

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BIOQUÍMICA

EFEITO DE COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS E DO
EXERCÍCIO FÍSICO EM DOIS MODELOS EXPERIMENTAIS DE
ESTRESSE OXIDATIVO

Julio César Mendes Soares

PPGB

Orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha

Porto Alegre, RS, Brasil

2005

Agradecimentos

Agradecimento às pessoas que contribuíram para este importante estágio de minha vida:

À Nádia, minha esposa, pelo amor, carinho, incentivo e compreensão que teve ao longo deste processo;

A meus pais, pessoas que sempre estiveram ao meu lado me incentivando, dando carinho e compreensão, a estas duas pessoas que muito me deram sem nunca cobrar, expresso aqui minha gratidão.

As minhas irmãs Mirian e Olma e irmão Élbio pelo apoio, incentivo e amizade

Ao meu amigo e incentivador Vanderlei Folmer

Aos colegas, Robson, Gustavo, Néia, Verônica, Diogo pela amizade e companheirismo

Ao meu orientador, pela orientação, e por ter acreditado em minha capacidade e principalmente por me ensinar a ter um pouco de ambição científica.

No interior de cada pessoa existe uma força, alguns ignoram-a, outros aproveitam-a descobrindo seu verdadeiro potencial e outros a descobrem através das pessoas que os cercam, por isso agradeço ao Ser Superior que criou em nós essa força e faz as pessoas certas cruzarem nossos caminhos. (Julio C. Soares)

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	ii
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas.....	x
Apresentação	xi
Resumo.....	xii
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1 Diabetes e suas complicações crônicas.....	3
2.2 Histórico.....	3
2.3 Conceito	3
2.4 Classificação	4
2.5 Complicações Secundárias do Diabetes	4
2.6 Estresse Oxidativo.....	5
2.7 Fisiopatologia das Complicações Diabéticas.....	7
2.7.1 Glicação não Enzimática.....	7
2.7.2 Autoxidação da Glicose	9
2.7.3 Via dos Poliois	9
2.8 Eritrócitos e Peroxidação Lipídica	10

2.9	Enzimas sulfidrílicas	12
2.9.2	Delta-Aminolevulinato Desidratase.....	12
2.9.3	Lactato Desidrogenase.....	15
2.9.4	Succinato Desidrogenase.....	16
2.10	Exercício Físico e Diabetes	17
2.10.1	Exercício Físico e Sensibilidade à Insulina.....	18
2.11	Estresse Oxidativo Exercício-Induzido	19
2.11.1	Produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio	19
2.11.2	Produção citoplasmática de espécies reativas de oxigênio	20
2.11.3	Produção de espécies reativas de oxigênio favorecidas pelos íons ferro e cobre	21
2.12	Mecanismos de Defesa Antioxidante	22
2.13	Organocalcogênios.....	24
2.13.1	Selênio.....	24
2.13.2	Ebselen.....	25
3	Objetivos.....	26
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	27
4.1	Artigo – 1 EBSELEN EXHIBITS GLYCATION-INHIBITING PROPERTIES AND PROTECTS AGAINST OSMOTIC FRAGILITY OF HUMAN ERYTHROCYTES <i>IN VITRO</i>	28
4.2	Artigo – 2 EFFECT OF HIGH CONCENTRATION OF REDUCING MONOSACCHARIDE ON <i>IN VITRO</i> Δ-AMINOLEVULINATE	

	DEHYDRATASE ACTIVITY OF HUMAN ERYTHROCYTE.....	52
4.3	Artigo – 3 INFLUENCE OF DIETARY SELENIUM SUPPLEMENTATION AND EXERCISE ON THIOL CONTAINING ENZYMES IN MICE.....	70
4.4	Artigo – 4 EXERCISE TRAINING REVERSES THE DELETERIOUS EFFECT OF SUCROSE INTAKE ON INSULIN RESISTANCE AND VISCERAL FAT MASS DEPOSITION IN MICE	77
8.	DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	99
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1.** TBA-RS content (**1 A**) and correlation between TBA-RS content and glucose concentrations (**1 B**) in erythrocytes incubated for 24h with different glucose concentrations in the absence or presence of 0.5 mmol/l H_2O_2 plus 2.5 mmol/l sodium azide..... 48
- Figura 2.** Non-protein thiol groups from erythrocytes incubated for 24h with different concentrations of glucose (in the absence or presence of 0.5 mmol/l H_2O_2) or fructose.....49
- Figura 3.** Hydrogen peroxide content in erythrocytes incubated for 24h with 5, 10 or 100 mmol/l of glucose.....49
- Figura 4.** Osmotic fragility test of erythrocytes incubated for 24h with fructose 5 mmol/l and 100 mmol/l, with or without 5 μ M of ebselen, submitted at decreasing hypotonic NaCl concentration for 30 min at 37°C.....50
- Figura 5.** Osmotic fragility test of erythrocytes of Control group, Control plus Ebselen 5 μ mol/l, Controlled Diabetic, Uncontrolled Diabetic and Uncontrolled Diabetic plus Ebselen (5 μ mol/l) incubated 24h with glucose 5 mmol/l, submitted at decreasing hypotonic NaCl concentration for 30 min at 37°C.50
- Figura 6 .** Glycated hemoglobin levels in erythrocytes incubated for 48h with different glucose or fructose concentrations, with or without 5 μ M ebselen.....51
- Figura 7 .** Glycated hemoglobin levels in erythrocytes incubated for 48h with increasing glucose concentrations, with or without 5 μ M of ebselen.....51

