. B. T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects aminolevulinate dehydratase from

liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 14, p. 310-319, 2000.

MALERBI, D. A. & FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diab. Care**, v. 15, p. 1509-1516, 1992.

MEERSON, F. Z.; KAGAN, V. E.; KOSLOV, Y. P.; BELKINA, L. M.; ARKIPENKO, Y. V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. **Basic Res. Cardiol.**, v. 77, p. 465-485, 1982.

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

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

MISRA, H. P. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 2151-2155, 1974.

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

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

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

MOHAMED, A. K.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P. P. The role of oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in late diabetic complications. **Biofactors**, v. 10, p. 157-167, 1999.

MOLLER, D. E. Transgenic approaches to the pathogenesis of NIDDM. **Diabetes**, v. 43, p. 1394-1401, 1994.

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

MONTEIRO, H. P.; BECHARA, E. J. H.; ABDALLA, D. S. P. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 103, p. 73-83, 1991.

MORGAN, P. E., DEAN, R. T., DAVIES, M. J. Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 403, p. 259-269, 2002.

MOSKOVITZ, J.; YIM, M. B.; CHOCK, P. B. Free radicals and disease. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 397, p. 354–359, 2002.

NEEL, J. Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by “progress”? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 353–362, 1962.

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

NOGUEIRA, C. W.; SOARES, F. A.; NASCIMENTO, P. C.; MULLER, D.; ROCHA, J. B. T. 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase. **Toxicology**, v. 184, p. 85-95, 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVER, C. N.; AHN, B.; MOERMAN, E. J.; GOLDSTEIN, S.; STADTMAN, E. R. Age-related changes in oxidized proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 5488–5491, 1987.

ONUKI, J.; TEIXEIRA, P. C.; MEDEIROS, M. H.; DORNEMANN, D.; DOUKI, T.; CADET, J.; DI MASCIO, P. Is 5-aminolevulinic acid involved in the hepatocellular carcinogenesis of acute intermittent porphyria? **Cel. Mol. Biol.**, v. 48, p. 17-26, 2002.

OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 316, p. 607-611, 1995.

PADGETT, C. M. & WHORTON, A. R. Glutathione redox cycle regulates nitric oxide-mediated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibition. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 41, p. 108, 1997.

PAGLIASSOTTI, M. J.; PRACH, P.A.; KOPPENHAFER, T. A.; PAN, D.A. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. R1319-R1326, 1996.

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

POLO, C. F.; VÁZQUEZ, E. S.; GEREZ, E. N.; CABALLERO, F. A.; BATLLE, A. M. C. STZ-induced diabetes in mice and heme pathway enzymes. Effect of allylisopropylacetamide and  $\alpha$ -tocopherol. **Chem. Biol. Interact.**, v. 95, p. 327-334, 1995.

RAJANNA, B.; HOBSON, M.; BOYKIN, M.; CHETTY, C. S. Effects of chronic treatment with cadmium on ATPases, uptake of catecholamines and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 20, p. 36–41, 1990.

RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, p. 785-789, 1963.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-1607, 1988.

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

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

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

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

ROSE, R.C. Solubility properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 924, p. 254-256, 1987.

ROSENBLUM, A.; JOE, J.; YOUNG, R.; WINTER, W. Emerging epidemic of Type 2 diabetes in youth. **Diab. Care**, v. 22, p. 345–354, 1999.

SANTOS, F. W.; ORO, T.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; NASCIMENTO, P. C.; NOGUEIRA, C. W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett.**, v. 152, p. 255–263, 2004.

SASSA, S. ALAD Porphyria. **Sem. Liver Dis.**, v. 18, p. 95-101, 1998.

SASSA, S.; FUJITA, H.; KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds.), *Highlights of Modern Biochemistry*, VSP, Utrecht, v. 1, p. 329-338, 1989.

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

SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A. A. W.; ECKERSKORN, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinate dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24)

from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. **Z. Naturforsch.**, v. 47, p. 77-84, 1991.

SCHMITZ-PEIFFER, C.; BROWNE, C. L.; OAKES, N. D.; WATKINSON, A.; CHISHOLM, D. J.; KRAEGEN, E. W.; BIDEN, T. J. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. **Diabetes**, v. 46, p. 169-178, 1997.

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

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

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

SMITH, M. A.; PERRY, G.; RICHEY, P. L.; SAYRE, L. M.; ANDERSON, V. E.; BEAL, M. F.; KOWALL, N. W. Oxidative damage in Alzheimer's. **Nature**, v. 382, p. 120-121, 1996.

