

**UFRGS-UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA**

**Efeitos do Glioxal e Metilglioxal sobre o metabolismo energético em córtex cerebral de ratos Wistar**

*Betina Schmidt*

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica

Porto Alegre, RS

2008

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Marcos Luiz Santos Perry pela oportunidade, orientação, carinho e dedicação ao trabalho.

À Profa. Ana Maria Feoli pelo apoio, incentivo e inspiração.

Aos meus pais, Pedro e Citânia, pelo amor, carinho e apoio em todas as etapas desse processo e da minha vida.

Ao meu irmão, Alexandre, pelo exemplo, amizade e amor.

Ao meu namorado, Fábio, que acompanhou o desenvolvimento desta dissertação e esteve presente em todos os momentos me apoiando.

A todos os colegas do Laboratório 27 pelo carinho com que me acolheram e pelos ensinamentos que me passaram, em especial a Cíntia por sua amizade e companheirismo em todos os momentos.

A todos os Professores do Departamento de Bioquímica, pela oportunidade de passarem seus conhecimentos nas aulas.

Ao Departamento de Bioquímica e a UFRGS pela oportunidade de realizarmos este trabalho.

Aos órgãos financiadores: CNPq, FAPERGS, CAPES e PROPESQ/UFRGS pelo suporte financeiro e pela bolsa cedida ao longo do mestrado.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	2
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	4
<b>PARTE I</b>	
Resumo.....	8
Abstract.....	11
Lista de Abreviaturas.....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 DIABETES MELLITUS .....	11
1.2 PRODUTOS AVANÇADOS DE GLICAÇÃO (AGES) .....	12
1.3 GLIOXAL E METILGLIOXAL .....	14
1.4 DETOXIFICAÇÃO DOS GLIOXAIS: SISTEMA GLIOXALASE .....	16
1.5 ALTERAÇÃO NO METABOLISMO DOS AMINOÁCIDOS .....	17
1.6. POSSÍVEIS AGENTES PROTETORES DA AÇÃO DOS GLIOXAIS .....	18
1.6.1 <i>D-Penicilamina</i> .....	21
1.6.2 <i>N-acetil-cisteína (NAC)</i> .....	22
1.6.3 <i>Trolox</i> .....	22
1.7 OBJETIVO GERAL.....	24
1.7.1 <i>Objetivos Específicos</i> .....	24
<b>PARTE II</b>	
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.RESULTADOS</b> .....	<b>36</b>
<b>PARTE III</b>	
<b>3. DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
3.1 <i>Conclusões</i> .....	71

## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I

- Figura a:** Reação de Maillard, descrito em 1912 .....13
- Figura b:** Sistema glicoxalase de detoxificação dos glicoxais ..... 17
- Figura c:** Hiperglicemia induz a produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons ..20

## LISTA DE GRÁFICOS

### PARTE II

- Figura 1-** Efeitos do glicoxal e metilglicoxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Oxidação a CO<sub>2</sub>.....37
- Figura 2-** Efeitos do glicoxal e metilglicoxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Conversão à Lipídeos.....37
- Figura 3-** Efeitos do glicoxal e metilglicoxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Síntese protéica.....38
- Figura 4-** Efeitos do glicoxal e metilglicoxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal). Oxidação a CO<sub>2</sub>.....39
- Figura 5-** Efeitos do glicoxal e metilglicoxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos. Conversão a lipídeos.....39
- Figura 6-** Efeitos do glicoxal e metilglicoxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos. Síntese protéica.....40
- Figura 7-** Efeitos do glicoxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos jovens (10 dias de vida pós-natal) incubados com glicose oxidase. Oxidação a CO<sub>2</sub>.....41

<b>Figura 8-</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos jovens incubados com glicose oxidase. Conversão a lipídeos.....	42
<b>Figura 9-</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos jovens incubados com glicose oxidase. Síntese de proteína.....	43
<b>Figura 10 -</b> Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar jovens. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	44
<b>Figura 11-</b> Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar adultos. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	45
<b>Figura 12-</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de ratos jovens em concentrações fisiológicas de K <sup>+</sup> (2,7 mM) e numa elevada concentração de K <sup>+</sup> (50 mM). Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	46
<b>Figura 13 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de ratos adultos em concentrações fisiológicas de K <sup>+</sup> (2,7 mM) e numa elevada concentração de K <sup>+</sup> (50 mM). Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	47
<b>Figura 14 -</b> Efeitos da N-acetil-cisteína em concentrações de 1mM, 2mM e 5mM sobre o metabolismo da glicina. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	48
<b>Figura 15-</b> Efeitos da N-acetil-cisteína em concentrações de 1mM, 2mM e 5mM sobre o metabolismo da glicina. Conversão a lipídeos.....	49
<b>Figura 16-</b> Efeitos da N-acetil-cisteína em concentrações de 1mM, 2mM e 5mM sobre o metabolismo da glicina. Incorporação a proteína.....	50
<b>Figura 17-</b> Efeitos da Penicilamina em concentrações de 1mM, 2mM e 5mM sobre o metabolismo da glicina. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	51
<b>Figura 18-</b> Efeitos da Penicilamina em concentrações de 1mM, 2mM e 5mM sobre o metabolismo da glicina. Conversão a lipídeos.....	52

<b>Figura 19-</b> Efeitos da Penicilamina em concentrações de 1mM, 2mM e 5mM sobre o metabolismo da glicina. Incorporação a proteína.....	53
<b>Figura 20-</b> Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo do lactato em córtex cerebral de ratos jovens. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	54
<b>Figura 21-</b> Efeitos do glioxal e da N-acetil-cisteína sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos jovens. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	55
<b>Figura 22 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 1mM e Penicilamina 1mM. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	56
<b>Figura 23 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 1mM e Penicilamina 1mM. Conversão à lipídeos.....	57
<b>Figura 24 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 1mM e Penicilamina 1mM. Síntese de protéica.....	58
<b>Figura 25 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 2mM e Penicilamina 5mM. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	59
<b>Figura 26 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 2mM e Penicilamina 5mM. Conversão à lipídeo.....	60
<b>Figura 27 -</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 2mM e Penicilamina 5mM. Síntese de proteína.....	61
<b>Figura 28-</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 2mM e do TROLOX. Incorporação a proteína.....	62
<b>Figura 29-</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetilcisteína 2mM e do TROLOX. Oxidação a CO <sub>2</sub> .....	62
<b>Figura 30-</b> Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetilcisteína 2mM e do TROLOX. Conversão à lipídeo.....	63

## PARTE I

## Resumo

Um possível mecanismo de dano ao tecido induzido por hiperglicemia persistente na *diabetes mellitus* é a formação de produtos avançados de glicação (AGEs). Endogenamente, açúcares reduzidos reagem não enzimaticamente com grupos amino de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos através de uma série de reações que formam bases de Schiff seguida da formação de produtos de Amadori para a produção de AGEs. O glioxal e o metilglioxal são espécies reativas de carbonilas com ação de glicação, formados pela degradação de proteínas glicadas, intermediários glicolíticos e peroxidação lipídica e reagem com proteínas para formar os AGEs. No presente estudo nós avaliamos os efeitos dos glioxais *in vitro* sobre o metabolismo dos aminoácidos glicina, leucina e alanina, bem como sobre o metabolismo da glicose, lactato, acetato e glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar de 10 dias de idade pós-natal e aos 3 meses de idade pós natal. Para verificar estes efeitos na incorporação à proteínas, síntese lipídica e produção de CO<sub>2</sub> utilizamos os seguintes substratos: 0,2 mM de alanina, 0,2 mM glicina, 0,2 mM leucina, 2,0 mM glutamina, 5mM de glicose, ou 10mM de lactato ou 1mM de acetato. As fatias de córtex cerebral foram incubadas com os substratos descritos a 37°C em ambiente fechado. O CO<sub>2</sub> captado foi determinado em contador de cintilação líquida. O homogeneizado foi lavado com TCA 10% para a extração dos lipídios com Clorofórmio:Metanol (2:1), e acrescentado o líquido de cintilação, a radioatividade incorporada foi determinada em contador de cintilação líquida. O precipitado resultante foi dissolvido em ácido fórmico para medida de incorporação a proteínas. Concluimos que os efeitos do glioxal foram superiores aos efeitos do metilglioxal sobre o metabolismo dos aminoácidos estudados; Os glioxais (glioxal e metilglioxal) não tiveram efeitos sobre os parâmetros estudados no metabolismo da glicose, lactato e acetato; Os glioxais não alteraram o metabolismo da glicina e da glutamina em córtex cerebral de ratos adultos; A utilização de antioxidantes (N-acetilcisteína e trolox) no meio de incubação não modificou os efeitos dos glioxais sobre o metabolismo dos aminoácidos; A N-acetilcisteína e a penicilamina exerceram um acentuado efeito sobre o metabolismo dos aminoácidos. O estudo não estabeleceu um mecanismo para os efeitos do glioxal. Especulamos que a quantidade do antioxidante trolox usada não foi suficiente. A N-acetilcisteína e a penicilamina tiveram um efeito próprio que impossibilitou uma conclusão.



## Abstract

A possible way of tissue damage induced by persistent hyperglycemia in diabetes mellitus is the production of advanced glycation end products (AGEs). Endogenously, reduced sugar, like glucose, react not enzymatically with amino groups of proteins, lipids and nucleic acids through a plenty of reactions which form Schiff bases follow the formation of Amadori products to the next production of AGEs. The glyoxal and methylglyoxal are reactive carbonyl species with a potential glycation action. They are formed by the degradation of glycated proteins, glycolytic intermediates and lipid peroxidation and react with protein to form AGEs. In the present study we evaluate the effects of the glyoxals *in vitro* on the metabolism of the amino acids glycine, leucine and alanine and on the metabolism of glucose, lactate, acetate and glutamine in cerebral cortex of Wistar mouse with 10 day old and with 3 months old. To verify this effect on the protein incorporation, lipid synthesis and production of CO<sub>2</sub>, we used the following substrates: 2 mM of alanine, or glycine, or leucine, or glutamine, or 5mM of glucose, or 10 mM of lactate or 1mM of acetate. The slices of cerebral cortex were incubated with those substrates at 37°C. The CO<sub>2</sub> captured was determined in a liquid-scintillation counter. The homogenized was washed with TCA 10% for the extraction of lipids with Chloroform:Methanol (2:1), and it was added scintillation liquid, the radioactivity incorporated was determined in a liquid-scintillation counter. The result precipitate was dissolved in formic acid to the measure of the incorporation to protein. We could conclude that the effects of glyoxal were higher to the effects of methylglyoxal on the metabolism of the amino acids studied; Glyoxal and Methylglyoxal didn't show effects on the metabolism of glucose, lactate and acetate; Glyoxals didn't change the metabolism of glycine and glutamine in cerebral cortex of adults Wistar mouse; The utilization of anti-oxidants (N-acetylcysteine and trolox) didn't change the effects of the glyoxals on the metabolism of the amino acids; N-acetylcysteine and penicillamine showed an accentuate effect on the metabolism of the amino acids. This data didn't establish a mechanism for the effects of glyoxal. We speculate that the amount of the antioxidant trolox used in the research wasn't sufficient. The N-acetylcysteine and penicillamine showed an own effect the reason why we could not find a conclusion.

## Lista de Abreviaturas

AGEs= Advanced glycation end product (produtos avançados de glicação)

EPM= Erro Padrão da Média

ERO= Espécies Reativas do Oxigênio

GSH= Glutathiona

KRb= Tampão Krebs Ringer bicarbonato

NAC= N-acetil-cisteína

PI3K= fosfatidilinositol-3-cinase

POP= 2,5 Difeniloxazol

POPOP= (1,4di)-5-Fenil-2oxazolil-benzeno

RL = Radicais livres

SNC= Sistema Nervoso Central

TCA= Ácido tricloroacético

# 1. Introdução

## 1.1 *Diabetes Mellitus*

A *diabetes mellitus* tem se tornado uma notável preocupação em prevalência nos Estados Unidos e no mundo. A *diabetes mellitus* tipo 1 tem causa geralmente imunológica sendo um processo que se desenvolve rapidamente pela morte superior a 95% das células  $\beta$  do pâncreas secretoras de insulina, já a *diabetes mellitus* tipo 2 é uma síndrome de disfunção das células  $\beta$  do pâncreas envolvendo deficiência de insulina e a resistência à mesma. Muitas pessoas, como indivíduos obesos, desenvolvem a resistência à insulina sem desenvolver a *diabetes mellitus* tipo 2. Alguns indivíduos podem possuir intrinsecamente uma massa menor de células  $\beta$ , ou menos efetiva, são estes indivíduos em particular que apresentam um risco maior de vir a desenvolver *diabetes mellitus* tipo 2, se estes manifestarem a resistência à insulina (ROBERTSON R P et al 2006). Esta bem estabelecido que a *diabetes mellitus* é resultado de uma desordem do metabolismo dos carboidratos e dos lipídios, acompanhada de mudanças profundas no metabolismo das proteínas. (REUSCH J E B et al, 2006).

A aterosclerose e as doenças cardíacas são as maiores causas de morbidade e mortalidade em pacientes com *diabetes mellitus*. (REUSCH J E B et al, 2006). A patogênese da aterosclerose e da doença arterial coronariana é a mesma em pacientes diabéticos, ou com resistência a insulina. (REUSCH J E B et al, 2006).

A resistência à insulina, associada a *diabetes mellitus*, parece ser geneticamente determinada, mas sua ocorrência é claramente afetada por

fatores ambientais e processos secundários a *diabetes mellitus*. A resistência à insulina que leva a hiperglicemia é um dos primeiros fatores etiológicos na patogênese da doença micro vascular na *diabetes mellitus* e sua implicação em complicações macro vasculares posteriores.

Um possível mecanismo de dano ao tecido induzido por hiperglicemia persistente na *diabetes mellitus* é a formação de produtos avançados de glicação (PASSARELI M et al, 2005). Numerosos estudos têm indicado que a toxicidade da glicose tem por consequência o aumento na formação de  $\alpha$ -dialdeídos como o glioxal e o metilglioxal. A relação entre produtos avançados de glicação (AGEs) na hiperglicemia e sua bioquímica patológica poderá explicar muitas das mudanças fisiológicas ocorridas durante as complicações da diabetes mellitus. (SINGH R et al, 2001)

## **1.2 Produtos Avançados de Glicação (AGEs)**

Os AGEs são um grupo complexo e heterogêneo de compostos que têm sido associados com as complicações da diabetes mellitus. Endogenamente, açúcares reduzidos, como a glicose, reagem não enzimaticamente com grupos amino de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos através de uma série de reações que formam bases de Schiff seguida da formação de produtos de Amadori para a produção de AGEs. Este processo, conhecido por reação de Maillard, foi descrito em 1912 quando se percebeu que aminoácidos aquecidos na presença de açúcares reduzidos resultavam em uma coloração marrom amarelada. (SHANGARI et al, 2004).

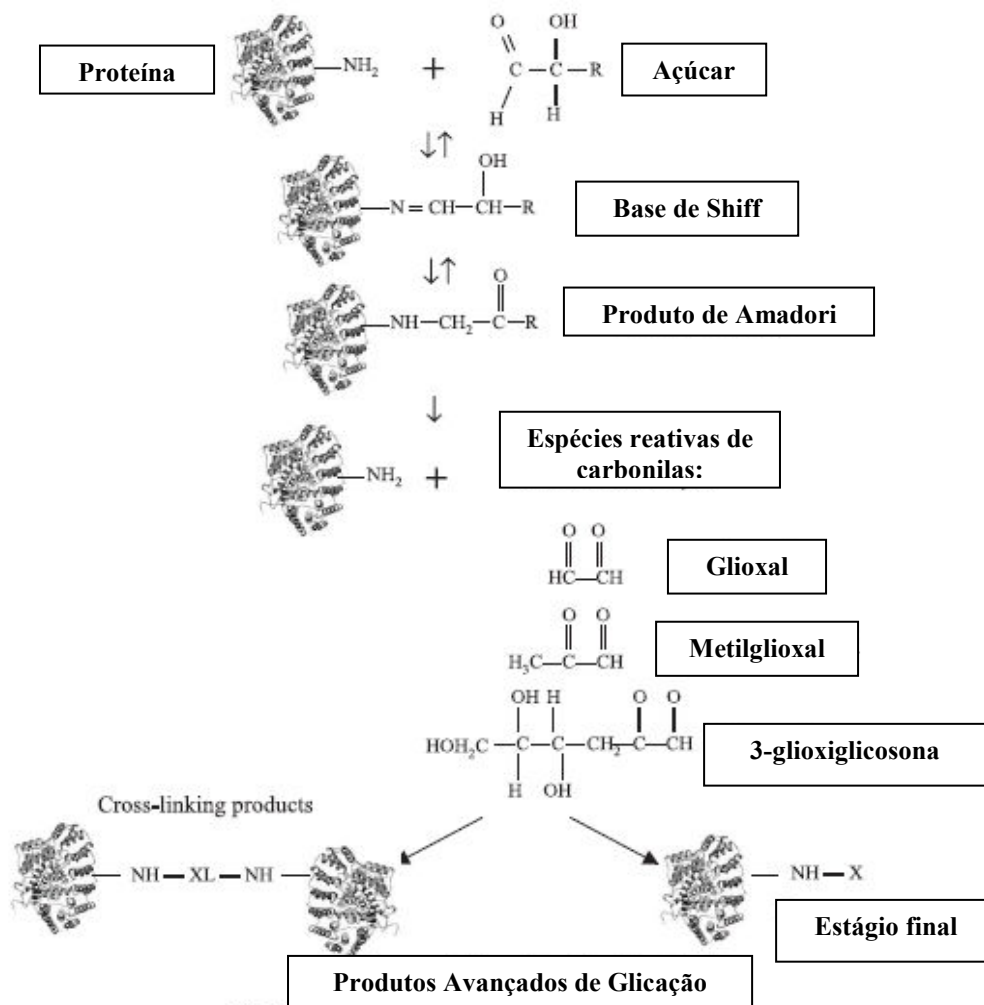


Fig. 1. The three steps of non-enzymatic glycation reaction.