ARTIGO 2

Figura 1. δ -ALA-D activity in erythrocytes incubated for 24 h at 37°C with glucose in concentrations of 5mmol/l up to 100 mmol/l.....	67
Figura 2. δ -ALA-D activity in erythrocytes incubated for 48h at 37°C with glucose in concentrations of 5mmol/l up to 200 mmol/l in the absence or the presence of 2mmol/l DTT	67
Figura 3. Non-protein thiol groups from erythrocytes incubated for 24 h at 37°C with different concentrations of glucose.....	68
Figura 4. Correlation between δ -ALA-D activity and NPSH groups from erythrocytes incubated for 24h with different glucose concentrations.....	68
Figura 5. TBARS content in erythrocytes incubated for 24h at 37°C with glucose in the concentrations of 5 mmol/l up to 200 mmol/l.	69
Figura 6. TBARS content in erythrocytes incubated 48h at 37°C with glucose in the concentrations of 5 mmol/l up to 200 mmol/l.....	69

ARTIGO 3

Figura 1. δ -ALA-D activity in hepatic tissue.	73
Figura 2. δ -ALA-D activity in renal tissue..	73
Figura 3. Succinate dehydrogenase activity in skeletal muscle.....	74
Figura 4. Succinate dehydrogenase activity in cardiac muscle.	74

ARTIGO 4

Figura 1. Weight gain in mice from the control, exercised, fed high sucrose and exercised and only fed high sucrose diets groups for 26 wk.....	95
Figura 2. Food consumption in mice from the control group (Cont ○), exercised (Cont	

- + Exer ●), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer ▲) and only fed high sucrose (Sucr Δ) diets for 26 wk.....95
- Figura 3.** Plasma insulin **(A)** and glucose **(B)** concentrations in mice after a 12-h period of starvation after different treatments (contro, exercised, fed high sucrose and exercised and only fed high sucrose diets groups for 26 wk).....96
- Figura 4.** Abdominal fat index in mice from the control (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets groups for 26 wk.....97
- Figura 5.** δ-ALA-D activity in liver in the absence or the presence of DTT (2 mmol/L) of mice from the control group (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets for 26 wk.....97
- Figura 6.** Basal TBA-RS levels in liver, kidney and brain tissues of mice from the control (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets for 26 wk.....98
- Figura 7.** Levels of NPSH groups in liver, kidney and brain tissues of mice from the control (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets for 26 wk.....98

ÍNDICE DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Fasting blood glucose levels, glycated hemoglobin, cholesterol, high density lipoprotein, triglyceride and creatinine plasmatic of control group, controlled type II DM patients and uncontrolled type II DM patients. Values are expressed by Mean \pm SEM, n= 40.....46

Tabela 2 – SOD and Catalase activities in erythrocytes incubated 24hs with glucose 5 mmol/l up to 100 mmol/l. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group.....47

ARTIGO 3

Tabela 1- COMPOSITION OF DIETS WITH DIFFERENT LEVELS OF SELENIUM SUPPLEMENTATION.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA – American Diabetes Association
- δ -ALA-D – Delta aminolevulinato desidratase
- AGE – Advanced glycation end products
- ALA – Ácido 5-aminolevulínico ou delta-aminolevulínico
- DMID – Diabetes mellitus insulino dependente
- DMNID – Diabetes melittus independente de insulina
- DTT – Ditioneitol
- ERO/ROS Espécies reativas de oxigênio
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HO[•] – Radical hidroxil
- LDH – Lactato Desidrogenase
- O₂^{•-} – Radical ânion superóxido
- PBG – Porfobilinogênio
- PTGA – Produtos terminais de glicação avançada
- SH – Grupos sulfidrílicos
- SOD – Superóxido desmutase
- SDH – Succinato Desidrogenase
- TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Zn – Zinco

APRESENTAÇÃO

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

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

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

RESUMO

O Diabetes Mellitus é uma síndrome metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica e, esta por sua vez, contribui para o desenvolvimento das complicações secundárias freqüentemente observadas nos pacientes diabéticos. O estresse oxidativo decorrente dessa hiperglicemia é um dos principais fatores envolvidos na fisiopatologia dessas complicações. Vários estudos comprovam o efeito nocivo *in vivo* e *in vitro* de concentrações altas de glicose sobre diferentes tecidos e órgãos. Enzimas sulfidrílicas como δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), lactato desidrogenase (LDH) e succinato desidrogenase (SDH), são altamente sensíveis a elementos pró-oxidantes. Uma freqüente coexistência entre Diabetes mellitus e porfiria tem sido observada em humanos e em animais experimentais, o que pode estar ligado à inibição da δ -ALA-D observada em diabéticos. Este estudo tem como objetivos induzir estresse oxidativo *in vivo* com exercício físico intenso ou dieta contendo altos níveis de sacarose e *in vitro* e com altas concentrações de açúcares redutores e avaliar seus efeitos sobre os níveis de lipoperoxidação, fragilidade osmótica dos eritrócitos, atividade de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase) e enzimas sulfidrílicas (δ -ALA-D, LDH e SDH), verificar o efeito de um antioxidante seleno-orgânico (ebselen) e a suplementação de selênio sobre a atividade destas enzimas, bem como avaliar o possível papel terapêutico do ebselen sobre a fragilidade osmótica dos eritrócitos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que eritrócitos de pessoas com diabetes descontrolado são mais sensíveis ao choque osmótico que eritrócitos de pacientes com diabetes controlado e eritrócitos de pessoas saudáveis. Além disso, uma função protetora do ebselen contra a fragilidade osmótica, indica que eritrócitos de pessoas com diabetes descontrolada estão expostos a um aumento na produção de radicais livres *in vivo*. O ebselen também apresentou propriedade de inibir a glicação *in vitro*. O