SOARES, J. C. M.; FOLMER, V.; ROCHA, J. B. T. Influence of dietary selenium supplementation and exercise on thiol-containing enzymes in mice. **Nutrition**, v. 19, p. 627-632, 2003.

SOHAL, R. S. & DUBEY, A. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 621–626, 1994.

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

SOUTHORN, P. A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin. Proc.**, v. 63, p. 381-389, 1988.

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

SREENAN, S.; STURIS, J.; PUGH, W.; BURANT, C. F.; POLONSKY, K. S. Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with metformin or troglitazone. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. E742-E747, 1996.

STADTMAN, E. R. & LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 899, p. 191–208, 2002.

STADTMAN, E. R. Biochemical markers of aging. **Exp. Gerontol.**, v. 23, p. 327–347, 1988.

STADTMAN, E. R. Protein oxidation and aging. **Science**, v. 257, p. 1220–1224, 1992.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; AHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307-312, 2001.

STORLIEN, L. H.; HIGGINS, J. A.; THOMAS, T. C.; BROWN, M. A.; WANG, H. Q.; HUANG, X. F.; ELSE, P. L. Diet composition and insulin action in animal models. **British J. Nutr.**, v. 83, p. S85-S90, 2000.

STORLIEN, L. H.; JAMES, D. E.; BURLEIGH, K. M.; CRISHOLM, D. J.; KRAEGEN, E. W. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. E576-E583, 1986.

STORLIEN, L. H.; KRAEGEN, E. W.; JENKINS, A. B.; CHISHOLM, D. J. Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. **Am. J. Clin. Nut.**, v. 47, p. 420-427, 1988.

SWIERGOSZ-KOWALEWSKA, R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents, **Microsc. Res. Tech.**, v. 55, p. 208-222, 2001.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 536-546, 2001.

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

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J. Identification and expression cloning of a leptin receptor, *OB-R*. **Cell**, v. 83, p. 1263-1271, 1995.

TERRETTAZ, J. & JEANRENAUD, B. In vivo hepatic and peripheral insulin resistance in genetically obese (*fa/fa*) rats. **Endocrinology**, v. 112, p. 1346-1351, 1983.

THEVENOD, F. & FRIEDMANN, J. M. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. **FASEB J.**, v. 13, p. 1751-1761, 1999.

THOMAS, J. A. & MALLIS, R. J. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. **Exp. Gerontol.**, v. 36, p. 1519–1526, 2001.

TOBEY, T. A.; MONDON, C. E.; ZAVARONI, I.; REAVEN, G. M. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. **Metabolism**, v. 31, p. 608-612, 1982.

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

UPTON, R.; WIDDOWSON, P.; ISHII, S.; TANAKA, H.; WILLIAMS, G. Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (*fa/fa*) Zucker rats and Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats treated with the thiazolidinedione, MCC-555. **Br. J. Pharmacol.**, v. 125, p. 1708-1714, 1998.

URI, N. Inorganic free radicals in solution. **Chem. Rev.**, v. 40, p. 375–454, 1952.

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

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

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R. E.; TATARANNI, P. A. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 86, p. 1930-1935, 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes Mellitus. Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, 1999.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diabetes Mellitus. Report of a World Health Organization Study Group, Geneva, 1985.

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

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

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

YAN, L. J. & SOHAL, R. S. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, p. 12896-12901, 1998.

YAN, L. J.; LEVINE, R. L.; SOHAL, R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 94, 11168-11172, 1997.

YAN, L. J.; ORR, W. C.; SOHAL, R. S. Identification of oxidized proteins based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, immunochemical detection, isoelectric focusing, and microsequencing. **Anal. Biochem.**, 263, 67-71, 1998.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J.; HANSEN, L.; LI, Z.-W.; KARIN, M.; SHOELSON, S. E. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of *Ikk $\beta$* . **Science**, v. 293, p. 1673-1677, 2001.

ZAINAL, T. A.; OBERLEY, T. D.; ALLISON, D. B.; SZWEDA, L. I.; WEINDRUCH, R. Caloric restriction of rhesus monkeys lowers oxidative damage in skeletal muscle. **FASEB J.**, v. 14, p. 1825-1836, 2000.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425-432, 1994.

ZIMMET, P. Diabetes epidemiology as a trigger to diabetes research. **Diabetologia**, v. 42, p. 499-518, 1999.

ZIMMET, P. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted? **J. Intern. Med.**, v. 247, p. 301–310, 2000.

ZIMMET, P. Kelly West Lecture 1991. Challenges in diabetes epidemiology-from West to the Rest. **Diab. Care**, v. 15, p. 232–252, 1992.