**Figura a:** reação de Maillard, descrito em 1912. (SHANGARI et al, 2004).

A preparação de alimentos a elevadas temperaturas ( $130^\circ\text{C}$ ) é a principal fonte exógena dos AGEs. Este processo é dependente do tempo e da temperatura em que os alimentos são aquecidos, bem como da composição dos mesmos (SHANGARI et al, 2004).

Durante a reação de Maillard, alguns produtos intermediários são formados, estes são conhecidos como  $\alpha$ -dicarbonilas ou  $\alpha$ -oxaldeídos e incluem compostos como o gloixal e o metilgloixal. (SINGH R et al, 2001).

A produção intracelular de precursores dos AGEs produzem algumas conseqüências deletérias: 1- nas células endoteliais, modificam proteínas

intracelulares incluindo proteínas envolvidas na regulação da transcrição de genes; 2- os precursores dos AGEs podem difundir para fora da célula e modificar matrizes extracelulares próximas, modificando a sinalização entre a matriz e a célula e, assim, causando disfunção da célula; 3- os precursores dos AGEs difundem para fora da célula e modificam proteínas circulantes na corrente sanguínea como a albumina. A modificação destas proteínas circulantes pode ligar a receptores de AGEs e ativá-los causando assim a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, o que provocaria patologias vasculares. (BROWNLEE M et al, 2004)

### 1.3 Glioxal e Metilglioxal

O glioxal e o metilglioxal são espécies reativas de carbonilas com potente ação de glicação. Eles são formados pela degradação de proteínas glicadas, intermediários glicolíticos e peroxidação lipídica e reagem com proteínas para formar os AGEs (THORNALLEY P J et al, 2005).

Os efeitos tóxicos do glioxal e do metilglioxal são um dos fatores que contribuem para a etiopatogenia da doença cardiovascular, *diabetes mellitus*, doença de Parkinson e de Alzheimer (O'BRIEN et al, 2005; SHANGARY et al, 2003). As concentrações de glioxal e metilglioxal estão aumentadas em pacientes com *diabetes mellitus* e uremia. Estas dicarbonilas são em torno de 2000 vezes mais reativas que a glicose em reações de glicação (ZENG et al, 2006). O glioxal e o metilglioxal constituem uma parte significativa dos compostos carbonilas liberados pelos veículos automotores (GROSJEAN et al, 1984).

O glioxal é um dialdeído altamente reativo que se origina endogenamente da autooxidação da glicose e ascorbato, da oxidação do DNA e da peroxidação lipídica (SHANGARY et al, 2003, WELLS-KNECHT et al, 1995). A peroxidação lipídica é conhecida por ser uma cadeia de reações iniciada por lipídeos oxidados por radicais livres (HALLIWELL et al, 2000). Na presença de ERO os lipídios reagem com o oxigênio para produzir radicais alquila e peroxila que se propagam por uma cadeia de radicais livres e formam hidroperóxidos como produtos primários (DROGE W et al, 2002). Os radicais alcoxil e peroxil podem causar danos às membranas protéicas das células levando a modificação da estrutura e diminuição da fluidez da membrana celular resultando na alteração das suas propriedades fisiológicas. A destruição da membrana celular causa a perda da função das organelas podendo levar à morte celular (DROGE W et al, 2002). A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos.

O metilglioxal é formado a partir do gliceraldeído-3-P e da dihidroxiacetona-P, do catabolismo da glicina e treonina e do metabolismo da acetona (KALAPOUS MP et al, 1999). No jejum 37% do acetoacetato é transformado em acetona, na cetoacidose diabética esta porcentagem atinge 50% (OWEN et al, 1982; e REICHARD et al, 1986). Tanto o metilglioxal quanto o glioxal são agentes alcoilantes bifuncionais que reagem não enzimaticamente com grupos amino e sulfidril de biomoléculas, formando AGEs (THORNALLEY et al, 2001). Produtos de ligação cruzadas são formadas quando os propagadores (compostos como o glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona provenientes da degradação dos AGEs) reagem com a lisina; enquanto derivados do imidazol são formados com resíduos da arginina (ERYE et al,

2003; WESTWOOD et al, 1997). Glioxais reagem também com os grupos amino de DNA/RNA e lipídios (ROBERTS et al, 2003).

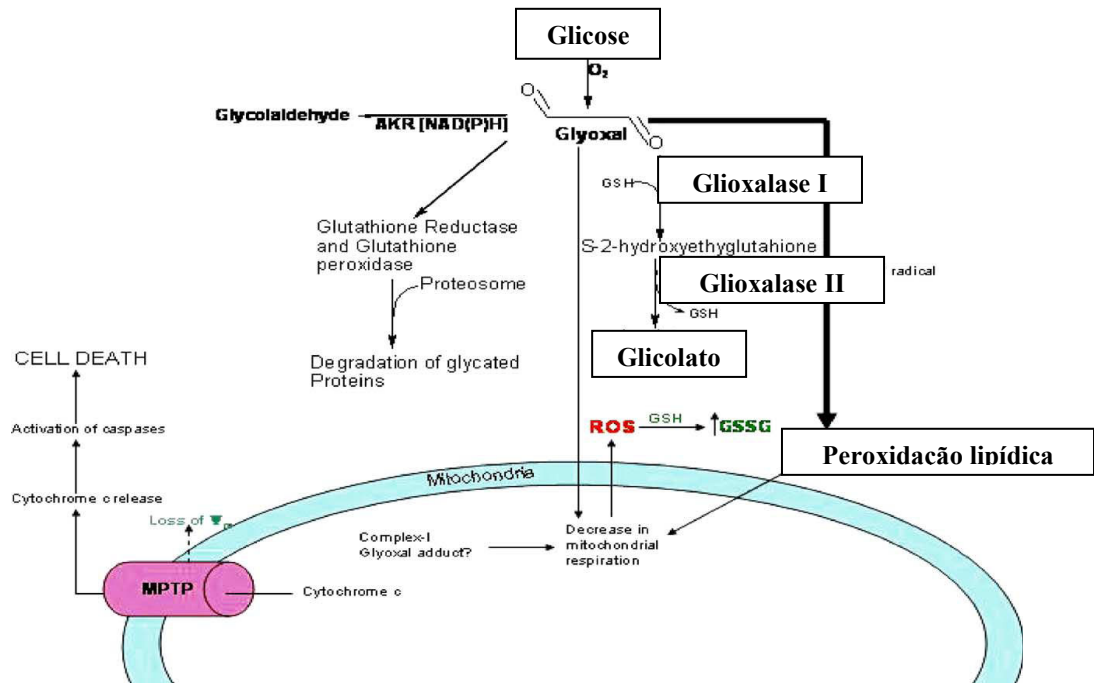
O acúmulo do glioxal, metilglioxal e de outros  $\alpha$ -oxaldeídos nas células levam a modificação do DNA, dando espaço a mutagênese e apoptose e a modificação de proteínas podendo levar a degradação de proteínas, inibição de enzimas e, ainda, respostas imunes mediadas por citocinas. O acúmulo celular de  $\alpha$ -oxaldeídos é esperado em contribuir para a toxicidade associada com a oxidação do GSH, na toxicidade química, e em patologias crônicas, como a *diabetes mellitus*, onde a formação do glioxal e do metilglioxal esta aumentada. Sendo assim, o aumento da glicação por  $\alpha$ -oxaldeídos é vista como uma conseqüência do estresse oxidativo. (THORNALLEY P J et al, 1999).

#### **1.4 Detoxificação dos glioxais: Sistema Glioxalase**

O glioxal e o metilglioxal são detoxificados endogenamente pelo sistema da glioxalase, que é presente no citosol de todas as células de mamíferos. (ABORDO et al, 1999). O sistema das redutases é menos importante na detoxificação dos glioxais, este sistema inclui a aldeído redutase e a carbonil redutase (VANDER et al, 1992). O sistema da glioxalase converte o glioxal a glicolato e o metilglioxal a D-lactato na presença de glutathiona (GSH). Este sistema é dependente de duas enzimas (a glioxalase I e glioxalase II) e ainda da glutathiona. (SHANGARI N et al, 2004). Os efeitos citotóxicos do glioxal e do metilglioxal nas células e tecidos ocorrem na maioria das vezes através da indução de espécies reativas de oxigênio (ERO). (LORETO S et al, 2004) Sob condições de estresse oxidativo, como na situação de hiperglicemia, onde



citocinas estão sendo liberadas os níveis de GSH diminuem e isto prejudica a detoxificação do glioxal e metilglioxal através do sistema da glioxalase. (SHANGARI et al, 2005).



**Figura b:** Sistema glioxalase de detoxificação dos glioxais. (SHANGARI N et al, 2004).

### 1.5 Alteração no metabolismo dos aminoácidos

Os AGEs são formados a partir das reações de aldeídos, como o glioxal e o metilglioxal, com grupos amino e grupos sulfidril de aminoácidos e proteínas (DAVIES M et al, 2006), assim, torna-se pertinente conhecer o metabolismo de alguns aminoácidos para a compreensão da ação dos glioxais.

A glicina é metabolizada por diferentes rotas. É produzida a partir da serina por uma reação reversível que envolve o tetraidrofolato. A glicina também transfere um átomo de carbono para o tetraidrofolato, formando metileno THFA,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_4^+$ . O tetraidrofolato é uma coenzima que transfere grupos de um

carbono com diferentes níveis de oxidação. A glicina pode ainda ser produzida através da degradação da treonina. A glicina é oxidada pela D-aminoácido oxidase. O produto, glioxalato, é convertido a glicina novamente por transaminação, então oxidado a oxalato ou oxidado a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A glicina é utilizada para a síntese da glutathione, bases púricas, bem como para a síntese do grupo heme. (SMITH C et al, 2004)

A alanina utilizada pelo SNC é proveniente da circulação, bem como da transaminação do piruvato no SNC. Leucina, valina, glutamina e glicina são os principais aminoácidos utilizados como nutrientes energéticos pelo SNC (FAGUNDES I et al, 2001). Mais de 1/3 do nitrogênio do grupo amino da glutamina é proveniente da leucina. A maioria da glutamina utilizada pelo SNC é sintetizada no mesmo. (YUDKOFF M et al, 1996).

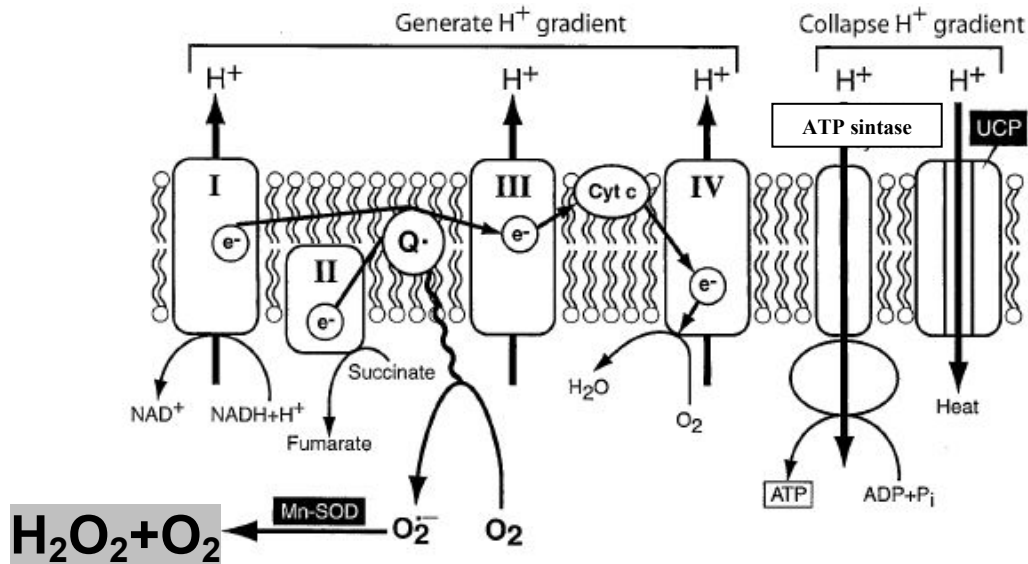
### **1.6 Possíveis agentes protetores da ação dos glioxais**

Existem quatro complexos protéicos na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, estes são chamados complexo I, II, III e IV. Quando a glicose é catabolizada pela via oxidativa propicia a formação de FADH<sub>2</sub> e NADH. O principal doador de elétron é o NADH, que doa elétrons para o complexo I. O outro doador de elétrons gerado pelo ciclo de Krebs é o FADH<sub>2</sub>, formado pela succinato desidrogenase, que doará elétrons para o complexo II. Os elétrons destes complexos passarão para a coenzima Q, e após, transferidos para o complexo III, citocromo-c, complexo IV e finalmente para a molécula de oxigênio que será então reduzida à água. (SMITH C et al, 2004)

O sistema de transporte de elétrons é organizado de maneira que os níveis de ATP possam ser precisamente regulados. O fluxo de elétrons ocorre do menor potencial para o maior potencial de redução, muito da energia do transporte de elétrons é usada para bombear prótons através da membrana. Nos complexos I, III e IV há liberação de energia que é utilizada para o transporte de prótons. Isto gera uma diferença de potencial eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. A energia deste gradiente de voltagem leva a síntese de ATP pela ATP-sintase. (SMITH C et al, 2004)

Na *diabetes mellitus* a captação de glicose pelas células endoteliais dos microvasos, células de Schwann, neurônios periféricos e células mensageiras do glomérulo renal é significativamente aumentada, o que ocasiona um aumento da oxidação do acetil-CoA no ciclo de Krebs, levando a um aumento da velocidade do transporte de prótons, com conseqüente aumento da diferença do potencial eletroquímico entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial. Quando esta diferença atinge um ponto crítico, ocorre um fluxo reverso para a coenzima e desta para o  $O_2$  gerando superóxido. A enzima superóxido dismutase transforma o superóxido em  $H_2O_2$ . A  $H_2O_2$  pode ser transformada em  $H_2O$  pela catalase e pela glutathione peroxidase; contudo a  $H_2O_2$  e o  $O_2^-$  pela reação de Haber-Wales formam o radical hidroxil, e a  $H_2O_2$  pela reação de Fenton também forma o mesmo radical. O grande aumento do radical hidroxil ocasiona quebra do DNA com conseqüente ativação da enzima poli (ADP) ribose polimerase. A enzima poli (ADP) ribose polimerase inibe a enzima gliceraldeído-3-P-desidrogenase o que ocasiona um grande aumento da via do polioliol, da hexosamina, ativação da PKC e a formação de AGEs, portanto o aumento do

estresse oxidativo seria o responsável pela ativação destas quatro vias. (BROWNLEE M et al, 2004)



**Figura c:** Hiperglicemia induz a produção de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. (BROWNLEE M et al, 2005)

Um excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) gerada no endotélio vascular e em tecidos como a retina, rim e coração em resposta a hiperglicemia têm sido apontados como responsáveis pelas complicações causadas pela *diabetes mellitus* e hiperglicemia (CERIELLO A et al, 2007). Particularmente, a disfunção endotelial causada na *diabetes mellitus* parece ser mediada por um excesso de ERO envolvendo o desacoplamento da cadeia respiratória, ativação da proteína cinase C (PKC), ativação da NAD(P)H oxidase, ativação da poli(ADP-ribose) (PAR) polimerase (PARP) e ativação de proteínas pró-apoptóticas. (CERIELLO A et al, 2007)

A hipótese de que a toxicidade da hiperglicemia é ligada ao estresse oxidativo já esta bem estabelecida, pela observação de que os efeitos adversos de altas concentrações de glicose na função das células  $\beta$  esta relacionado ao estresse oxidativo, o que poderia ser prevenido através de anti-oxidantes ou pela super expressão de enzimas antioxidantes. (GALINA A et al, 2004)

Sistemas produtores de  $H_2O_2$ , como as enzimas glicose oxidase e xantina oxidase; quando presentes no meio de incubação potenciam os efeitos deletérios do metilglioxal em hepatócitos (CERIELLO A et al, 2007)

### **1.6.1 Penicilamina**

O aminoácido trifuncional D-penicilamina, que contém um grupo tiol livre em sua estrutura, é usado para tratar artrite reumatóide, escleroderma e doença de Wilson. (SCOTT D et al, 2001) A penicilamina penetra a membrana de eritrócitos podendo causar alterações profundas no metabolismo celular (efeito em reações dependentes de CoA-SH, atuação no desacoplamento da fosforilação oxidativa e estimulação da glutathione peroxidase). Ainda, a penicilamina pode prejudicar proteínas envolvidas em processos mitóticos, DNA e RNA-polimerase e outras enzimas envolvidas na biossíntese de ácidos nucléicos (JELLUM E et al, 1977).

A D-penicilamina pode reduzir diretamente a síntese de proteína muscular, esta suposição existe a partir da observação de que a S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina diminui a síntese protéica de tecido cardíaco *in vitro*. A D-penicilamina pode também estar relacionada com mudanças metabólicas no músculo esquelético como a diminuição da síntese protéica. (SCOTT D et al, 2001).

### **1.6.2 N-acetil-cisteína (NAC)**

A cisteína é um aminoácido ocasionalmente essencial para os humanos por que podemos sintetizá-lo. Porém, esta síntese ocorre de maneira limitada e algumas vezes insuficiente para o nosso organismo. Muitos pesquisadores têm mostrado que a suplementação de cisteína atua com efeitos positivos. (DROGE W et al, 2005) O uso de N-acetil-cisteína resulta em uma série de ações promotoras de saúde em diferentes sistemas celulares (YOSHIHISA I et al, 2006)

LORETO S et al, 2004 mostrou que culturas de neurônios expostas a 100 µM de metilglioxal por 24 horas na presença de 10 mM de NAC não apresentaram os efeitos deletérios observados nas culturas de neurônios incubadas com metilglioxal na ausência de NAC.