exercício físico intenso associado à deficiência de selênio, é capaz de diminuir a atividade das enzimas sulfidrílicas. No entanto, exercício físico moderado de menor intensidade melhora a sensibilidade à insulina em camundongos com resistência à insulina, previne contra fatores nocivos comumente encontrados no diabetes como ganho de peso corporal e acúmulo de gordura abdominal não é capaz de afetar atividade da δ -ALA-D. Através dos 2 modelos experimentais utilizados, modelo de indução de peroxidação lipídica em eritrócitos incubados com concentrações elevadas de açúcares redutores *in vitro* e modelo de indução de resistência à insulina em animais treinados e sedentários, pode-se concluir que: A incubação de eritrócitos *in vitro* com altas concentrações de glicose ou frutose leva a um aumento na lipoperoxidação e contribui para a diminuição da atividade de enzimas tiólicas provavelmente por oxidação dos seus grupos –SH. O exercício físico associado com baixos níveis de selênio na dieta prejudica a atividade de enzimas tiólicas como δ -ALA-D e SDH. O exercício físico de intensidade moderada aumenta a sensibilidade à insulina em camundongos com resistência à insulina induzida pela dieta com sacarose e previne contra o ganho de peso corporal e aumento do índice de gordura abdominal.

ABSTRACT

Diabetes Mellitus is a metabolic alteration characterized by chronic hyperglycemia; which has been reported to be the cause of major diabetes complications frequently observed. Oxidative stress caused by hyperglycemia is the major factor involved in the pathophysiology of these complications. Several studies have shown that increased extra- and intracellular glucose concentrations result in an oxidative stress in different tissues both *in vivo* and *in vitro*. δ -Aminolevulinic acid dehydratase, succinate dehydrogenase, and lactate dehydrogenase are sulfhydryl-containing enzymes, and their activities are sensitive to the presence of oxidizing agents. The heme synthetic pathway is impaired in porphyria and a frequent coexistence of diabetes mellitus and porphyria disease has been reported in humans and experimental animal models, which can be causally linked to the δ -ALA-D inhibition found in diabetics. The aim of this study were: to induce oxidative stress *in vivo* and *in vitro* to investigate their effects on: lipoperoxidation levels, osmotic fragility of erythrocytes, activity of antioxidant (catalase and superoxide dismutase) and sulfhydryl-containing enzymes (δ -ALA-D, LDH and SDH) enzymes; to investigate the effect of an antioxidant seleno-organic (Ebselen) and selenium supplementation on activities of these enzymes, as well as to investigate the possible therapeutic role of Ebselen on osmotic fragility of erythrocytes. Results from the present study indicate that erythrocytes from patients with uncontrolled diabetes are more sensitive to osmotic shock than those from patients with controlled diabetes and from normal subjects. Furthermore, a protective role of Ebselen against osmotic fragility indicates that erythrocytes from patients with uncontrolled diabetes are exposed to an increased production of free radical *in vivo*. Furthermore, Ebselen also showed *in vitro* glycation-inhibiting. Exhaustive physical exercise associated with low levels of Se in the diet impaired the activity of thiol-

containing enzymes. However, moderate physical exercise of low intensity improves insulin sensitivity in mice with insulin resistance, prevents against the deleterious factors frequently observed in diabetic patients as increase of body weight and abnormal fat deposition and was not able to affect δ -ALA-D activity and lipoperoxidation levels. Through 2 experimental models experimentais utilized, model of lipid peroxidation-induction in erythrocytes incubated with high levels of sugars reducing *in vitro* and model of insulin resistance-induction in training and sedentary mice may conclude that: Erythrocytes incubation *in vitro* with high glucose or fructose levels causes an increase of lipoperoxidation and contributes to the decrease thiol-containing enzymes activities, probably for sulfhydryl-groups oxidation. Physical exercise associated with dietary Se deficiency can inhibit the production of thiol-containing enzymes, such as δ -ALA-D and SDH, from different tissues. Moderate physical exercise of low intensity improves insulin sensitivity in mice with insulin resistance induced for high sucrose diet and prevents against increase of body weight and abnormal fat deposition.

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus é uma síndrome metabólica crônica, caracterizada por um estado de hiperglicemia persistente, podendo ser resultante de uma deficiência na produção de insulina (Diabetes mellitus tipo 1), uma resistência dos tecidos à ação deste hormônio (Diabetes mellitus tipo 2) ou ambos os fatores (ALBERTI & SIMMET, 1998). Este estado hiperglicêmico crônico, por sua vez, contribui significativamente, através de diferentes mecanismos, para o desenvolvimento das complicações secundárias freqüentemente observadas nos pacientes diabéticos.

A principal causa das complicações secundárias do Diabetes é o estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia, e em consequência desse aumento de radicais livres ocorrem danos teciduais por meio da peroxidação lipídica (TAPPEL, 1973). A hiperglicemia pode ativar três principais vias de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO): glicação não enzimática, autooxidação da glicose e ativação da via dos pliois (SATO et al., 1979; BROWNLEE et al., 1984; WOLFF & DEAN, 1987; BROWNLEE, 1994; ANSARI et al., 1996; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000; ATALAY & LAAKSONEN 2002, HANS et al., 2003). Estes mecanismos de forma individual ou associados são responsáveis pelo aumento na produção de ERO e ou diminuição do sistema antioxidante de defesa, responsáveis pela fisiopatologia das complicações secundárias do Diabetes mellitus tais como: vasculopatias, nefropatias, catarata e neuropatias.

A δ -ALA-D é uma enzima essencial para todos os organismos aeróbicos, pois participa da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, os quais formam grupos prostéticos de proteínas fisiologicamente importantes como a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos (JAFFE & HANES, 1986; SASSA, 1998). A δ -ALA-D é uma enzima que contém grupos sulfidrílicos (-SH) e, conseqüentemente, sua

atividade é altamente sensível à presença de elementos pró-oxidantes, os quais podem oxidar seus grupos –SH (MACIEL et al., 2000; FARINA et al., 2001; SOARES et al., 2003).

A literatura relata uma coexistência freqüente entre Diabetes mellitus e doença porfírica em humanos e em modelos animais (CABALLERO et al., 1995; CABALLERO et al., 2000), o que pode estar ligado à inibição da enzima δ -ALA-D encontrada em diabéticos (POLO et al., 1995; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999). Essa enzima é considerada um bom marcador de estresse oxidativo, pois sua natureza sulfidrílica faz com que a enzima seja sensível à presença de agentes que possam oxidar seus grupamentos tiólicos, os quais são indispensáveis para sua atividade catalítica (RODRIGUES et al., 1989; ROCHA et al., 1993, 1995; BARBOSA et al., 1998;, 2000; MACIEL et al., 2000; FARINA et al., 2001).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diabetes e suas complicações crônicas

2.2 Histórico

O Diabetes é um mal reconhecido desde os primórdios da humanidade, sendo mencionada no papiro de Ebers, documento médico egípcio, (1500 A.C.) Posteriormente, Aretaeus (30 A. C.), médico romano, criou o termo Diabetes que originado do Grego significa “passar através de um sifão”. Por volta do século 11 D. C. a palavra “mellitus” foi adicionada ao termo diabetes com o sentido de caracterizar a urina dos pacientes como “doce de maneira semelhante ao mel” (DINSMOOR, 1996). No final do século 19 foi comprovada a função endócrina do pâncreas por Oskar Minkowski e Joseph vom Mering ao reproduzirem sinais clínicos do diabetes mellitus em cães pancreatomizados. Entre 1916 e 1920, o fisiologista Nicolas Paulesco publicou uma série de experiências provando que a injeção de extrato de pâncreas tinha a capacidade de diminuir a glicemia. Pouco tempo depois, em 1921, o cirurgião Frederic G. Banting e um estudante colaborador, Charles H. Best descobriram a insulina, fato que rendeu o prêmio Nobel de Medicina a Banting e J. J. R. Macleod (BANTING et al., 1922; MINKOWSKI, 1989).

A descoberta da insulina foi um verdadeiro avanço na história da doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes diabéticos, no entanto não foi capaz de prevenir o aparecimento das complicações secundárias do diabetes.

2.3 Conceito

O diabete mellitus é uma síndrome caracterizada por hiperglicemia com absoluta ou relativa deficiência de insulina, resultando em distúrbios no metabolismo de lipídios, glicídios e proteínas (GANNON, 2001; ATALAY & LAAKSONEN 2002).

2.4 Classificação

De acordo com o Comitê Executivo para Diagnóstico e Classificação do Diabetes mellitus da Associação de Diabetes Americana, as formas mais comuns e importantes do Diabetes mellitus podem ser divididas em dois tipos comuns (tipo 1 e tipo 2), os quais diferem nas suas características inerentes à resposta à insulina (ADA, 1997):

- *Diabetes mellitus* tipo 1, também conhecida como *Diabetes mellitus* dependente de insulina (DMDI) e previamente referida como diabetes de manifestação juvenil, corresponde à aproximadamente 10% de todos os casos de Diabetes mellitus primária;
- *Diabetes mellitus* tipo 2 ou *Diabetes mellitus* não dependente de insulina (DMNDI) é a forma mais comum da doença, afetando 85-90% da população diabética.

2.5 Complicações Secundárias do Diabetes

Embora a terapêutica utilizando insulina e hipoglicemiantes melhore a qualidade de vida dos pacientes diabéticos, eles não previnem o aparecimento de alterações secundárias decorrentes do diabetes. Essas enfermidades secundárias, tais como arteriosclerose, falência renal, catarata, retinopatia, neuropatia dentre outras, estão presentes na população em geral, mas afetam os diabéticos com maior intensidade, causando uma maior mortalidade e diminuição da qualidade de vida (BROWNLEE et al., 1984). Assim, o principal objetivo dos pesquisadores em diabetes é identificar as causas bioquímicas dessa acelerada degeneração tecidual e desenvolver drogas ou dietas para tentar diminuir esse processo (WOLFF et al., 1987).

2.6 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo compreende um desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes celulares presentes nos organismos vivos. Quando ele ocorre, é produzida uma série de substâncias pró-oxidantes, acima da capacidade antioxidante do organismo. Isso pode acontecer por superprodução de pró-oxidantes e/ou por deficiência no sistema antioxidante (BAYNES et al., 1991; PARTHIBAN et al., 1995).

A principal causa das complicações tardias do Diabetes é o estresse oxidativo, ocasionando danos teciduais por meio da peroxidação lipídica através de diferentes mecanismos (TAPPEL, 1973; SATO et al., 1979; BROWNLEE et al., 1984; WOLFF & DEAN, 1987; BROWNLEE, 1994; ANSARI et al., 1996; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000; ATALAY & LAAKSONEN 2002, HANS et al., 2003).