A NAC é um precursor sintético da cisteína e do GSH e tem sido usada terapeuticamente em várias desordens relacionadas com estresse oxidativo. A NAC é considerada um antioxidante que aumenta as concentrações intracelulares de GSH, uma das principais defesas contra o estresse oxidativo. (YOSHIHISA I et al, 2006)

### **1.6.3 Trolox**

O Trolox é um análogo do alpha-tocoferol (Vitamina E), solúvel em água e é permeável a membrana plasmática mostrando a capacidade de proteger as células mamíferas contra o dano oxidativo. (EUM H A et al, 2004)

O α-tocoferol é considerado o antioxidante hidrofóbico mais eficaz, sendo capaz de proteger membranas celulares ao dano oxidativo. O Trolox (6-hidroxi-

2,5,7,8- tetrametilcromo- 2-ácido carboxílico), por ser solúvel em água, pode funcionar mais rapidamente na ação contra o estresse oxidativo do que o  $\alpha$ -tocoferol, que parece precisar de alguns dias de pré-tratamento para começar a demonstrar efeitos antioxidantes. (EUM H A et al, 2004)

Os glioxais mediante formação de AGEs também inativam enzimas como:  $\alpha$ -cetoglutaratodesidrogenase, tioredoxina redutase, GSH redutase, GSH peroxidase e a superóxido dismutase (SHANGARI et al, 2004). Assim, estes oxaldeídos podem ser considerados importantes pontos na descoberta de como a glicose poderá atuar na formação dos AGEs através da reação clássica de Maillard, da via do poliol, assim como do catabolismo de corpos cetônicos e treonina, e da peroxidação lipídica. O conhecimento aprofundado de possíveis inibidores ou substâncias que revertam os efeitos dos glioxais poderão auxiliar ao desenvolvimento de drogas que auxiliem o tratamento da *diabetes mellitus*. (BEILIN L et al, 2001).

## 1.7 Objetivos

Entendendo-se que os di-aldeídos como o glioxal e o metilglioxal reagem com grupos amino e grupos sulfidril de aminoácidos, proteínas e fosfolipídios podendo alterar enzimas e/ou substratos e, desta forma, interferir no metabolismo de aminoácidos e no metabolismo energético, este estudo teve como objetivo principal analisar os efeitos dos glioxais *in vitro* sobre o metabolismo dos aminoácidos glicina, leucina e alanina, bem como sobre o metabolismo da glicose e lactato, acetato e glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar de 10 dias de idade pós-natal e de ratos adultos com 3 meses de idade pós-natal.

### 1.7.1 Objetivos específicos

1- verificar os efeitos *in vitro* do glioxal e metilglioxal (400  $\mu$ M) sobre o metabolismo dos aminoácidos glicina (0,2 mM), leucina (0,2 mM) e alanina (0,2 mM) em córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal e de ratos adultos (3 meses de idade pós-natal).

2- verificar os efeitos da glicose oxidase + glioxal ou metilglioxal (400  $\mu$ M) sobre o metabolismo do aminoácido leucina em córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal.

3- verificar os efeitos da D-penicilamina e N-acetil-cisteína (substâncias que reagem com os glioxais) e de um anti-oxidante (TROLOX) + glioxal ou



metilglioxal sobre o metabolismo dos aminoácidos glicina, em córtex cerebral de ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal.

4- verificar os efeitos do glioxal e metilglioxal (400  $\mu\text{M}$ ) sobre o metabolismo do lactato (10 mM), glicose (5 mM) , acetato (1,0 mM) e glutamina (2,0 mM) em córtex cerebral de ratos Wistar de 10 dias de idade pós-natal e de ratos adultos (3 meses de idade pós-natal).

5- verificar os efeitos do glioxal (400  $\mu\text{M}$ ) ou metilglioxal (400  $\mu\text{M}$ ) sobre o metabolismo do acetato em concentração fisiológica de  $\text{K}^+$  (2,7 mM) e numa elevada concentração de  $\text{K}^+$  (50 mM). O  $\text{K}^+$  em concentrações elevadas aumenta a oxidação do acetato em astrócitos (WANIEWSKI et al, 1998; SCHWEIGERT et al, 2004) , processo dependente da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase.

## PARTE II

## Capítulo I

### **Materiais e Métodos**

#### **Materiais**

##### **Animais experimentais**

Utilizaram-se ratos albinos Wistar provenientes do “ratário” do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os ratos foram alimentados com dieta comercial (NUVILAB, Porto Alegre, Brasil) e água “ad libitum”, ambiente climatizado (21-23°C), submetidos a ciclos consecutivos de 12 horas claro/escuro.

#### **Regentes**

##### **Reagentes usados**

<b>REAGENTE</b>	
CLOROFÓRMIO	Merck S. A Porto Alegre. RS. Brasil
ÁCIDO FÓRMICO	Merck S. A Porto Alegre. RS. Brasil
METANOL	Merck S. A Porto Alegre. RS. Brasil
TOLUENO	Merck S. A Porto Alegre. RS. Brasil
ÁCIDO TRICLOROACÉTICO	Merck S. A Porto Alegre. RS. Brasil
HIDRÓXIDO DE SÓDIO	Merck S. A Porto Alegre. RS. Brasil
D-GLICOSE p.a	reagem Quimbrás Indústrias Químicas S.A Rio de Janeiro- RJ- Brasil
GLICINA	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
L-LEUCINA	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
ALANINA	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA

GLUTAMINA	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
ACETATO	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
LACTATO	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
GLICOSE OXIDASE	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
POP E POPOP	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
OPTIPHASE-‘HI SAFE’3	Perkin Elmer do Brasil Ltda. São Paulo- SP- Brasil
N-ACETILCISTEÍNA	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
TROLOX	Fluka – Steinhein/ Alemanha
PENICILAMINA	Sigma Chemicals Company – St. Louis/EUA
TRITON X100	Vetec química Ltda. – Rio de Janeiro/RJ.

#### **Atividade específica dos compostos radioativos utilizados**

COMPOSTO	ATIVIDADE ESPÉCÍFICA
Leucina	54 mCui/ mmol
Lactato	152 mCui/ mmol
Alanina	156 mCui/ mmol
Glutamina	277 mCui/ mmol
Acetato	56,5 mCui/ mmol
Glicina	101 mCui/ mmol
Glicose	297 mCui/ mmol

## Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar de 10 e 90 dias de vida pós-natal. Optou-se por estas idades, tendo em vista que 10 dias de idade pós-natal constitui-se em uma idade de rápido crescimento cerebral e 90 dias de idade pós-natal corresponde à idade adulta. O SNC de ratos de até 15 dias de vida pós-natal apresenta uma elevada síntese protéica. A síntese protéica cerebral em ratos de 10 dias é em média 8 vezes superior à síntese protéica cerebral de ratos adultos (OLIVEIRA K R et al, 2002); por este motivo não determinamos a síntese protéica cerebral em ratos adultos.

## Métodos

Solução tampão Krebs Ringer Bicarbonato (KRb)

Abaixo estão relacionados os sais utilizados na composição da solução do tampão Krebs Ringer Bicarbonato (Krb), bem como suas respectivas concentrações:

Sal	Molaridade
NaCl	118,00 mM
KCl	4,61 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,00 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,50 mM
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,76 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,50 mM

## Solução Dulbbeco

Abaixo estão relacionados os sais utilizados na composição da solução do tampão Dulbbeco normal, bem como suas respectivas concentrações:

Sal	Molaridade
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,7 mM
NaCl	109 mM
KCl	2,7 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,9 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,49 mM

Abaixo estão relacionados os sais utilizados na composição da solução do tampão Dulbbeco com concentração de K<sup>+</sup> aumentada, bem como suas respectivas concentrações:

Sal	Molaridade
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,7 mM
NaCl	59 mM
KCl	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,9 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,49 mM

Previamente ao uso, a solução foi aerada numa mistura de gases contendo 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos. O pH da solução foi acertado em 7,4.

## **Diluição das drogas**

Para diluição do glioxal, foram pipetados 20  $\mu$ L de glioxal 8,8 M + 640  $\mu$ L de tampão KRb. Depois de homogeneizada a solução, pipetou-se 15  $\mu$ L desta solução + 10 mL de tampão KRb. Nos experimentos com 1 mM, 2 mM e 5 mM de N-acetilcisteína foram pipetados na solução com glioxal 1,5 mg, 3 mg e 7,5 mg de N-acetilcisteína respectivamente. Nos experimentos com 1 mM, 2 mM e 5 mM de Penicilamina foram pipetados na solução com glioxal 1,5 mg, 3 mg e 7,5 mg de Penicilamina respectivamente. No experimento com 10  $\mu$ M de Trolox, a partir de uma solução mãe de Trolox (10 mM) foram pipetados 500  $\mu$ L desta solução mãe + 9,5 mL da solução glioxal.

## **Obtenção do tecido**

Ratos de 10 dias de idade pós-natal e adultos (3 meses de idade pós-natal) foram sacrificados por decapitação. As estruturas do SNC estudadas – córtex – foram isoladas, lavadas em solução Krb em placas de Petry invertidas com papel filtro umedecido, à temperatura de 4°C. Os vasos sangüíneos visíveis nesse momento foram removidos. Rapidamente, após este procedimento, as estruturas foram pesadas. Córtex cerebrais entre 45 e 55 mg foram fatiados (“McIlwain chopper”) de tecidos, obtendo-se espessura de 300  $\mu$ m.

Condições para incubação com precursor radioativo para determinação de  $\text{CO}_2$ , síntese de lipídeos e incorporação de proteínas.

Conforme previamente determinado pelo laboratório, concentrações de 0,2 mM dos substratos acima citados foram utilizados para os experimentos de oxidação a CO<sub>2</sub>, síntese de lipídeos e incorporação de proteínas, tendo em vista que esta concentração é aproximadamente a metade da concentração saturante para os processos metabólicos acima analisados.

### **Oxidação de substratos a CO<sub>2</sub>**

Para a medida de incorporação à proteínas, síntese lipídica e produção de CO<sub>2</sub>, fatias de tecido cerebral foram incubadas em: 1- 5 mM D-glicose + 0.2 mM de alanina + 0.2 µCi de L-[U-<sup>14</sup>C]Alanina; 2- 5 mM D-glicose + 0.2 mM de leucina + 0.2 µCi de L-[U-<sup>14</sup>C]Leucina; 3- 5 mM D-glicose + 0.2 mM de glicina + 0.2 µCi de [U-<sup>14</sup>C]Glicina; 4- 5 mM D-glicose + 1 mM de acetato + 0.2 µCi de [U-<sup>14</sup>C]Acetato e 5- 10 mM de Lactato + 0.2 µCi de L-[U-<sup>14</sup>C]Lactato. As incubações foram realizadas em frascos fechados com tampa de borracha após o conteúdo ter sido gaseificado com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub>: 5% de CO<sub>2</sub> por 10 minutos. A tampa de borracha foi adaptada de modo a permitir a entrada de uma estrutura de vidro (pocinho) cujo centro continha um papel filtro dobrado em W. As fatias de tecido cerebral foram incubadas a 37°C durante 1 hora em banho metabólico Dubnoff, com agitação (60 ciclos/min), de acordo com método de Dunlop et al, 1975. A incubação foi interrompida pela adição de 0,20 mL de TCA 50% diretamente no meio de incubação contendo as fatias cerebrais através da tampa de borracha. 0,10 mL de hidróxido de sódio 2 M foi injetado no centro dos frascos de incubação (pocinho), que foram novamente vedados com parafilme. Posteriormente, os frascos foram agitados por 30 minutos a 35°C para captar CO<sub>2</sub>. A seguir, o



conteúdo dos pocinhos (papéis filtros na forma de W) foi transferido para eppendorfs com auxílio de pinça e pipeta automática. Em cada eppendorf foram adicionados 1,5 mL de líquido de cintilação OPTI-PHASE, e a radioatividade incorporada foi medida em contador de cintilação líquida (WALLAC 1409). Os resultados foram expressos em pmoles de aminoácidos oxidados a CO<sub>2</sub> / hora/ mg de estrutura cerebral.

### **Síntese de Lipídeos**

A seguir, as estruturas, juntamente com o meio de incubação, foram homogeneizadas em Potter Elvjhem, o qual foi lavado com 1,0 mL de TCA 10%, e seu conteúdo transferido para tubos de ensaio. Os tubos de ensaio foram centrifugados por 10 minutos a 2000g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 1,0 mL de TCA 10%. Este último passo de lavagem foi repetido por mais duas vezes. Os tubos de ensaio contendo o precipitado permaneceram invertidos sobre papel absorvente por aproximadamente 12 horas.

Para extração de lipídeos, o precipitado seco foi ressuspensionado com 1,0 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v:v). Os tubos de ensaio foram vedados com parafilme e submetidos à agitação por 10 minutos. Após os tubos terem sido centrifugados por 10 minutos a 2000 g, o sobrenadante de cada tubo de ensaio foi transferido para vials com auxílio de pipeta Pausteur, repetindo-se este processo por mais duas vezes.

Após a evaporação total da fase clorofórmio: metanol nos “vials” foram acrescentados 8,0 ml de líquido de cintilação POP/POPOP TOLUENO, e a radioatividade incorporada foi medida em contador de cintilação líquida WALLAC

1409. Os resultados foram expressos em pmoles de nutriente convertido a lipídeos / hora/ mg de tecido cerebral.

### **Síntese protéica**

O precipitado resultante da lavagem com clorofórmio: metanol (2:1) permaneceu por 12 horas invertido sobre papel absorvente até a evaporação completa, sendo então dissolvido com 0,4 ml de ácido fórmico concentrado e submetido à agitação. O material resultante foi transferido com auxílio de pipeta Pasteur, juntamente com oito ml de POP-POPOP Triton (300 mg de POPOP, 4,0 g e POP, 780 ml de Tolueno, 170 ml de etanol e 500 ml de Triton X-100) para “vials”, medindo-se a radioatividade que representa a incorporação do aminoácido em proteína.

Todos os resultados foram expressos considerando-se a atividade específica inicial do meio de incubação. Foram realizadas curvas de tempo de incubação nas quais as velocidades das reações (síntese protéica, síntese de lipídios e oxidação dos substratos a CO<sub>2</sub>) se mantiveram constante por um período de 3 h.

O metabolismo de glicina, acetato e glutamina foram estudados em ratos de 10 dias de idade pós-natal e ratos adultos (3 meses de idade), o metabolismo de leucina, alanina, glicose e lactato foram estudados em ratos de 10 dias de idade pós-natal.

## **Análise estatística**

Os resultados experimentais expressos como média e +- erro padrão da média (E.P.M.) foram submetidos ao tratamento estatístico da Análise de Variância de uma via, usando-se o programa SPSS/PC – Plus. As comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de múltipla amplitude de Duncan, ou teste t de student, quando pertinente. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

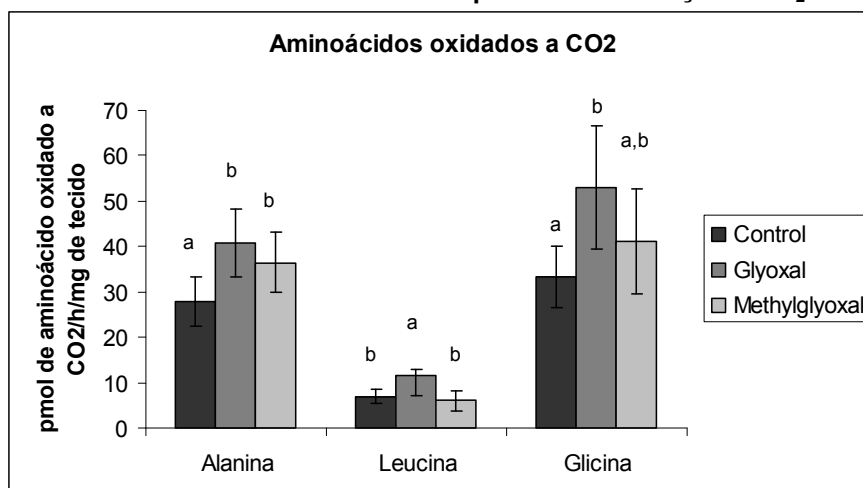
## Capítulo II

### **2 Resultados**

#### **2.1 Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Oxidação a CO<sub>2</sub>, conversão a lipídeos e síntese protéica.**

Incubamos córtex cerebral (45 mg-55 mg) de ratos Wistar com 10 dias de idade pós-natal utilizando os aminoácidos alanina (0,2 mM), leucina (0,2 mM), glicina (0,2 mM), separadamente como substratos + 0,2 µCi do respectivo aminoácido radioativo nos seguinte meios: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2 µCi aa); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2 µCi aa+ 400 µM glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2 µCi aa + 400 µM metilglioxal). Observamos um aumento na oxidação da alanina, da leucina e da glicina a CO<sub>2</sub> no grupo glioxal quando comparado com o grupo controle (p<0,05). O metilglioxal aumentou significativamente a oxidação da alanina a CO<sub>2</sub> (figura 1).

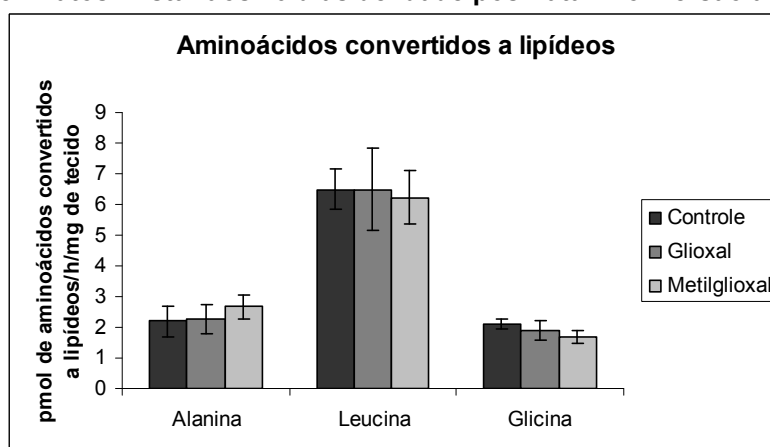
**Figura 1- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 0,2 mM de alanina ou 0,2 mM de leucina ou 0,2 mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci do respectivo aminoácido radioativo. 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa+ 400  $\mu$ M glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa + 400  $\mu$ M metilglioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a diferente de b  $p < 0,05$ .

O glioxal e o metilglioxal não modificaram a conversão dos aminoácidos alanina, leucina e glicina a lipídios em relação ao grupo controle (figura 2).