2.6.1.1 Espécies Reativas de Oxigênio

As principais ERO produzidas durante o metabolismo basal normal das células aeróbicas são o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}). O principal sítio de formação endógena do $O_2^{\bullet-}$ parece estar localizado na cadeia respiratória mitocondrial, quando o oxigênio consumido não é reduzido de forma tetravalente até H_2O , através da ação da citocromo c oxidase mitocondrial. Em condições fisiológicas, cerca de 2% do oxigênio consumido leva à redução monoelétrica, isto é, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos denominados ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

O superóxido ao receber mais um elétron forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo conhecido como dismutação. Logo, qualquer sistema biológico que

gera superóxido também pode produzir H_2O_2 pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$, a não ser que todo o superóxido seja interceptado por alguma outra molécula (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL, 1982). O H_2O_2 , que é outra ERO, também pode ser formado diretamente pela redução divalente do oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1978; HALLIWELL, 1982). Essa ERO é tóxica à maioria das células em concentrações entre 10 e 100 μM e mistura-se facilmente com água, sendo muito difusível dentro e entre as células *in vivo* (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A produção intracelular do HO^{\bullet} a partir da reação do $O_2^{\bullet-}$ com o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss, postulada em 1934), ou da reação do H_2O_2 com metais de transição como ferro e cobre (reação descrita por Fenton em 1894), tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e nocividade (HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Normalmente, os íons de ferro e de cobre estão impossibilitados de catalisarem reações oxidativas nos organismos vivos, pois estão ligados à transferrina ou à ceruloplasmina, respectivamente. No entanto, durante a injúria celular, o ferro pode ser liberado das proteínas e acelerar o processo de peroxidação pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos em radicais alcoxil e peroxil (HALLIWELL, 1982; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1986). Além disso, esses íons podem ser liberados das ligações com as proteínas após redução pela cisteína, ácido ascórbico ou $O_2^{\bullet-}$. Também, o HO^{\bullet} pode ser gerado nos sistemas biológicos por outras fontes como: ozônio, decomposição do ácido peroxinitroso, radiação ionizante e ultra-som (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

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

membranas celulares, além de danificar proteínas e outras moléculas orgânicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A principal causa das complicações tardias do Diabetes é o estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia, e em consequência desse aumento de radicais livres ocorrem danos teciduais por meio da peroxidação lipídica (TAPPEL, 1973). A hiperglicemia pode ativar três principais vias de formação de ERO: glicação não enzimática, autoxidação da glicose e ativação da via dos poliois (SATO et al., 1979; BROWNLEE et al., 1984; WOLFF & DEAN, 1987; BROWNLEE, 1994; ANSARI et al., 1996; Bonnefont-Rousselot et al., 2000; Atalay & Laaksonen 2002; Hans et al., 2003).

2.7 Fisiopatologia das Complicações Diabéticas

2.7.1 Glicação não Enzimática

É bem conhecida a capacidade da glicose em ligar-se às proteínas e sabe-se que esse processo pode causar produção de radicais livres (DAY et al., 1979; WOLFF et al., 1987a; 1987b; HUNT et al., 1988; FU et al., 1992; CARUBELLI et al., 1994; SCHWARTZ et al., 1995; GUGLIUCCI et al., 1996; RAHBAR et al., 1999; SOLUIS et al., 1999; CHEVALIER et al., 2002; FORBES et al., 2003).

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

A glicação com formação da Base de Schiff e posterior rearranjo para os Produtos de Amadori são reações não enzimáticas reversíveis, enquanto a produção dos PTGAs são reações irreversíveis.

Nesse modelo, a glicose reage com grupamentos amins de proteínas formando uma base de Schiff em uma reação reversível. Esse intermediário instável sofre um rearranjo reversível para uma cetoamina, mais estável, que é também chamada de produto de Amadori, em homenagem ao químico italiano que primeiramente observou esse composto. O termo “estresse carbonílico” é usado na literatura para salientar a produção excessiva desses compostos. Os produtos de Amadori, após um período de meses, podem reagir com grupamentos amins de outras proteínas e formar ligações cruzadas irreversíveis como de condensação, β eliminação ou hidratação e, portanto, alterar a estrutura e a função dessas proteínas. Estas reações resultam na formação de produtos irreversíveis, chamados de Produtos Terminais de Glicação Avançada (PTGA), ou “Advanced Glycation End Products” (AGE’s), (VLASSARA et al., 1994; BIERHAUS et al., 1998; MOHAMED et al., 1999; RAHBAR et al., 1999).

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

maior a glicemia, o tempo de diabetes e o descontrole metabólico, maior a produção de PTGAs e maiores são os danos às proteínas (RAHBAR et al., 1999).

2.7.2 Autoxidação da Glicose

A autoxidação da glicose é outra via pelo qual a hiperglicemia causa estresse oxidativo. Nessas reações, compostos contendo uma estrutura de alfa-hidroxialdeído podem sofrer oxidação catalisada por metais de transição com geração de peróxido de hidrogênio, radicais livres e cetaldeídos.