**Figura 2- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Conversão à Lipídeos.**

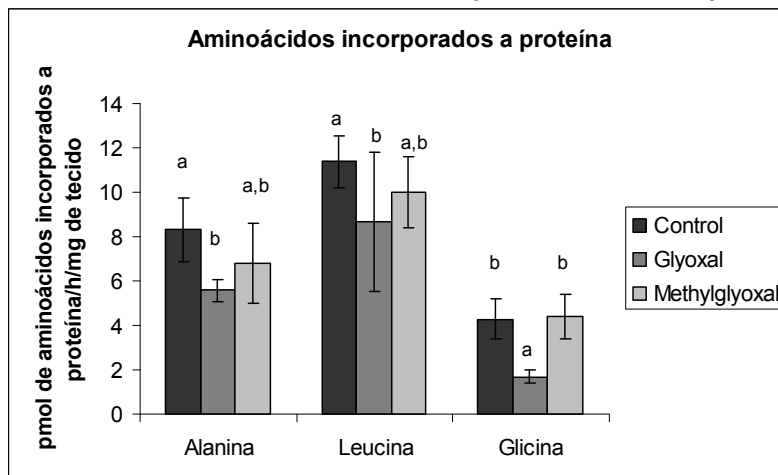


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 0,2mM de alanina ou 0,2mM de leucina ou 0,2mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci do respectivo aminoácido radioativo. 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa+ 400 $\mu$ M glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa + 400 $\mu$ M metilglioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7.

A análise da síntese protéica no mesmo experimento mostrou que usando tanto a alanina quanto a leucina e a glicina como substrato, houve uma queda na

síntese protéica do grupo glioxal em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não encontramos diferença estatística entre o grupo metilglioxal e grupo controle, nem entre o grupo metilglioxal e grupo glioxal. (figura 3)

**Figura 3- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da alanina, leucina e glicina em ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal. Síntese protéica.**



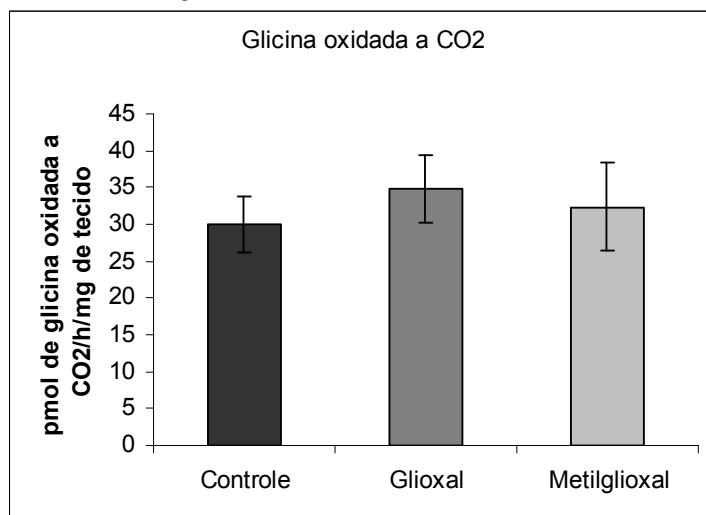
Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 0,2mM de alanina ou 0,2mM de leucina ou 0,2mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci do respectivo aminoácido radioativo. 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa+ 400 $\mu$ M glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de aa + 0,2  $\mu$ Ci aa + 400 $\mu$ M metilglioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a diferente de b  $p < 0,05$ .

## 2.2 Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal). Oxidação a CO<sub>2</sub>, conversão à lipídeos e síntese protéica.

Foram incubadas fatias de córtex cerebral (45 mg-55 mg) fatiadas a 300  $\mu$ m de espessura de ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal), em diferentes meios: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] glicina); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400 $\mu$ M glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400  $\mu$ M metilglioxal). O glioxal e o metilglioxal não alteraram

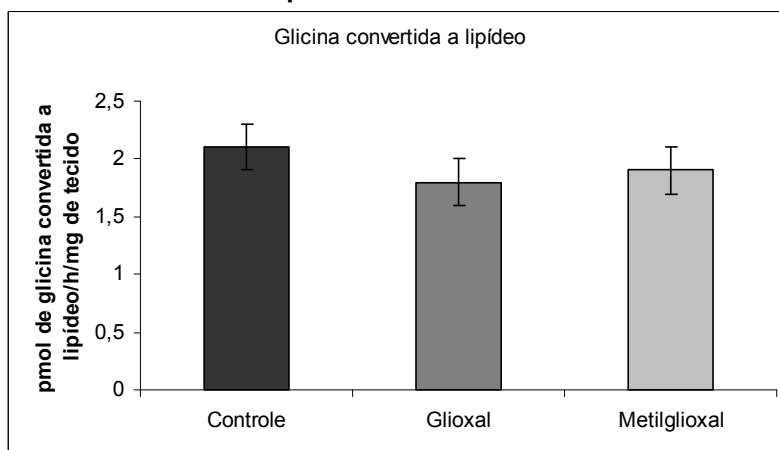
o metabolismo (oxidação a CO<sub>2</sub>, conversão a lipídios e incorporação a proteínas) da glicina em relação ao grupo controle; figuras 4, 5 e 6 respectivamente.

**Figura 4- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



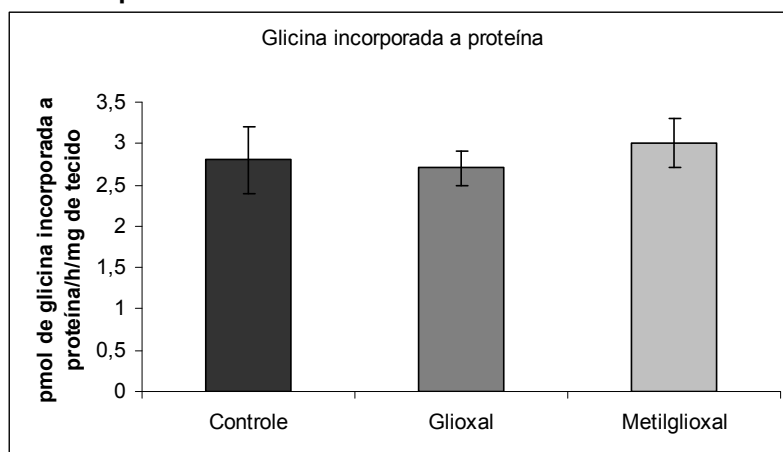
Córtex cerebral de ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal) incubados com 0,2mM glicina. 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] glicina); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400µM glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400µM metilglioxal). Valores são expressos como média ± DP. n=7.

**Figura 5- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos. Conversão a lipídeos.**



Córtex cerebral de ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal) incubados com 0,2mM glicina. 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] glicina); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400µM glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400µM metilglioxal). Valores são expressos como média ± DP. n=7.

**Figura 6- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glicina em ratos Wistar adultos. Síntese protéica.**



Córtex cerebral de ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal) incubados com 0,2mM glicina. 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] glicina); 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400 $\mu$ M glioxal); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] glicina + 400 $\mu$ M metilglioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7.

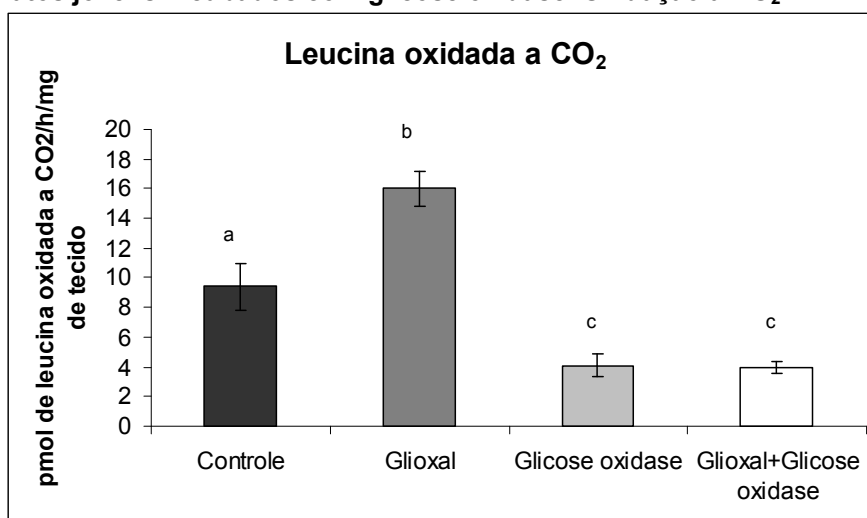
### **2.3 Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal incubados com glicose oxidase. Oxidação a CO<sub>2</sub>, conversão a lipídeos e síntese protéica.**

Foram incubadas amostras de córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal utilizando-se leucina 0,2 mM como substrato + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina em quatro grupos diferentes: 1- grupo controle (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina) ; 2- grupo glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- grupo glicose oxidase (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 1U de glicose oxidase) ; e 4- grupo glicose oxidase + glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 1U de glicose oxidase + 400  $\mu$ M glioxal).



O glioxal aumentou significativamente a oxidação da leucina a CO<sub>2</sub> ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao grupo controle. Os grupos (glioxal + glicose oxidase) e glicose oxidase diminuíram significativamente ( $p \leq 0,01$ ) a oxidação de leucina a CO<sub>2</sub>. Os grupos glicose oxidase + glioxal e o grupo glicose oxidase não apresentaram diferença estatística entre si (figura 7).

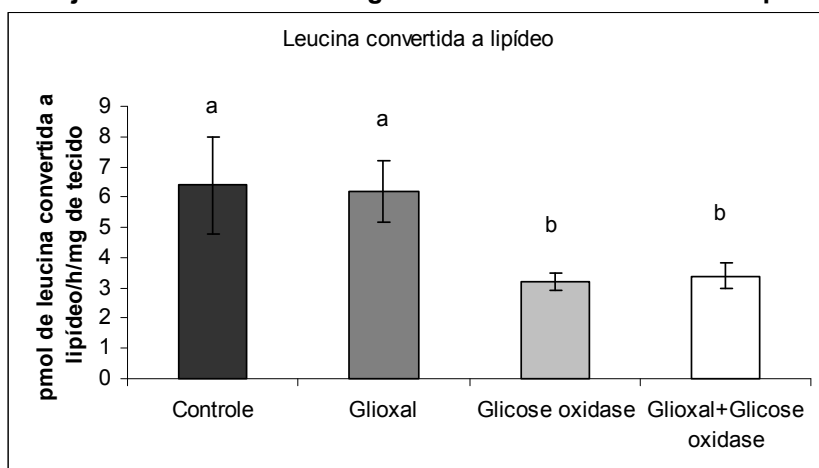
**Figura 7- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos jovens incubados com glicose oxidase. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina. 1- grupo controle (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina) ; 2- grupo glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- grupo glicose oxidase (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 1U de glicose oxidase); e 4- grupo glicose oxidase + glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 1U de glicose oxidase + 400  $\mu$ M glioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b  $p < 0,05$  que difere de c.  $p < 0,01$ .

Quanto à conversão de leucina a lipídeos não houve diferença estatística entre os grupos controle e glioxal. Os grupos glicose oxidase e glicose oxidase + glioxal também não diferiram entre si estatisticamente, porém diferiram significativamente dos grupos controle e do grupo glioxal,  $p \leq 0,01$  (figura 8).

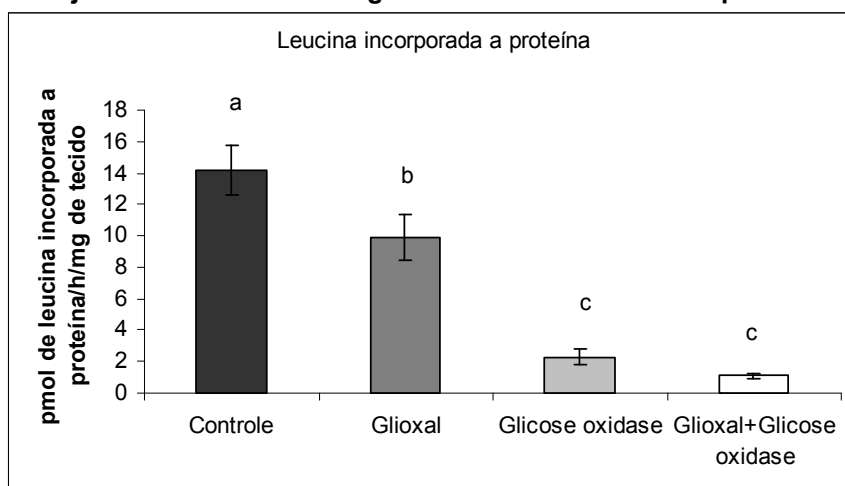
**Figura 8- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos jovens incubados com glicose oxidase. Conversão a lipídeos**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina. 1- grupo controle (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina) ; 2- grupo glioxal (tampão KRb pH 7,4+ 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- grupo glicose oxidase (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 1U de glicose oxidase) ; e 4- grupo glicose oxidase + glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 1U de glicose oxidase + 400 $\mu$ M glioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b. p<0,01.

Quanto à síntese protéica, ocorreu uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e o grupo glioxal, onde ocorreu uma redução da síntese protéica no grupo glioxal em relação ao grupo controle, como já observado nos experimentos acima descritos. O glioxal diminuiu significativamente a síntese protéica a partir de leucina em córtex cerebral de ratos de 10 dias de vida pós-natal em relação ao grupo controle,  $p \leq 0,05$  (figura 9). Os grupos glicose oxidase e glioxal + glicose oxidase não diferiram entre si, porém a síntese protéica nestes grupos foi cerca de 4 vezes menor do que a dos grupos controle e glioxal ( $p \leq 0,01$ ) (figura 9).

**Figura 9- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da leucina em córtex cerebral de ratos jovens incubados com glicose oxidase. Síntese de proteína.**

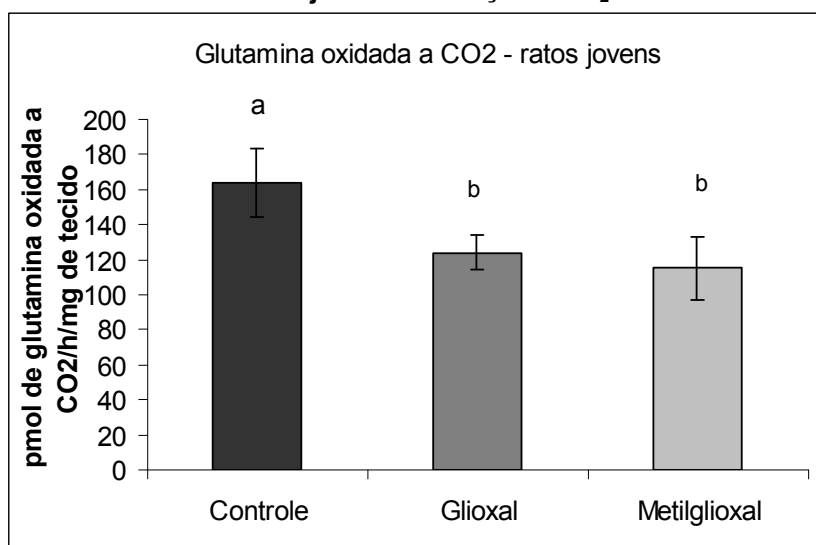


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina. 1- grupo controle (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina) ; 2- grupo glioxal (tampão KRb pH 7,4+ 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- grupo glicose oxidase (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina +1U de glicose oxidase) ; e 4- grupo glicose oxidase + glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10,0 mM de D-glicose + 0,2 mM leucina + 0,2  $\mu$ Ci L-[U-<sup>14</sup>C] leucina +1U de glicose oxidase + 400 $\mu$ M glioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b  $p<0,05$  que difere de c.  $p<0,01$ .

## **2.4 Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) e adultos (3 meses de idade pós-natal). Oxidação a CO<sub>2</sub>.**

Quando incubado córtex cerebral de ratos Wistar com 10 dias de idade pós-natal com glioxal 400  $\mu$ M e com metilglioxal 400  $\mu$ M, separadamente; utilizando-se glutamina 2,0 mM como substrato + 0,2  $\mu$ Ci de L-[U-<sup>14</sup>C] glutamina, verificamos que os grupos incubados com a adição destes aldeídos apresentaram uma oxidação da glutamina a CO<sub>2</sub> significativamente inferior a do grupo controle, sem adição de aldeídos,  $p\leq 0,05$ . Nenhuma diferença foi observada entre os grupos glioxal e o grupo metilglioxal. (figura 10).

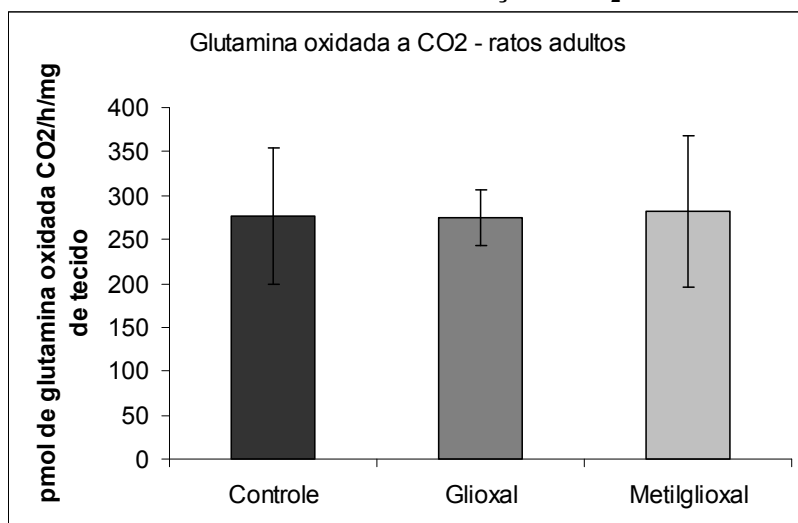
**Figura 10 - Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar jovens. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 2,0 mM glutamina + 0,2  $\mu$ Ci de L-[U-<sup>14</sup>C] glutamina. Grupo controle: tampão KRb pH 7,4; Grupo Glioxal: tampão KRb pH 7,4 + 400 $\mu$ M de Glioxal; Grupo Metilglioxal: tampão KRb pH 7,4 + 400  $\mu$ M de Metilglioxal. Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a diferente de b. p<0,05.

Experimento semelhante foi repetido em ratos adultos com 3 meses de idade pós-natal, sendo a amostra de córtex cerebral fatiada a espessura de 300  $\mu$ m. Nenhuma diferença na oxidação da glutamina a CO<sub>2</sub> foi observada entre os três grupos. (figura 11)

**Figura 11- Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo da glutamina em córtex cerebral de ratos Wistar adultos. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



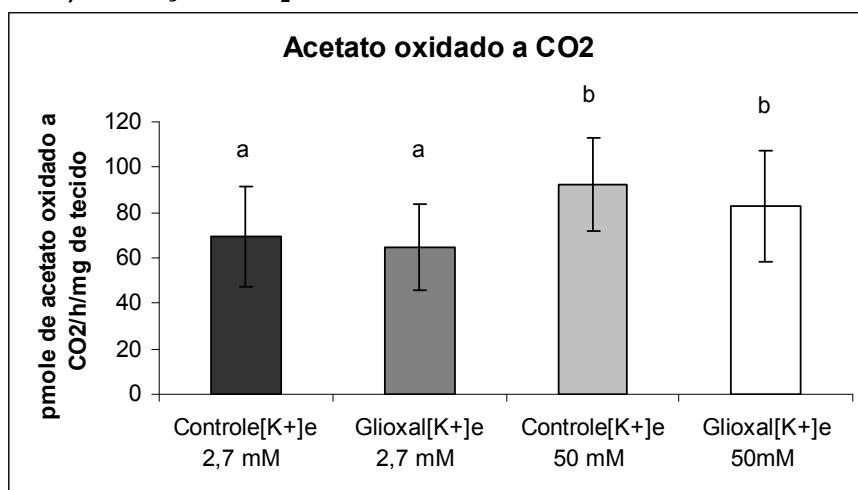
Córtex cerebral de ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal) incubados com 2,0 mM glutamina + 0,2  $\mu$ Ci de L-[U-<sup>14</sup>C] glutamina. Grupo controle: tampão KRb pH 7,4; Grupo Glioxal: tampão KRb pH 7,4 + 400 $\mu$ M de Glioxal; Grupo Metilglioxal: tampão KRb pH 7,4 + 400 $\mu$ M de Metilglioxal. Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a diferente de b. p<0,05.

**2.5 Efeitos do glioxal sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de ratos jovens em concentrações fisiológicas de K<sup>+</sup> (2,7 mM) e numa elevada concentração de K<sup>+</sup> (50 mM). O K<sup>+</sup> em concentrações elevadas aumenta a oxidação do acetato em astrócitos (WANIEWSKI et al, 1998; SCHWEIGERT et col, 2004), processo dependente da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**

Neste experimento as fatias de córtex cerebral (55 mg- 45 mg) de ratos Wistar de 10 dias de idade pós-natal foram incubadas nos seguintes meios: 1- (tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=2,7 mM) +1mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] acetato); 2 -(tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=2,7 mM) +1mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] acetato+ 400  $\mu$ M glioxal); 3- (tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=50 mM) +1 mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] acetato); 4-(tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=50 mM) +1 mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] acetato+ 400  $\mu$ M glioxal). A adição de glioxal aos meios de incubações não modificou significativamente a oxidação de acetato a CO<sub>2</sub> em relação aos meios sem adição de glioxal. A oxidação de

acetato a CO<sub>2</sub> foi significativamente superior nos com [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> =50 mM em relação aos meios com [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> = 2,7 mM , p≤ 0,05 (figura 12).

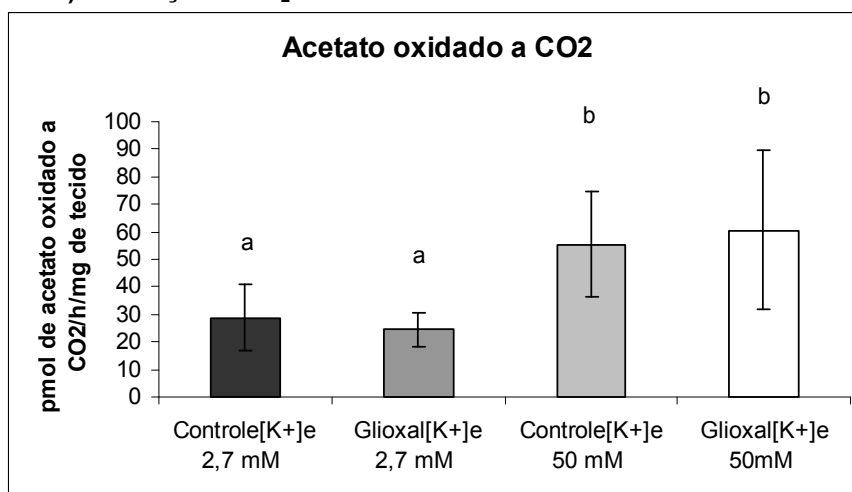
**Figura 12- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de ratos jovens em concentrações fisiológicas de K<sup>+</sup> (2,7 mM) e numa elevada concentração de K<sup>+</sup> (50 mM). Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com 1- (tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=2,7 mM) +1mM de acetato + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] acetato); 2 - (tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=2,7 mM) +1mM de acetato + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] acetato+ 400 µM glioxal); 3- (tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=50 mM) +1mM de acetato + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] acetato); 4-(tampão Dulbbeco pH 7,4 (K<sup>+</sup>=50 mM) +1mM de acetato + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] acetato+ 400 µM glioxal). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a diferente de b. p<0,05.

Experimento semelhante foi repetido em ratos adultos com 3 meses de idade pós-natal, sendo a amostra de córtex cerebral fatiada a espessura de 300 µm. A adição de glioxal aos meios de incubações não modificou significativamente a oxidação de acetato a CO<sub>2</sub> em relação aos meios sem adição de glioxal. A oxidação de acetato a CO<sub>2</sub> foi significativamente superior nos com [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> =50 mM em relação aos meios com [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub> = 2,7 mM , p≤ 0,05 (figura 13)

**Figura 13 - Efeitos do glioxal sobre o metabolismo do acetato em córtex cerebral de ratos adultos em concentrações fisiológicas de  $K^+$  (2,7 mM) e numa elevada concentração de  $K^+$  (50 mM). Oxidação a  $CO_2$ .**



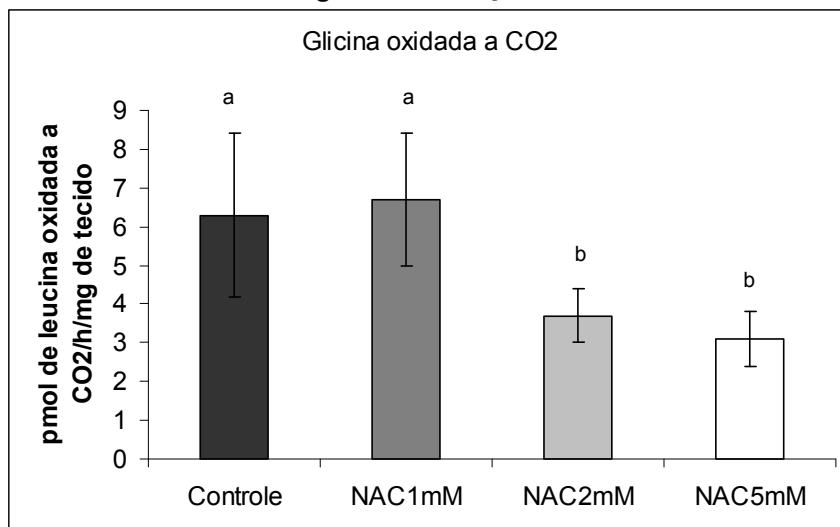
Córtex cerebral de ratos Wistar adultos (3 meses de idade pós-natal) incubados com 1- (tampão Dulbecco pH 7,4 ( $K^+$ =2,7 mM) +1 mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ] acetato); 2 - (tampão Dulbecco pH 7,4 ( $K^+$ =2,7 mM) +1 mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ] acetato+ 400  $\mu$ M glioxal); 3- (tampão Dulbecco pH 7,4 ( $K^+$ =50 mM) +1 mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ] acetato); 4-(tampão Dulbecco pH 7,4 ( $K^+$ =50 mM) +1 mM de acetato + 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ] acetato+ 400  $\mu$ M glioxal). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a diferente de b.  $p < 0,05$ .

## **2.6 Efeitos da N-acetil-cisteína e da Penicilamina em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Oxidação a $CO_2$ , conversão a lipídeos e síntese protéica.**

Para avaliar o efeito da NAC sem a ação do glioxal incubamos córtex cerebral de ratos de 10 dias de vida pós-natal com os seguintes meios: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ]glicina); 2- NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ]glicina + 1mM de NAC); 3- NAC2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ]glicina + 2mM de NAC); e 4- NAC5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [ $U-^{14}C$ ]glicina + 5 mM de NAC). Como pode ser observado na figura 14, 1 mM de NAC não alterou a oxidação da glicina a  $CO_2$  em relação ao grupo controle. 2 mM de NAC e 5 mM de NAC diminuíram significativamente

( $p < 0,05$ ) a oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  em relação ao grupo controle em ratos com 10 dias de vida pós-natal.

**Figura 14 - Efeitos da N-acetil-cisteína em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Oxidação a  $\text{CO}_2$ .**

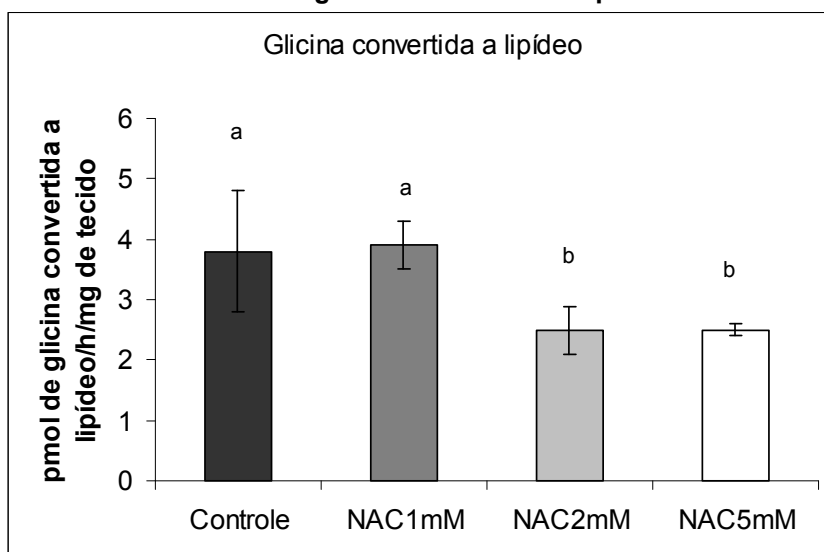


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]glicina; 2- NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]glicina + 1mM de NAC); 3- NAC2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]glicina + 2mM de NAC); e 4- NAC5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]glicina + 5mM de NAC). Valores são expressos como média  $\pm$  DP.  $n=7$ . a difere de b.  $p < 0,05$ .

Como pode ser observado na figura 15, 2 mM de NAC e 5 mM de NAC diminuiram a conversão da glicina a lipídeos estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. 1 mM de NAC não mostrou diferença em relação ao grupo controle em ratos com 10 dias de idade pós-natal.



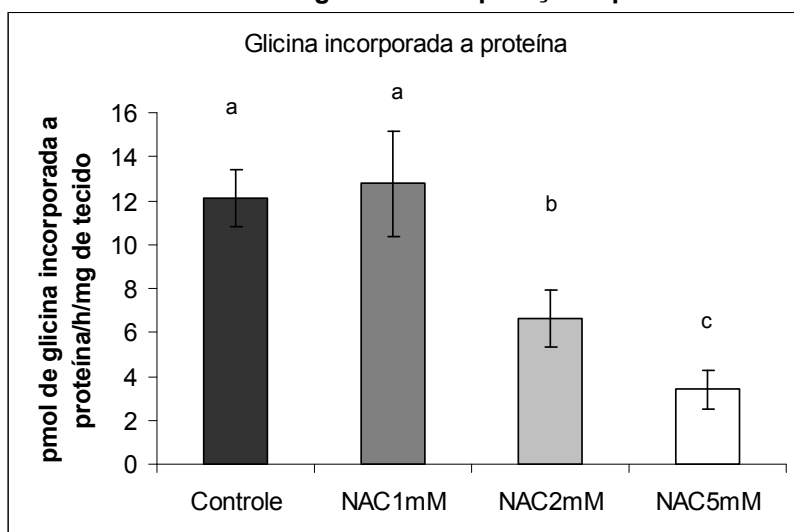
**Figura 15 - Efeitos da N-acetil-cisteína em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Conversão a lipídeos.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 1mM de NAC); 3- NAC2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 2mM de NAC); e 4- NAC5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 5mM de NAC). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b. p<0,05.

A figura 16 mostra que a incorporação de glicina a proteína é semelhante entre o grupo controle e o grupo com 1 mM de NAC. 2 mM de NAC diminui a incorporação de glicina a proteína estatisticamente em relação ao grupo controle (p<0,05), assim como 5 mM de NAC em relação ao grupo controle (p<0,01).

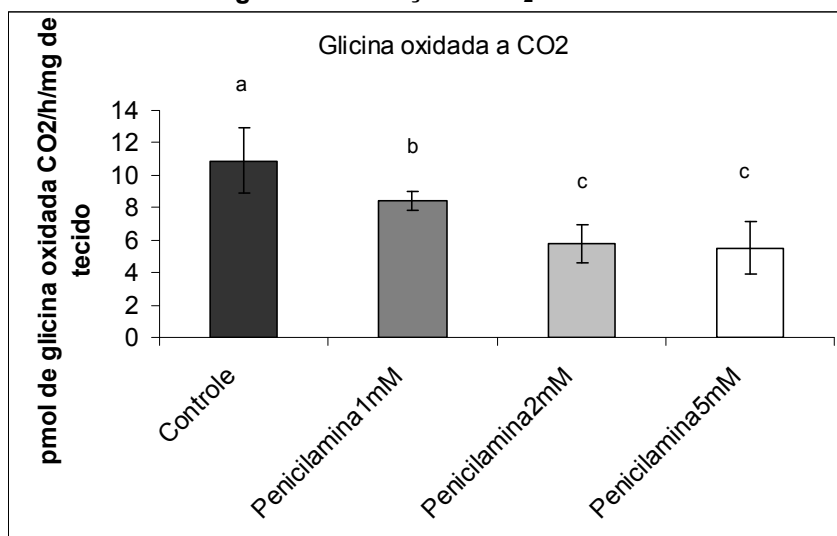
**Figura 16 - Efeitos da N-acetil-cisteína em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Incorporação a proteína.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 1mM de NAC); 3- NAC2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 2mM de NAC); e 4- NAC5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 5mM de NAC). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b p<0,05 que difere de c. p<0,01.

Experimento semelhante foi realizado com a penicilamina onde córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal foram incubados com os seguintes meios: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- Penicilamina1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 1 mM de Penicilamina); 3- Penicilamina 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 2 mM de Penicilamina); e 4- Penicilamina 5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 5mM de Penicilamina). Como pode ser observado na figura 17, 1 mM de Penicilamina não alterou a oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> em relação ao grupo controle. 2 mM de Penicilamina e 5 mM de Penicilamina diminuíram significativamente (p<0,05) a oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> em relação ao grupo controle em ratos com 10 dias de vida pós-natal.

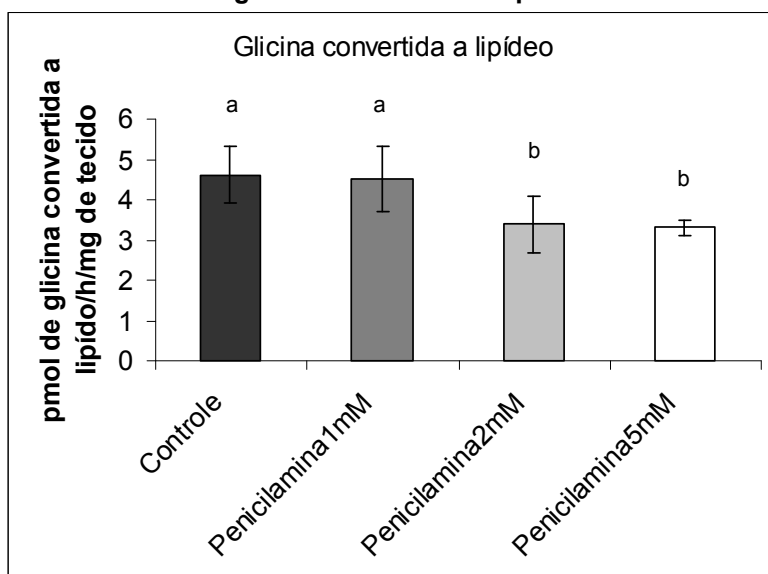
**Figura 17 - Efeitos da Penicilamina em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina); 2- Penicilamina 1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 1mM de Penicilamina); 3- Penicilamina 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 2mM de Penicilamina); e 4- Penicilamina 5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 5mM de Penicilamina). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b que difere de c. p<0,05.

Como pode ser observado na figura 18, 2 mM de Penicilamina e 5 mM de Penicilamina diminuíram a conversão da glicina a lipídeos significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. 1 mM de Penicilamina não mostrou diferença em relação ao grupo controle em ratos com 10 dias de vida pós-natal.

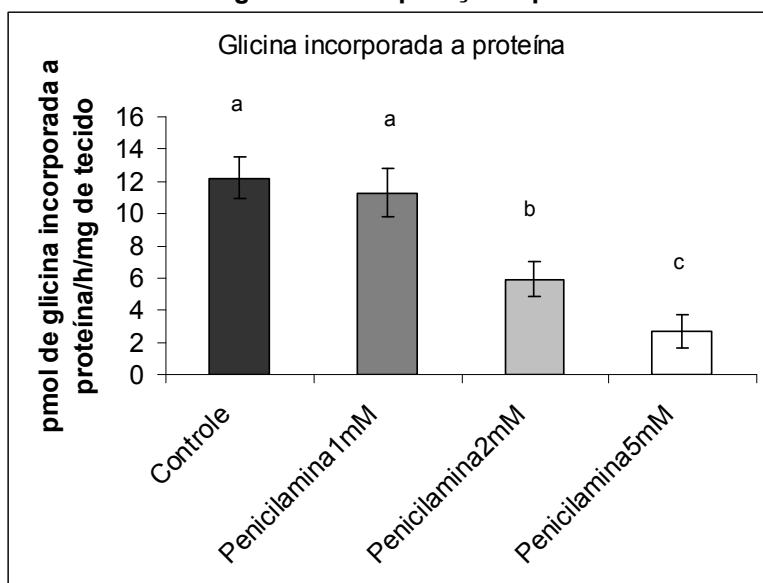
**Figura 18 - Efeitos da Penicilamina em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Conversão a lipídeos.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- Penicilamina 1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 1mM de Penicilamina); 3- Penicilamina 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 2mM de Penicilamina); e 4- Penicilamina 5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 5mM de Penicilamina). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b. p<0,05.