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

2.7.3 Via dos Poliois

A via dos poliois é constituída basicamente por duas etapas, uma catalisada pela enzima aldose redutase e outra catalisada pela enzima sorbitol desidrogenase. Diversos estudos demonstram que a glicose em concentrações intracelular elevadas é preferencialmente metabolizada através da via dos poliois pois induz a síntese e ao aumento da atividade das enzimas aldose redutase e sorbitol desidrogenase. Nesta via, a glicose primeiramente é reduzida por ação da enzima aldose redutase a sorbitol, enzima esta que utiliza Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfatada reduzida (NADPH) como cofator. Está provado cientificamente que a hiperglicemia induz a síntese e aumento da atividade desta enzima, portanto, um aumento da via dos poliois resulta em depleção dos níveis intracelulares de NADPH. Enzimas antioxidantes como a Glutathiona redutase, responsável pela manutenção do estado

reduzido da glutathiona peroxidase, necessita de NADPH e tem sua atividade prejudicada pela referida depleção de NADPH resultando em aumento nos níveis de ERO intracelulares. A segunda etapa da via dos poliois consiste da oxidação do sorbitol produzido à frutose, sendo que tal reação é catalisada pela enzima sorbitol desidrogenase que utiliza NAD^+ como cofator. (NAKAMURA et al., 1995; TRUEBLOOD & RAMASAMY 1998; RAMASAMY et al., 1998; BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000; ATALAY & LAAKSONEN 2002; HANS et al., 2003).

A atividade aumentada da enzima sorbitol desidrogenase leva a depleção dos níveis intracelulares de NAD^+ , aumentando assim a razão $\text{NADH}:\text{NAD}^+$, levando a pseudohipóxia hiperglicêmica. Esta pseudohipóxia também contribui para aumentar os níveis de radicais livres, pois com depleção dos níveis de NAD^+ , a via glicolítica fica prejudicada resultando em diminuição dos níveis intracelulares de 2,3 difosfoglicerato, um importante regulador da oxigenação tecidual (NAKAMURA et al., 1995).

2.8 ERITRÓCITOS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica é um processo complexo conhecido como uma deterioração oxidativa dos lipídios poliinsaturados, isto é, lipídios que contêm, no mínimo, dois carbonos unidos por ligações covalentes duplas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As membranas das células e das organelas são mais suscetíveis à peroxidação lipídica, pois contêm grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Assim, o processo de peroxidação lipídica envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, consumo de oxigênio, um rearranjo das duplas ligações nos lipídios insaturados e a eventual destruição dos lipídios da membrana, produzindo uma variedade de produtos de degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e éteres (BUEGE & AUST, 1978). Embora o radical livre inicial produza

somente efeitos locais, os radicais posteriores e os produtos de degradação possuem efeitos biológicos distantes do local onde o primeiro foi produzido (SOUTHORN & POWIS, 1988).

A peroxidação lipídica é um processo natural de renovação das membranas celulares. Entretanto, o estresse oxidativo aumenta a peroxidação lipídica e provoca severo dano nas membranas celulares, produzindo perda da fluidez e quebra das funções secretórias e de gradientes iônicos transmembrana (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Dependendo do grau de severidade, a peroxidação lipídica pode causar desde alterações na permeabilidade da membrana até perda da função secretória e morte celular (MEERSON., 1982). Além disso, se a peroxidação lipídica atingir a membrana lisossomal, pode haver a liberação de enzimas lisossômicas e fosfolipases acelerando a degradação das membranas. Em adição, as alterações na permeabilidade podem levar a um acúmulo de cálcio intracelular o que ativaria as fosfolipases dependentes de cálcio, ocasionando a formação de um ciclo vicioso. Além de ser um fator no processo de renovação das membranas, a peroxidação lipídica é essencial para a biossíntese de prostaglandinas e leucotrienos, assim como na fagocitose, pinocitose e lise das membranas intracelulares (MEERSON et al., 1982).

Fisiologicamente, os eritrócitos estão constantemente expostos a ERO devido a sua função no transporte de oxigênio via hemoglobina. Porém, os mesmos possuem um sistema enzimático detoxificador de radicais livres constituído pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (TIANO et al., 2000). No diabetes, este sistema detoxificador não consegue impedir o efeito da grande formação de radicais livres causado pela hiperglicemia (RIZVI & ZAID, 2001).

A peroxidação lipídica em eritrócitos é intensamente estudada como um modelo de dano oxidativo à biomembranas e tem sido descrito que radicais livres atacam a membrana de eritrócitos podendo causar hemólise (KONDO et al., 1997). Estudos demonstram aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos em modelos experimentais de estresse oxidativo bem como a diminuição da fragilidade osmótica (BATNA & FUCHS, 1997; KONDO et al., 1997; TESORIERE et al., 1999; FERNANDEZ & FINK, 2000; BRZEZINSKA, 2001).

2.9 ENZIMAS SULFIDRÍLICAS

2.9.2 DELTA-AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

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

2.9.2.1 Ação Catalítica

O sítio ativo da enzima parece ser composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (TSUKAMOTO et al., 1979; CHINARRO et al., 1983; JAFFE et al., 1994). Um grupamento ϵ -amino de um resíduo de lisina presente no sítio ativo forma uma base de Schiff com o C₄ da primeira molécula de substrato, a qual origina a cadeia lateral propiônica da molécula de porfobilinogênio (JAFFE & HANES, 1986). A união desta primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamentos sulfidrílicos reduzidos. No entanto, para a união da segunda molécula

de δ -ALA, a qual originará a cadeia lateral A (acética) do PBG, são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (JAFFE & MARKHAM, 1987). As duas moléculas de substrato interagem no sítio ativo da enzima, aparentemente, através de uma ligação carbono-nitrogênio (base de Schiff) (JAFFE et al., 1990). A δ -ALA-D possui 8 subunidades, no entanto, apenas metade das subunidades parece estar envolvida na catálise (SHEMIN, 1976; JAFFE & HANES, 1986).

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

- a- um resíduo de lisina ao qual se liga a primeira molécula de substrato, através da formação de uma base de Schiff (GIBBS & JORDAN, 1986);
- b- um resíduo de histidina, o qual pode sofrer foto-oxidação, reduzindo tanto a atividade enzimática quanto a ligação ao zinco (TSUKAMOTO et al., 1979). Este resíduo poderia participar no mecanismo de transferência de prótons do meio aquoso ao sítio ativo hidrofóbico (BATLLE & STELLA, 1978);
- c- dois resíduos de cisteína, os quais devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (GIBBS et al., 1985). Estes resíduos são altamente reativos, podendo formar uma ponte dissulfeto em presença de ar, mercaptídeos por reação com metais pesados ou ser modificados por agentes químicos. A oxidação desses resíduos leva à inativação com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979).

2.9.2.2 Importância toxicológica

Devido a sua natureza sulfidrílica, a enzima δ -ALA-D pode ser inibida por radicais livres e uma variedade de não metais e metais pesados que possuam a propriedade química de oxidar grupamentos SH. (GIBSON et al., 1955; WILSON et al., 1972;

FINELLI et al., 1975; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979; NELSON et al., 1981; GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; RODRIGUES et al., 1989, 1996; BORRALHO et al., 1990; ROCHA et al., 1993, 1995; EMANUELLI et al., 1996). A inibição da δ -ALA-D pode prejudicar a rota biossintética do heme, resultando em conseqüências patológicas (SASSA et al., 1989; GOERING, 1993). Além da insuficiente produção de heme, a inibição da δ -ALA-D pode resultar no acúmulo do substrato ALA no sangue. O acúmulo de ALA está relacionado com a superprodução de ERO (MONTEIRO et al., 1989; PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993). Alguns estudos demonstram que o excesso de ALA decorrente da inibição da δ -ALA-D induz a peroxidação lipídica no baço e no fígado (OTEIZA et al., 1994).

2.9.2.3 Relação entre a Atividade da δ -ALA-D e Diabetes

Como mencionado anteriormente, a δ -ALA-D é uma enzima essencial para todos os organismos aeróbicos, uma vez que ela participa da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos, os quais formam grupos prostéticos de proteínas fisiologicamente importantes como a hemoglobina e os citocromos (JAFFE et al., 1995; SASSA, 1998).

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

de diabetes na população porfírica e, também, que a porfiria pode fazer parte da relação das chamadas complicações diabéticas tardias (CABALLERO et al., 1995).

O estresse oxidativo é relacionado como causa principal da inibição da δ -ALA-D em eritrócitos de camundongos com diabetes induzido por STZ e também em eritrócitos humanos. Nesse mecanismo a atividade é recuperada com adição de tióis e zinco (BITAR et al., 1984; FERNÁNDEZ-Cuartero et al., 1999), como verificado nos resultados do nosso estudo onde a atividade da δ -ALA-D foi inibida incubando eritrócitos com altas concentrações de glicose e prevenindo esta inibição com DTT.

Caballero e colaboradores (1998), realizaram um estudo incubando eritrócitos humanos por 20 horas com 500 mmol/l de glicose e nessas condições, verificaram uma inibição da enzima δ -ALA-D proporcional à formação de hemoglobina glicada. Folmer et al., (2002) observaram no tecido renal, hepático e cerebral uma correlação negativa entre a atividade da δ -ALA-D e a porcentagem de HbA_{1c}, e, da mesma forma, entre a atividade da δ -ALA-D e os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesse trabalho, o estresse oxidativo levando à oxidação dos grupamentos sulfidrílicos de resíduos de lisina e/ou a glicação dos mesmos são numerados como possíveis fatores responsáveis pela inibição da enzima.

2.9.3 Lactato Desidrogenase

A enzima LDH catalisa a conversão do piruvato em lactato e vice-versa. Esta enzima pode ser encontrada em muitos tecidos, especialmente no coração, fígado, rins, músculo esquelético, pulmões e nas células sangüíneas e cerebrais.

A LDH apresenta-se como 5 isoenzimas diferentes (A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃, e B₄), constituída por quatro cadeias polipeptídicas, diferindo ligeiramente na sua estrutura. A LDH-A₄ pode ser encontrada em maiores concentrações no músculo

esquelético e catalisa a redução do piruvato até lactato utilizando Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo (NADH) como cofator, enquanto que a isoenzima B4 é encontrada no músculo cardíaco e catalisa a oxidação do piruvato até lactato.

A enzima contém dois centros de ligação, o centro de ligação à coenzima NADH característico das enzimas desidrogenases ("dobra Rossmann"), e o centro de ligação do substrato (KUTZENKO & LAMZIN, 1998). A LDH de músculo, assim como a de outros tecidos, contém zinco como componente funcional do sítio ativo da enzima (VALLEE & WACKER, 1956) e pode ser inibido por reagentes que possuem capacidade de oxidar grupos SH (NEWLANDS, 1954). A LDH é uma enzima citosólica que pode aumentar sua atividade no músculo após o exercício físico exaustivo e após o exercício físico de alta intensidade em humanos (SIMONEAU et al., 1987). No entanto, há relatos que o exercício físico aeróbico não causa alteração na atividade da LDH (HOLLOSZI, 1967a; 1984b; GOLLNICK & KING, 1969).