A figura 19 mostra que a incorporação de glicina a proteína é semelhante entre o grupo controle e o grupo com 1 mM de Penicilamina. 2 mM de Penicilamina diminui a incorporação de glicina a proteína estatisticamente em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), assim como 5 mM de Penicilamina em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ).

**Figura 19 - Efeitos da Penicilamina em concentrações de 1 mM, 2 mM e 5 mM sobre o metabolismo da glicina. Incorporação a proteína.**

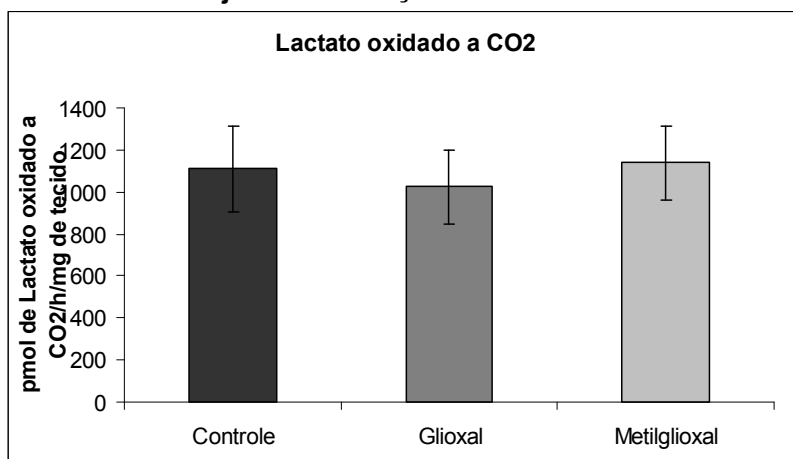


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- Penicilamina 1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 1mM de Penicilamina); 3- Penicilamina 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 2mM de Penicilamina); e 4- Penicilamina 5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 5mM de Penicilamina). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b p<0,05 que difere de c. p<0,01.

## 2.7 Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo do lactato em córtex cerebral de ratos jovens. Oxidação a CO<sub>2</sub>.

Córtex cerebral (45 mg-55 mg) de ratos Wistar com 10 dias de idade pós-natal foram incubadas nos seguintes meios: 1-controle (tampão KRb pH 7,4 + 10 mM lactato + 0,2 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] lactato) ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10 mM lactato +0,2 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] lactato + glioxal 400µM); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10 mM lactato+0,2 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] lactato + metilglioxal 400 µM ). Os dialdeídos não modificaram significativamente a oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> em relação ao grupo controle (figura 20).

**Figura 20 - Efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo do lactato em córtex cerebral de ratos jovens. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**

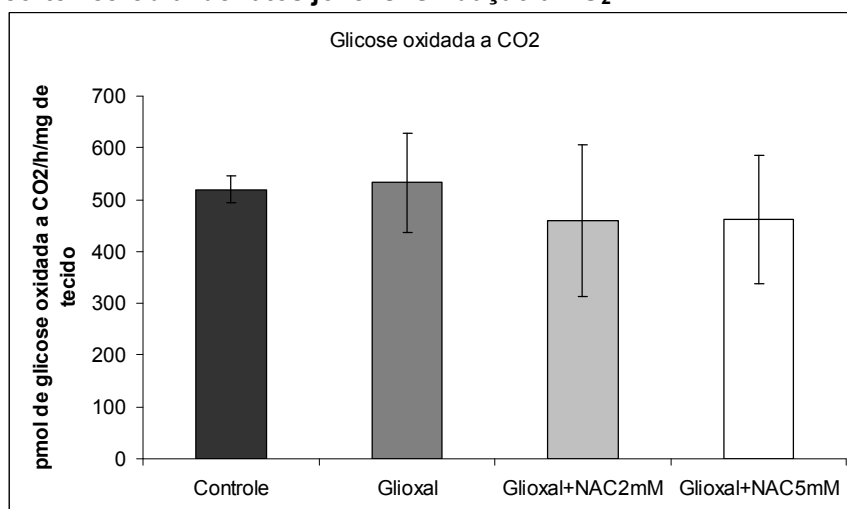


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1-controle (tampão KRb pH 7,4 + 10 mM lactato + 0,2 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] lactato) ; 2-glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10 mM lactato +0,2 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] lactato + glioxal 400 µM); 3- metilglioxal (tampão KRb pH 7,4 + 10 mM lactato+0,2 µCi L-[U-<sup>14</sup>C] lactato + metilglioxal 400 µM ).Valores são expressos como média ± DP. n=7

## **2.8 Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicose em um meio com e sem N-acetil-cisteína. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**

Córtex cerebral (45 mg-55 mg) de ratos Wistar com 10 dias de idade pós-natal foram incubadas nos seguintes meios: 1-controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-Glicose+ 0,2 µCi D-[U- <sup>14</sup>C] glicose ) ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose +0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose + glioxal 400µM); 3- glioxal + NAC2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose +0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose + glioxal 400µM + 2mM de NAC); 4- glioxal + NAC5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose +0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose + glioxal 400 µM + 5mM de NAC). O dialdeído per se, assim como o dialdeído + 2mM de NAC e 5mM de NAC, não modificaram estatisticamente a oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> em relação ao grupo controle (figura 21)

**Figura 21- Efeitos do glioxal e da N-acetil-cisteína sobre o metabolismo da glicose em córtex cerebral de ratos jovens. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**



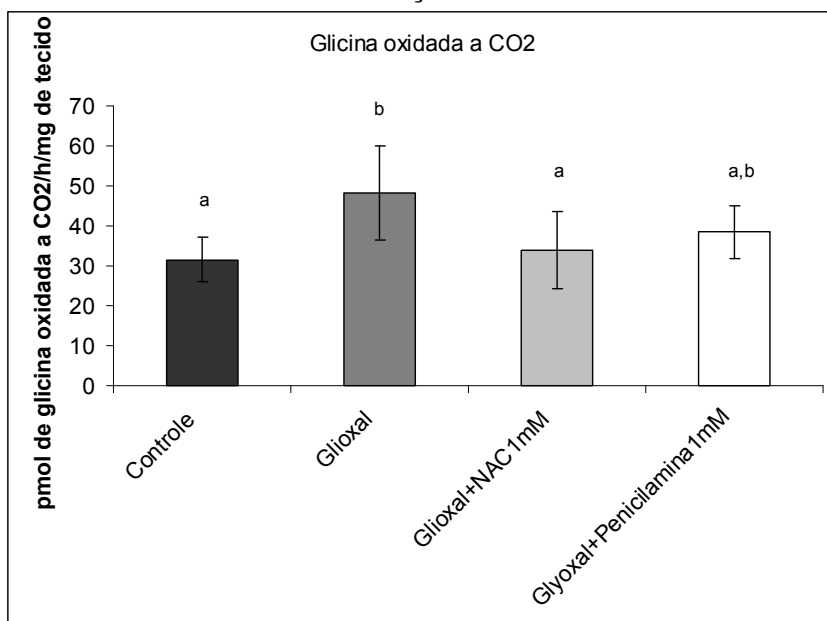
Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose ) ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose + glioxal 400 µM); 3- glioxal + NAC2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose + glioxal 400 µM + 2 mM de NAC); 4- glioxal + NAC5mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 µCi D-[U-<sup>14</sup>C] glicose + glioxal 400 µM + 5 mM de NAC). Valores são expressos como média ± DP. n=7.

## **2.9 Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína, penicilamina e TROLOX. Oxidação a CO<sub>2</sub>, conversão a lipídeos e síntese protéica.**

Com a finalidade de verificar se a NAC (um antioxidante), ou a penicilamina (um seqüestrador de aldeídos) poderiam reverter os efeitos causados pelo glioxal sobre o metabolismo da glicina em córtex cerebral de ratos jovens incubamos fatias de córtex cerebral de ratos com os seguintes meios: 1- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM glioxal; 3- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM glioxal + NAC 1,0 mM; 4- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM glioxal + 1,0 mM penicilamina. Como pode ser observado na figura 22 o glioxal aumentou significativamente a oxidação da glicina em relação

ao grupo controle, a oxidação da glicina nos grupos em que foram adicionados a NAC e a penicilamina não diferiu do grupo controle. Com este experimento não pudemos concluir se a adição da NAC e da penicilamina aos meios que continham glioxal diminuíram os efeitos do glioxal, ou se estes compostos apresentaram uma ação per se sobre a oxidação da glicina.

**Figura 22- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 1mM e Penicilamina 1mM. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**

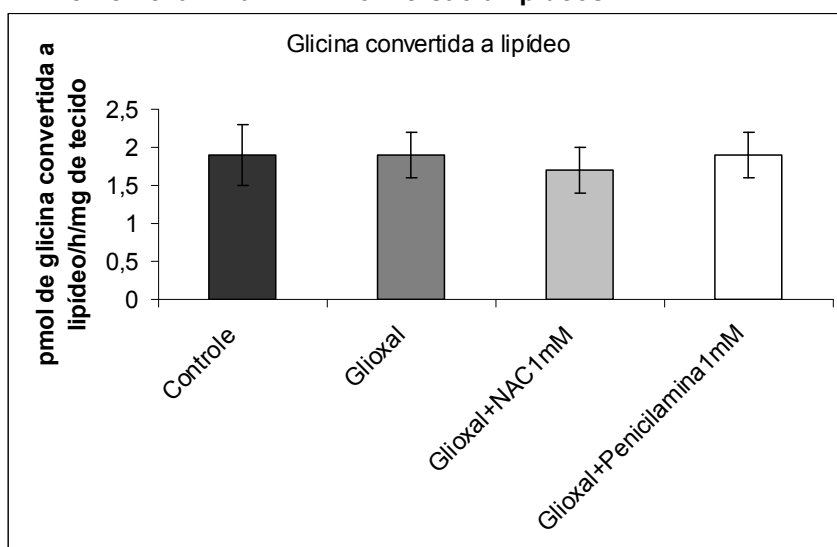


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400µM de glioxal); 3- Glioxal + NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 1mM de NAC; 4- Glioxal + Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 1mM de Penicilamina). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b. p<0,05.

Os grupos glioxal 400 µM, glioxal 400 µM + NAC 1,0 mM, e glioxal 400 µM + penicilamina 1,0mM não diferiram do grupo controle quanto a conversão da glicina a lipídios em córtex cerebral de ratos de 10 dias de vida pós-natal (figura 23).



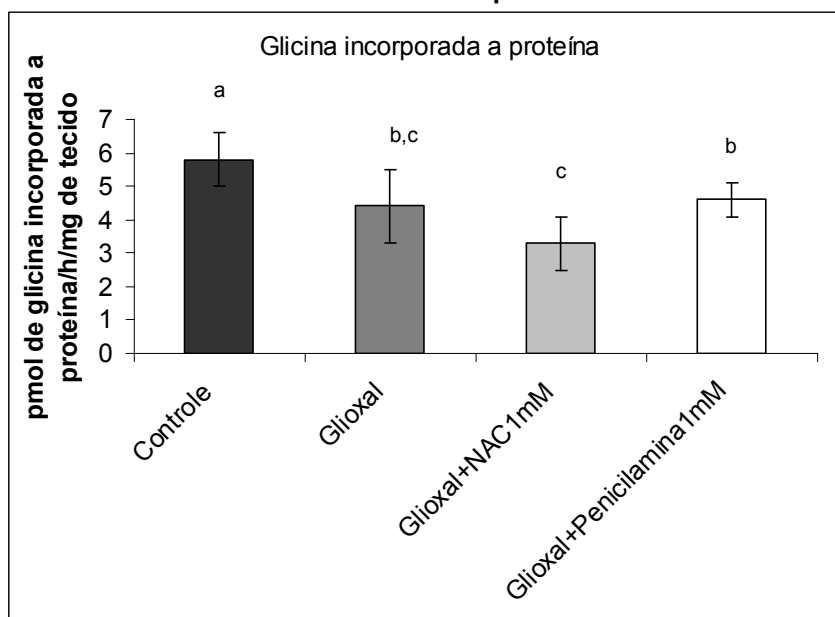
**Figura 23- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 1mM e Penicilamina 1mM. Conversão à lipídeos.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400µM de glioxal); 3- Glioxal + NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 1mM de NAC; 4- Glioxal + Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 1mM de Penicilamina). Valores são expressos como média ± DP. n=7.

Como pode ser observado na figura 24, o glioxal na concentração 400 µM inibiu a incorporação de glicina à proteínas em relação ao grupo controle, o grupo NAC 1,0 mM + glioxal na 400 µM diminuiu a síntese protéica a partir da glicina em córtex cerebral de ratos de 10 dias de vida pós-natal em relação ao grupo controle, porém não diferiu estatisticamente do grupo glioxal 400 µM. O grupo glioxal 400 µM + penicilamina 1,0 mM diminuiu a síntese protéica a partir da glicina em córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal em relação ao grupo controle.

**Figura 24- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 1 mM e Penicilamina 1 mM. Síntese de protéica.**

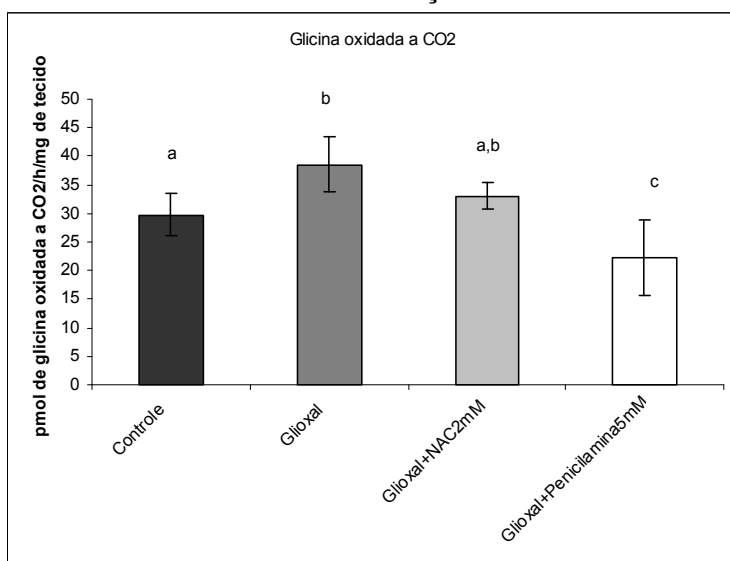


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400µM de glioxal); 3- Glioxal + NAC1mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 1mM de NAC; 4- Glioxal + Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 1mM de Penicilamina). Valores são expressos como média ± DP. n=7. a difere de b que difere de c. p<0,05.

Como não nos pareceu conclusivos os efeitos da NAC e da penicilamina na concentração de 1,0 mM sobre os efeitos do glioxal no metabolismo da glicina em córtex cerebral de ratos de 10 dias de vida pós-natal, optamos por verificar os efeitos da NAC na concentração de 2,0 mM e da penicilamina na concentração de 5,0 mM na possível reversão dos efeitos do glioxal no metabolismo da glicina. Para tanto incubamos córtex cerebral de ratos de 10 dias de vida pós-natal com os seguintes meios: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal); 3- Glioxal + NAC 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM de glioxal + 2 mM de NAC; 4- Glioxal +

Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal + 5 mM de Penicilamina). Como pode ser observado na figura 25 o glioxal na concentração de 400  $\mu$ M aumentou a oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). A oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> no grupo NAC + glioxal não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. O grupo glioxal + penicilamina 5,0 mM apresentou uma oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> inferior ao grupo controle, o que nos levou a concluir que a penicilamina diminuiu a oxidação da glicina a CO<sub>2</sub> em fatias de córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal.

**Figura 25- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 2 mM e Penicilamina 5 mM. Oxidação a CO<sub>2</sub>.**

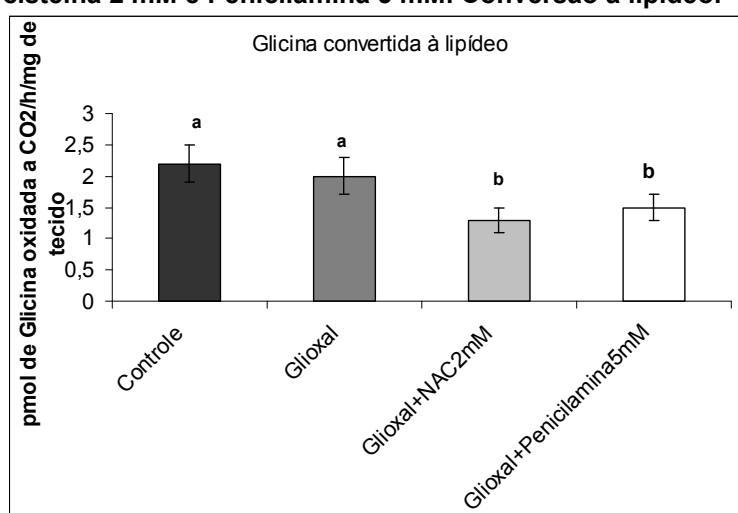


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- Glioxal + NAC 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal + 2 mM de NAC; 4- Glioxal + Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal + 5 mM de Penicilamina). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b que difere de c.  $p < 0,05$ .

Como pode ser observado na figura 26 glioxal na concentração de 400  $\mu$ M inibiu a síntese de lipídios a partir de glicina, contudo os grupos NAC 2,0 mM +

glioxal 400  $\mu\text{M}$  e penicilamina 5,0 mM + glioxal 400  $\mu\text{M}$  exerceram um efeito inibitório sobre a síntese de lipídios a partir da glicina significativamente superior ao grupo glioxal 400  $\mu\text{M}$ , o que nos permite concluir que a NAC 2,0 mM e a penicilamina 5,0 mM exerceram per se efeitos inibitórios sobre a síntese de lipídios a partir da glicina em fatias de córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal.

**Figura 26- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetilcisteína 2 mM e Penicilamina 5 mM. Conversão à lipídeo.**

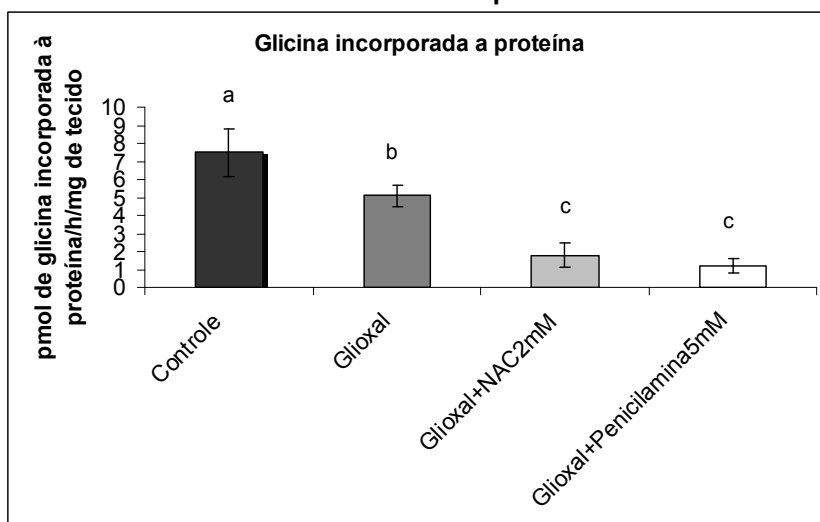


Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 $\mu\text{M}$  de glioxal); 3- Glioxal + NAC 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu\text{M}$  de glioxal + 2 mM de NAC; 4- Glioxal + Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$  [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu\text{M}$  de glioxal + 5 mM de Penicilamina). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b. p<0,05.

Como pode ser observado na figura 27, glioxal na concentração de 400  $\mu\text{M}$  inibiu a síntese protéica a partir da glicina em relação ao grupo controle, contudo os grupos NAC 2,0 mM + glioxal 400  $\mu\text{M}$  e penicilamina 5,0 mM + glioxal 400  $\mu\text{M}$  exerceram um efeito inibitório sobre a síntese protéica a partir da glicina significativamente superior ao grupo glioxal 400  $\mu\text{M}$ , o que nos permite concluir que a NAC 2,0 mM e a penicilamina 5,0 mM exerceram per se efeitos inibitórios

sobre a síntese protéica a partir de glicina em fatias de córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal.

**Figura 27- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em meios com N-acetil-cisteína 2 mM e Penicilamina 5 mM. Síntese de proteína.**



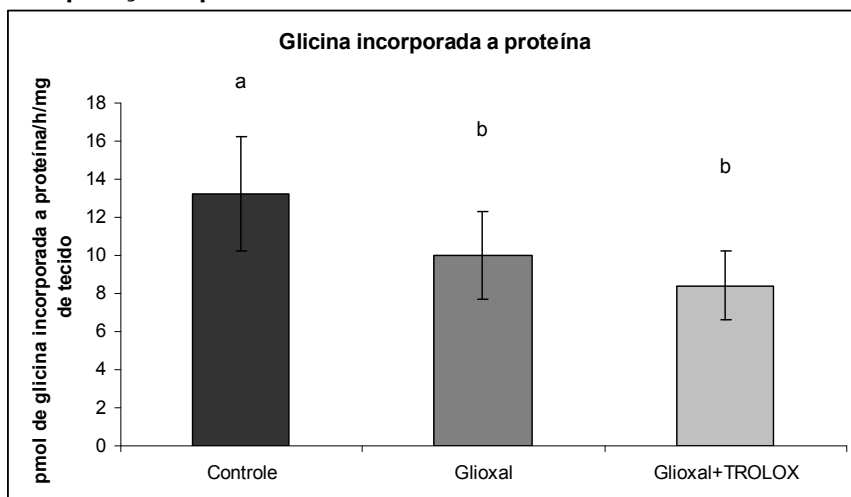
Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) incubados com: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina ; 2- glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- Glioxal + NAC 2mM (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal + 2 mM de NAC); 4- Glioxal + Penicilamina: (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal + 5 mM de Penicilamina). Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b p<0,05 que difere de c p<0,01.

Incubamos fatias de córtex cerebral de ratos Wistar aos 10 dias de idade pós-natal com nos seguintes meios: 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina); 2- Glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal); 3- Glioxal + Trolox (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M de glioxal + 10 $\mu$ M de Trolox);

Como pode ser observado na figura 28, o grupo glioxal e o grupo glioxal + trolox diminuíram a incorporação de glicina a proteína significativamente em relação ao grupo controle (p<0,05). Não houve diferença entre o grupo glioxal e o grupo glioxal + trolox.

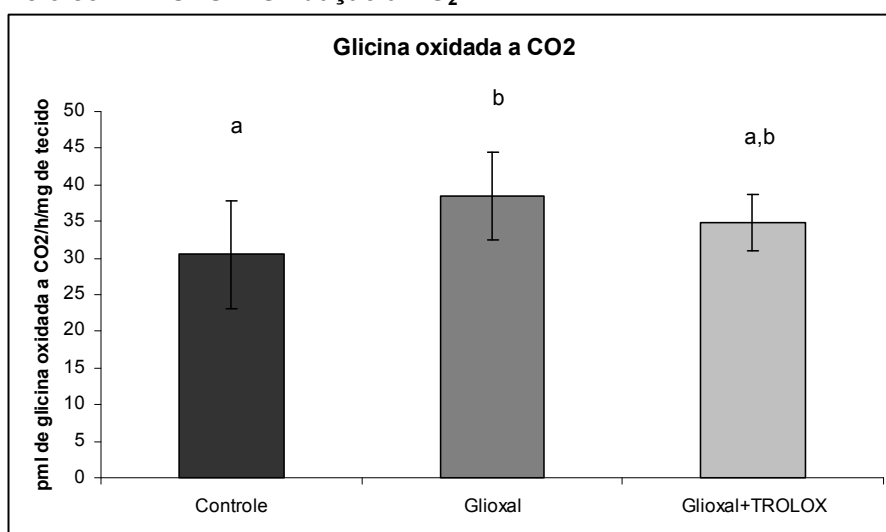
A oxidação da glicina a  $\text{CO}_2$  ficou estatisticamente aumentada ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle como já visto nos experimentos anteriores. O grupo Trolox + Glioxal não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle e ao grupo Glioxal. (figura 29)

**Figura 28- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em um meio com TROLOX. Incorporação a proteína.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2 mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$   $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicina); 2- Glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$   $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicina + 400  $\mu\text{M}$  de glioxal); 3- Glioxal + Trolox (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$   $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicina + 400  $\mu\text{M}$  de glioxal + 10 $\mu\text{M}$  de Trolox)Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b.  $p < 0,05$ .

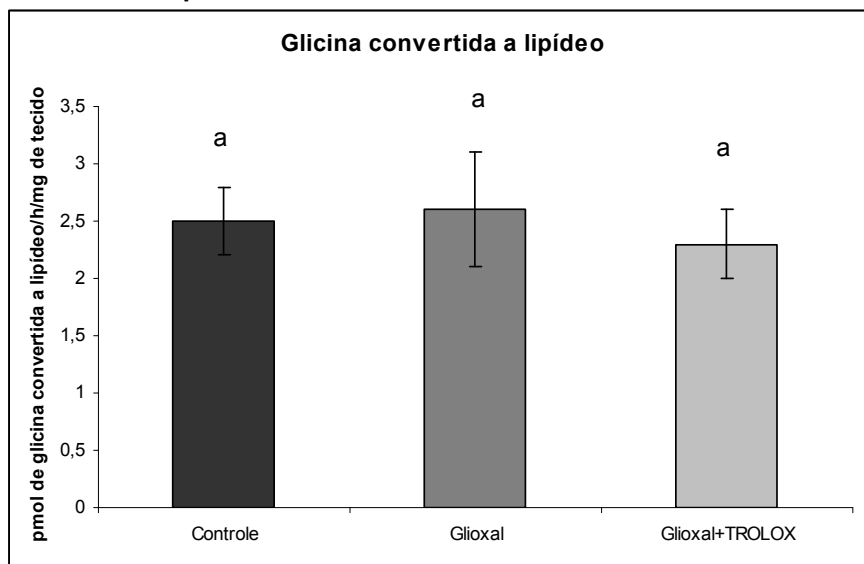
**Figura 29- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em um meio com TROLOX. Oxidação a  $\text{CO}_2$ .**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$   $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicina); 2- Glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$   $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicina + 400 $\mu\text{M}$  de glioxal); 3- Glioxal + Trolox (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu\text{Ci}$   $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glicina + 400 $\mu\text{M}$  de glioxal + 10 $\mu\text{M}$  de Trolox)Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7. a difere de b que difere de c.  $p < 0,05$ .

Quanto à conversão de glicina a lipídeos os grupos controle, glioxal e glioxal + trolox não mostraram diferenças entre si. (figura 30)

**Figura 30- Efeitos do glioxal sobre o metabolismo da glicina em um meio com TROLOX. Conversão à lipídeo.**



Córtex cerebral de ratos Wistar jovens (10 dias de idade pós-natal) 1- controle (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina); 2- Glioxal (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 $\mu$ M de glioxal); 3- Glioxal + Trolox (tampão KRb pH 7,4 + 5,0 mM de D-glicose + 0,2mM de glicina+ 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 $\mu$ M de glioxal + 10 $\mu$ M de Trolox)Valores são expressos como média  $\pm$  DP. n=7.

### 3. Discussão

A doença cardiovascular é a principal causa de morbidade e mortalidade entre os pacientes com diabetes (HOBBS, 2006). Níveis elevados de oxidantes como produtos avançados de glicação (AGEs) produzem um significativo estresse oxidativo, exercendo um papel importante na patogênese da doença cardiovascular do diabético (BROWNLEE, 2001).

Os AGEs são conhecidos como produtos advindos da hiperglicemia, contudo eles também são abundantes na dieta padrão ocidental. Estes produtos são especialmente elevados nos alimentos com alto teor de carboidratos, proteínas e lipídeos que são preparados a elevadas temperaturas, mediante processos como fritar, grelhar e assar (GOLDBERG, 2004). Os AGEs atuam ligando-se a receptores, formando aductos com proteínas intracelulares, extracelulares e proteínas da matriz celular.

A glicose e outros açúcares redutores como frutose, pentoses e galactose reagem com grupo amino de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos formando uma aldimina instável, a base de Schiff. Mediante rearranjo, a base de Schiff forma uma cetoamina estável, chamada de produto de Amadori. Através de uma série de reações o produto de Amadori é degradado a uma variedade de compostos carbonilas (glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona) que são muito mais reativos do que os açúcares que lhes deram origem. Estes compostos atuam como propagadores da reação, reagindo novamente com grupos amino livre das proteínas, e através de reações de oxidação, desidratação, ciclização formam compostos amarelo-caramelados que se acumulam nas proteínas intracelular, extracelular e da matriz (LAPOLLA et al, 2005).



Os AGEs participam no desenvolvimento dos processos degenerativos, incluindo cataratas, complicações do diabetes mérito e na doença de Alzheimer. O depósito extracelular de  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) é a principal característica da doença de Alzheimer.

A $\beta$  peptídeos compreende fragmentos truncados de proteínas precursoras do  $\beta$ -amilóide. A $\beta$  é tóxico e capaz de iniciar a sinalização de cascata de eventos incluindo estresse oxidativo e resposta inflamatória levando a neurodegeneração (MORISHIMA et al, 2001). Metanal, metilglioxal e malonildialdeído aumentam a velocidade de formação da  $\beta$ -forma do  $\beta$ -amilóide, dos oligômeros, e protofibrilas, bem como a dimensão destes agregados (CHEN et al, 2006).

Nesta dissertação verificamos os efeitos do glioxal e metilglioxal sobre o metabolismo de aminoácidos, lactato, glicose e acetato em fatias de córtex cerebral de ratos de 10 dias de idade pós-natal e de ratos adultos (3 meses de idade pós-natal). Verificamos também o possível papel protetor dos compostos N-acetilcisteína, penicilamina e trolox sobre os efeitos dos glioxais em fatias de córtex cerebral.

Como pode ser observado na figura 1, glioxal na concentração de 400  $\mu$ M aumentou a oxidação da alanina, leucina e glicina a CO<sub>2</sub> em córtex cerebral de ratos jovens em relação ao grupo controle sem adição de aldeído. Metilglioxal aumentou apenas a oxidação da alanina a CO<sub>2</sub>. Os glioxais não modificaram a síntese de lipídeos a partir dos três aminoácidos em relação ao grupo controle (figura 2). Apenas o glioxal diminuiu a síntese protéica a partir dos aminoácidos alanina, leucina e glicina em relação ao grupo controle (figura 3).

De acordo com as figuras 4- 5 e 6, respectivamente, os glioxais não modificaram a oxidação a CO<sub>2</sub>, a incorporação a proteína e a síntese de lipídeos a

partir de glicina em córtex cerebral de ratos adultos. Com estes experimentos pode-se concluir que o córtex cerebral de ratos adultos é mais resistente aos efeitos do glioxal do que o córtex cerebral dos ratos jovens. A glicina é apenas oxidada pelos astrócitos, pois só os mesmos possuem o sistema de clivagem da glicina. No SNC, esta é a única rota de oxidação da glicina (FAGUNDES et al, 2001; SATO et al, 1991).

Verificamos os efeitos do peróxido de hidrogênio mais glioxal no metabolismo da leucina. Como pode ser observada na figura 7, a adição de 1,0 unidade de glicose oxidase no meio de incubação com 10,0 mM de glicose ocasionou uma acentuada diminuição na oxidação da leucina em relação ao grupo controle (sem glioxal e sem glicose oxidase). Este sistema, 1,0 U de glicose oxidase num meio com 10,0 mM de glicose produz  $H_2O_2$  por um período de 3,0 h (SHANGARI et al, 2006). A adição de glioxal ao meio que continha a glicose oxidase não acentuou os efeitos da glicose oxidase. Estes resultados nos permitem concluir que a oxidação da leucina em córtex cerebral de ratos jovens é altamente sensível aos efeitos do estresse oxidativo.

A adição de glioxal ao meio contendo glicose oxidase acentuou os efeitos sobre a síntese protéica em relação ao meio contendo apenas glicose oxidase, porém não encontramos diferença estatística entre os dois grupos.

Como pode ser observado na figura 10 a adição de glioxal, ou de metilglioxal ao meio controle diminuiu a oxidação de glutamina a  $CO_2$  em córtex cerebral de ratos jovens em relação ao grupo controle, contudo quando utilizamos fatias de córtex cerebral de ratos adultos (figura 11), tanto o glioxal como metilglioxal não modificaram a oxidação da glutamina em relação ao grupo controle. Estes experimentos nos permitem concluir que a oxidação da glutamina

em córtex de ratos jovens é mais sensível à ação dos glioxais do que em córtex cerebral de ratos adultos.

De acordo com as figuras 12 e 13 a adição de glioxal ao meio controle não modificou a oxidação de acetato a  $\text{CO}_2$  tanto num meio com concentração fisiológica de  $\text{K}^+$  (meio extracelular do SNC), quanto num meio com elevadíssima de  $[\text{K}^+]_e$  em córtex cerebral de ratos de jovens e em córtex cerebral de ratos adultos. Uma elevada  $[\text{K}^+]_e$  de potássio ativa a atividade da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+/\text{ATPase}$  diminuindo a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  com conseqüente ativação da acetilCoA sintetase. Podemos concluir que o glioxal não modificou a atividade da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+/\text{ATPase}$  tanto em córtex cerebral de ratos jovens, quanto em córtex cerebral de ratos adultos.

Como pode ser observado nas figuras 14, 15 e 16, a adição de N-acetilcisteína nas concentrações de 2,0 e 5,0 mM ao meio controle diminuiu significativamente a oxidação, a conversão a lipídeos e a síntese protéica a partir de glicina em relação ao meio controle e ao meio controle + 1,0 mM de NAC. Estes resultados nos permitem concluir que a NAC nas concentrações de 2,0 e 5,0 mM apresentou uma ação per se no metabolismo da glicina em córtex cerebral de ratos jovens.

Com a finalidade de verificar se a penicilamina altera o metabolismo da glicina realizamos uma curva de concentração de penicilamina. De acordo com a figura 17, penicilamina a partir da concentração de 1,0 mM inibiu a oxidação de glicina em córtex cerebral de ratos jovens. Penicilamina nas concentrações de 2,0 mM e 5,0 mM inibiu a síntese de lipídeos (figura 18) e a síntese protéica (figura 19) a partir de glicina em córtex cerebral de ratos jovens. Concluimos com estes

experimentos que a penicilamina apresenta ação intrínseca no metabolismo da glicina.

Como pode ser observado na figura 20 a oxidação de lactato a CO<sub>2</sub> por córtex cerebral de ratos jovens não foi modificada pela adição de glioxal, ou de metilglioxal ao meio controle.

A figura 21 mostra que a adição de glioxal, glioxal mais NAC 2 mM, glioxal mais NAC 5 mM, separadamente, ao meio controle não modificaram a oxidação de glicose a CO<sub>2</sub> em córtex cerebral de ratos jovens.

Pelo exposto até o momento podemos concluir que os glioxais alteram a oxidação de aminoácidos e a síntese protéica, porém não alteram a oxidação de glicose, lactato e acetato por córtex cerebral de ratos.

Com a finalidade de verificar se a NAC (um antioxidante), ou a penicilamina (um seqüestrador de aldeídos) poderiam reverter os efeitos causados pelo glioxal sobre o metabolismo da glicina em córtex cerebral de ratos jovens incubamos fatias de córtex cerebral de ratos com os seguintes meios: 1- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina; 2- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM glioxal; 3- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM glioxal + NAC 1,0 mM; 4- KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400 µM glioxal + 1,0 mM penicilamina. Como pode ser observado na figura 22 o glioxal aumentou significativamente a oxidação da glicina em relação ao grupo controle. A oxidação da glicina nos grupos em que foram adicionados a NAC 1 mM ao grupo glioxal e penicilamina 1 mM ao grupo glioxal não diferiram do grupo glioxal (figura 22). Com este experimento não pudemos concluir se a adição da NAC e da penicilamina aos meios que continham glioxal diminuiu os

efeitos do glioxal, ou se estes compostos apresentaram uma ação per se sobre a oxidação da glicina. A síntese de lipídeos a partir de glicina nos grupos (glioxal 400  $\mu$ M + NAC 1 mM) e (glioxal 400  $\mu$ M + penicilamina 1,0 mM) não diferiu do grupo glioxal (figura 23).

De acordo com a figura 24 a síntese protéica a partir da glicina no grupo glioxal + NAC 1 mM foi significativamente inferior a síntese protéica do glioxal + penicilamina 1 mM, contudo a síntese protéica nestes grupos não foram significativamente diferentes do grupo glioxal.

Como pode ser observado na figura 25 a oxidação da glicina no grupo (KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M glioxal + 5,0 mM penicilamina) foi significativamente inferior em relação aos grupos (KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina); (KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M glioxal); (KRb pH 7,4 + 5,0 mM D-glicose + 0,2 mM glicina + 0,2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]glicina + 400  $\mu$ M glioxal + NAC 2,0 mM). A oxidação da glicina no grupo glioxal 400  $\mu$ M foi significativamente superior ao grupo, porém não diferiu do grupo glioxal + NAC 2 mM.

Com estes experimentos podemos concluir que a penicilamina 5,0 mM teve uma ação intrínseca na oxidação da glicina em córtex cerebral de ratos jovens.

Como pode ser observado na figura 26 a adição de NAC 2 mM e de penicilamina 5 mM (separadamente) aos meios que continham glioxal determinaram uma diminuição significativa na síntese de lipídeos a partir de glicina em córtex cerebral de ratos jovens em relação ao meio controle e ao meio que continha glioxal. Este experimento mostra uma provável ação per se da NAC 2 mM e da penicilamina 5,0 mM sobre a síntese de lipídeos a partir de glicina em

córtex cerebral de ratos jovens. A adição de NAC 2 mM e de penicilamina 5mM (separadamente) aos meios que continham glioxal determinou uma diminuição significativa da síntese protéica a partir de glicina em córtex cerebral de ratos jovens em relação ao meio controle e ao meio que continha glioxal (figura 27). Este experimento mostra uma provável ação per se da NAC 2 mM e da penicilamina 5,0 mM sobre a síntese de proteínas a partir de glicina em córtex cerebral de ratos jovens (figura 27).

Com a finalidade de testar a ação de outro antioxidante sobre os efeitos do glioxal no metabolismo da glicina utilizamos trolox na concentração de 10,0  $\mu$ M. Como pode ser observado nas figuras 28 (síntese protéica), figura 29 (oxidação a CO<sub>2</sub>) e figura 30 (síntese de lipídeos). Com estes experimentos podemos concluir que o trolox na concentração de 10,0  $\mu$ M não modificou as ações do glioxal sobre o metabolismo da glicina em córtex cerebral de ratos jovens.

### 3.1 Conclusões

Este estudo não estabeleceu um mecanismo para o efeito do glioxal sobre o metabolismo energético. Especulamos que a concentração do antioxidante Trolox usada não foi suficiente para estabelecer uma conclusão. O antioxidante N-acetil-cisteína, usado em diferentes concentrações mostrou um grande efeito próprio que nos impossibilitou uma conclusão. Semelhante ao que ocorreu com a N-acetil-cisteína, o seqüestrador de glioxais, a penicilamina também mostrou um efeito próprio. Outros antioxidantes como a quercitina importante no controle das concentrações intracelulares de glutathione, o ácido lipóico e o resveratrol estão sendo estudados pelo nosso grupo, assim como o seqüestrador de glioxais, a aminoguanidina.

Nossas conclusões estabelecidas com os resultados foram as seguintes:

- 1- Os efeitos do glioxal foram superiores aos efeitos do metilglioxal sobre o metabolismo dos aminoácidos estudados.
- 2- Os glioxais (glioxal e metilglioxal) não tiveram efeitos sobre os parâmetros estudados no metabolismo da glicose, lactato e acetato.
- 3- Os glioxais não alteraram o metabolismo da glicina e da glutamina em córtex cerebral de ratos adultos.
- 4- A utilização de antioxidantes (N-acetilcisteína e trolox) no meio de incubação não modificou os efeitos dos glioxais sobre o metabolismo dos aminoácidos.
- 5- A N-acetilcisteína e a penicilamina exerceram um acentuado efeito sobre o metabolismo dos aminoácidos.

## 3.2 Perspectivas

1- Estudo das ações dos glioxais in vivo.

a- Durante a gestação (glioxais na água de beber): estudo “ex vivo” sobre o metabolismo de aminoácidos em fatias de cérebro da prole no primeiro dia de vida pós-natal da prole.

b- Durante a gestação e lactação (glioxais na água de beber): estudo “ex vivo” sobre o metabolismo de aminoácidos em fatias de hipocampo e fatias de córtex cerebral da prole aos 21 dias de vida pós-natal da prole.

2- Estudo dos efeitos dos glioxais sobre o metabolismo de aminoácidos em hipocampo de ratos adultos in vitro: (oxidantes: glicose oxidase + 10 mM de glicose=sistema produtor de  $H_2O_2$ ; antioxidantes e seqüestradores de aldeídos).

3- Estudo dos efeitos do peróxido de hidrogênio (1,0 U de glicose oxidase + 10,0 mM de glicose) sobre o metabolismo de aminoácidos (glicina, leucina e glutamina) e lactato, acetato e glicose : estudo ontogenético.

4- Estudo com cultura de glioblastomas.

a- metabolismo de aminoácidos (ações de antioxidantes, seqüestradores de aldeídos e oxidantes).

b- imunobloting (proteínas pró-inflamatórias e envolvidas com o estresse oxidativo)

c- marcação de proteínas com glioxais [ $^{14}C$ ]



## Referências Bibliográficas

ABORDO EA, MINHAS HS, THORNALLEY PJ. Accumulation of alpha-oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 641-648.

AEBI H. Catalase in vitro. *Methods Enzimol.* 1984; 105: 121-126.

BANNISTER JV e CALABERESE L. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal.* 1987; 32: 279-312.

BEILIN L e col. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001; 44:129-146.

BLOOMGARDEN Z T. Insulin resistance concepts. *Diabetes care.* 2007; 30:1320-1326.

BROWNLEE M. The pathobiology of diabetes. Unifying mechanism. *Diabetes* 2005 ; 54: 1615-1625.

BUCALA R, MAKITA Z, KOSCHINSKY T, CERAMI A, VLASSARA H. Lipid advanced glycosylation pathway for lipid oxidation in vivo. *PROC Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6434-6438.

BUENO D, AZZOLIN IR, PERRY MLS. Ontogenetic study of glucose and lactate utilization by rat cerebellum slices. *Med Sci Res* 1994; 22: 631-633.

CERIELLO A e col. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia.* 2007; 50:1523-1531.

CHAPPEY M, DOSQUET C, WAUTIER MP, WAUTIER JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 97-108.

DAVIES M, ZENG J. Protein and low molecular mass thiols as targets and inhibitors of glycation reactions. *Chem Res Toxicol*. 2006; 19:1668-1676.

DRAPER HH e HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* .1990 ; 186: 421-431.

DROGE W. Oxidative stress and aging: is aging a cysteine deficiency syndrome? *Phil trans r soc*. 2005; 360:2355-2372.

DU XL, EDESTEIN D, ROSSETTI L, FANTUS IG, GOLDBERG H, ZIYADEH F, WU J, BROWNLEE M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *PROC Natl Acad Sci USA* 2000;97: 12221-12226.

DU XL, MATSUMURA T, EDELSTEIN D, ROSSETTI L, ZSENNER Z, SZABO C, BROWNLEE M. Inhibition of GAPDH activity by (ADP-ribose)polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 2003; 112:1049-1057.

ERYE EB, DEGENHARDT TP, THORPE SR, BAYNES JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem* 1998; 273:11871-11879.

EUM H A, LEE S M. Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P450 in hepatic ischemia/reperfusion. *Br J Pharmacol*. 2004; 142:35-42.

FAGUNDES IS, ROTA LN, SCHWEIGERT ID, VALLE SC, de OLIVEIRA KR, KRÜGER HK, SOUZA KB, SOUZA DO, PERRY MLS. Glycine, serine, and leucine metabolism in different regions of rat central nervous system. *Neurochem Res* 2001;26:245-249.

FINCK B N. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. *Cardiovascular research*. 2007; 73:269-277.

GALINA A e col. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defence. *The journal of biological chemistry*. 2004; 279:39846-39855.

GOLDEBERG T, CAI W, PEPPA , DARDAINE V, BALIGA BS, URIBARRI J, VLASSARA H. 2004. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J AM Diet Assoc* 104:1287-1291.

GRANDEE SK and MONNIER VM. Mechanism of formation of Maillard protein cross-link pentosidine, glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 1991; 362: 11649-11653.

GROSJEAN D. Particulate carbon in Los Angeles air. *Sci Total Environ* 1984; 32: 133-145.

HASEGAWA R, OGISO T, IMAIDA K, SHIRA T, ITO N. Analysis of the potential carcinogenicity of coffee and its related compounds in a médium-term bioassay of rats. *Food Chem Toxicol* 1995; 33: 15-20.

HOBBS FDR. 2006. Type-2 diabetes mellitus related cardiovascular risk: new options for interventions to reduce risks and treatment goals. *Atherosclerosis suppl* 7:29-32.

JELLUM E. Is the mechanism of action during treatment of rheumatoid arthritis with penicillamine and gold thiomalate the same? *Proc roy soc med*. 1977; 70:136-139.

JOOST H G e col. Development of diabetes in obese, insulin-resistance mice: essential role of dietary carbohydrate in beta cell destruction. *Diabetologia*. 2007; 50:1481-1489.

KALAPOUS MP. Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett* 1999;110: 145-175.

KALAPOUS MP. Possible physiological roles of acetone metabolism in humans. *Med Hypotheses* 1999; 5: 236-242.

KRISMA CR, BARENGO RA. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analyt Biochem* 1975; 4: 117-123.

KUNST C, KLIEGMAN R, TRINDADE C. The glucose-galactose paradox in neonatal murine hepatic glycogen synthesis. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 1989; 257: E698-E703.

LORETO S e col. Methylglyoxal induces oxidative stress – dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1 $\beta$  and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cell. *Brain research*. 2004; 1006: 157-167.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951; 193: 265-275.  
McGARRY JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type diabetes. *Diabetes* 2002;51: 7-18.

MIYAJIMA H, OSANAI M, CHIBA H, NISHIKIORI N, KOJIMA T, OHTSUKA K, SAWADA N. Glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products preferentially induce VEGF expression and reduce GDNF expression in human astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 2005: 330: 361-366.

MORISHIMA Y, GOTOH Y, ZIEG J, BARRET T, TAKANO H, FLAVELL R, DAVIS RJ, SHIRASAKI Y, GREENBERG ME. 2001. Beta- amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 21:7551-7560.

NEGREAN M, STIRBAN A, STRATMANN B, GAWLOWSKI T, HORTSMANN T, GÖTTING C, KLEESIEK K, MUELLER-ROESEL, KOSCHINSKY T, URIBARRI J, VLASSARA H, TSCHOEPE D. Effects of low- and high-advanced glycation endproducts meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with diabetes type 2 mellitus. *Am J Clin Nutr* ; 2007;85: 1236-1243.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*. 2005; 24:1311-1317.

O'BRIEN PJ, SIRAKI AG, SHANGARI N, Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Crit Rev Toxicol* 2005; 35:609-662.

OLIVEIRA K R, PERRY M L e col. Ontogenic study of the effects of energetic nutrients on amino acid metabolism of rat cerebral cortex. *Neurochemical research*. 2002; 27:513-518.

OWEN OE, TRAPP VE, SKUTCHES CL, MOZZOLI MA, HOELDTKE RD, BODEN G, REICHART GA Jr. Acetone metabolism during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 1982; 31: 242-248.

PASSARELI M e col. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes*. 2005; 54: 2198-2205.

PEPPA M, HE C, HATTOTI M, McEVOY R, ZHENG F, VLASSARA H. Fetal or neonatal low-glycotoxin environment prevents autoimmunity in NOD mice. *Diabetes* 2003; 52: 1441-1448.

REICHART GA Jr, SKUTCHES CL, HOELDTKE RD, OWEN OE. Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 1986;35:668-674.

RIBOULET-CHAVEY A, PIERRON A, DURANT I, MURDACA J, GIUDICELLI J, VAN OBBERGHEN E. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways

independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* 2006; 55: 1289-1299.

ROBERTS MJ, WONDRAK GT, LAUREAN DC, JACOBSON MK, JACOBSON EL. DNA damAGEs by carbonyl stress in human skin cells. *Mutat Res* 2003; 522:45-56.

ROSSETTI L e col. A brain liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell metabolism*. 2005; 1:53-61.

ROTTA LN, VALLE SC, SCHWEIGERT I, Dei RICARDI L, FERRONATTO ME, da SILVA L, SOUZA DO, PERRY MLS. Utilization of energy nutrients by cerebellar slices. *Neurochem Res* 2002; 27: 201-206.

SALVEMINI D, WANG ZQ,ZWEIR JL, SAMOUILOW A, MACARTHUR H, MISKO TTP, CURRIE MG,, CUZZOCREA S, SIKORSKI JAA, RILEY DP. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity inn rats.*Science* 1999; 286: 304-3064.

SATO K, YOSHUDABS, FUGIWARA K, TADA K, TAHYAMA M. 1991. Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Research* 567:64-70.

SANDU O, SONG K, CAI W, ZHENG F, URIBARRI J, VLASSARA H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes* 2005; 54: 2314-2319.

SCHWEIGERT ID, ROEHRIG C, da COSTA F, SCHEIBEL F, GOTTFRIED CJS, ROTTA LN, GONÇALVES CA, SOUZA DO, PERRY MLS. High extracellular K<sup>+</sup> levels stimulate acetate oxidation in brain slices from well and malnourished rats. *Neurochem Res* 2004; 29:15471551.

SCOTT D e col. Skeletal muscle protein loss due to d-penicillamine results from reduced protein synthesis. *The international journal of biochemistry*. 2001; 33:1013-1026.

SHANGARI N, BRUCE WR, POON R, O'BRIEN PJ. Toxicity of glyoxals-role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency. *Biochem Soc Trans* 2003; 31:1390-1393.

SHANGARI N, O'BRIEN PJ. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 1433-1442.

SHANGARI, N, CHAN TS, POPOVIC M, O'BRIEN PJ. Glyoxal markedly compromises hepatocyte resistance to hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 1610-1618.

SMITH C, MARKS A, LIEBERMAN M A. Mark's Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. *Lippincott Williams e Williams*. 2004.

SOUZA CG, MOREIRA JD, SIQUEIRA IR, PEREIRA AG, KIEGER DK, SOUZA DO, SOUZA TM, PORTELA LV, PERRY MLS. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sc* 2007;81:198-203.

STITT AW, BHADURI T, McMULLEN CBT, GARDINER TA, ARCHER DB. Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000 ;380-388.

THORNALLEY PJ, JAHAN I, NG R. Suppression of the accumulation of triosephosphates and increased formation of methylglyoxal in human red blood cells during hyperglycaemia by thiamine in vitro. *J Biochem* 2001; 129:543-549.

UNGER RH and ORCI L. Diseases of liporegulations: new perspectives on obesity and related disorders. *FASEB J* 2001; 15: 312-321.

VANDER JAGT DL, ROBINSON B, TAYLOR KK, HUNSAKER LA. Reduction of trioses by NADPH-dependenet aldo-keto reductases. Aldose reductase, methylglyoxal, and diabetic complications. *J Biol Chem* 1992; 267: 4364-4369.

VLASSARA H, BROWNLEE M, MANOGUE KR, DINARELLO CA, PASAGIAN A. Cathetin/TNF and IL-2 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 1988; 240: 1546-1548.

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

WANIEWSKI R, MARTIN DL. Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J Neurosci* 1998;18: 5225-5233.

WELLS-KNECHT KJ, ZYZAK DV, LICHFIELD JE, THORPE SR, BAYNES JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995; 34:3702-3709.

WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzimol.* 1981; 77: 325-333.

WESTWOOD ME, ARGIROV OK, ABORDO EA, THORNALLEY PJ. Methylglyoxal-modified arginine residues- a signal for receptor-mediated endocytosis and degradation of proteins by monocytic THP-1 cells. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1356: 84-94.

HALLIWELL B; GUTERIDGE (2000): Free radicals in biology and medicine, 3ed. Clarendon, Oxford.

DROGE W. (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95.



ROBERTSON R P; HARMON J S (2006): Diabetes, glucose toxicity and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet  $\beta$ -cell. *Free radical biology and Medicine*. 41:177-184.

REUSCH J E B; DRAZNIN B B (2006): Atherosclerosis in diabetes and insulin resistance. *Diabetes obesity and metabolism*. 9: 455- 463.

SINGH R; BARDEN A; MORI T et al (2001): Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 44: 129- 146.

BROWNLEE M (2004): The pathobiology of diabetic complications a unifying mechanism. *Diabetes*. 54: 1615- 1625.

THORNALLEY P J (2005): Glycation free adduct accumulation in renal disease the new AGES. *Pediatr Nephrol*. 20:1515-1522.

THORNALLEY J; ABORDO E A; MINHAS H S (1999). Accumulation of  $\alpha$ -oxoaldehydes during oxidative stress: a role in cytotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 58:641-648.

YOSHIHISA I e col N-acetylcysteine selectively protects cerebellar granule cells from 4-hydroxynonenal-induced cell death. *Neurochemical research* 2006; 55:255-263.

YUDKOFF M e col. Astrocyte leucine metabolism: significance of branched-chain amino acid transamination. *J Neurochem.* 1996; 66:378-385.