2.9.4 Succinato Desidrogenase

A SDH é a enzima que catalisa uma das etapas do ciclo de Krebs, sendo a única enzima do ciclo que está ligada à membrana interna da mitocôndria fazendo parte física dela. Esta enzima também denominada ferro-proteína não hemínica, contém três tipos diferentes de aglomerado ferro-enxofre, 2Fe-2S (dois ferros ligados a dois sulfetos inorgânicos), 3Fe-4S e 4Fe-4S e uma molécula de Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) covalentemente ligada. (SINGER & JOHNSON, 1985). A subunidade catalítica está ligada à membrana por dois pequenos peptídeos hidrofóbicos requeridos para o complexo enzimático interagir com a quinona e transferir os elétrons para o elemento subsequente da cadeia de transporte de elétrons (HAGERHALL, 1997).

A SDH catalisa a oxidação do succinato a fumarato, onde o substrato transfere dois elétrons para o FAD. Estes elétrons são então transportados, um a um, através dos diferentes grupamentos ferro-enxofre até o grupamento heme. Assim como a enzima δ -ALA-D e LDH, a enzima SDH é suscetível à oxidação dos grupos SH por agentes oxidantes e perdem atividade quando estes grupos tióis são oxidados (LEQUOC et al., 1981). O exercício aeróbico crônico e o treinamento físico aumentam a atividade da SDH de acordo com o requerimento aeróbico da fibra muscular pelo exercício (CHILIBECK et al., 1998; TERBLANCHE, et al., 2001), assim como a suplementação com dietas antioxidantes pode aumentar sua atividade (SHARMAN & BONDY, 2001).

2.10 Exercício Físico e Diabetes

O exercício físico é de fundamental importância na terapia do Diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. Estudos sugerem que o exercício físico e a boa forma física podem diminuir os riscos de doenças cardiovasculares, tanto em pessoas não diabéticas como diabéticas tipo 1 e tipo 2 (PAFFENBARGER et al., 1986; EKELUND et al., 1988; BLAIR et al., 1989; MOY et al., 1993; SANDVIK et al., 1993; LAKKA et al., 1994; WEI et al., 2000; LAUKKANEN et al., 2001).

Estudos em humanos têm demonstrado que o exercício físico aumenta a sensibilidade à insulina (ARCIERO et al., 1995; KATZEL et al., 1995; DENGEL et al., 1996; PERSEGHIN et al., 1996; COX et al., 1999; RICE et al., 1999), tanto em indivíduos magros (LE BLANC et al., 1979; HARDIN et al., 1995; PERSEGHIN et al., 1996; COX et al., 1999) como obesos (ARCIERO et al., 1995; KATZEL et al., 1995; DENGEL et al., 1996; RICE et al., 1999) e diabéticos tipo 2 (ARCIERO et al., 1995), mesmo durante a sobrecarga oral ou intravenosa de glicose (LE BLANC et al., 1979; KATZEL et al., 1995; DENGEL et al., 1996; COX et al., 1999; RICE et al.,

1999).

2.10.1 Exercício Físico e Sensibilidade à Insulina

Os mecanismos responsáveis pelo efeito do treinamento físico na ação da insulina e na captação de glicose ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, três mecanismos podem ser sugeridos. Primeiro, o treinamento físico aumenta o fluxo sanguíneo muscular, o que facilita a ação da insulina e a captação de glicose (HARDIN et al., 1995). Segundo, o treinamento físico aumenta a agregação da insulina ao seu receptor, em consequência de um maior número de receptores (LE BLANC et al., 1979) e uma maior concentração de transportadores de glicose (GLUT4) na membrana celular (HARDIN et al., 1995; COX et al., 1999), o que melhora a captação de glicose. Terceiro, o treinamento físico potencializa o metabolismo não-oxidativo da glicose, a partir do aumento da atividade da enzima glicogênio-sintase (PERSEGHIN et al., 1996), o que aumenta a captação de glicose.

RESISTÊNCIA À INSULINA

A obesidade é a causa mais freqüente de resistência à insulina sendo que os fatores dieta e sedentarismo representam as principais causas de obesidade e subsequente resistência à insulina. Está comprovado cientificamente que dietas contendo alta proporção de carboidratos rapidamente absorvíveis promovem o desenvolvimento de resistência à insulina em humanos e modelos experimentais com animais de laboratório (STORLIEN et al., 1986; BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996; HANSEN et al., 1998; STORLIEN et al., 2000). Da mesma maneira, dietas contendo alta proporção de lipídios são consideradas um importante fator no desenvolvimento de resistência a insulina e obesidade, pois diminuem significativamente a expressão e translocação dos GLUT4 no músculo esquelético e

tecido adiposo (HENRIKSEN, 2002; GRECO et all 2002).

Outro mecanismo proposto é que ácidos graxos de cadeia longa promovem a fosforilação de resíduo de serina do receptor de insulina do músculo esquelético e subseqüentemente diminui a translocação dos GLUT4 para a membrana plasmática. (GARRY & DENIS, 2002).

2.11 ESTRESSE OXIDATIVO EXERCÍCIO-INDUZIDO

Embora o exercício físico melhore a qualidade de vida do paciente diabético, diferentes resultados são encontrados na literatura no que diz respeito ao efeito do exercício físico sobre o estresse oxidativo no Diabetes mellitus. Alguns estudos sugerem que o exercício físico extenuante ou até mesmo moderado aumenta a produção de ERO, além da capacidade de detoxificação das defesas antioxidantes, resultando em estresse oxidativo (WALLBERG-HENRIKSSON et al., 1982; YKI-JARVINEN et al., 1984; WALLBERG- HENRIKSSON et al., 1986; KEDZIORA et al. 1995; STEFANICK et al., 1998). Por outro lado, outros estudos indicam que o exercício físico pode fortalecer as defesas antioxidantes e diminuir o estresse oxidativo (SEM, 1995; JI, 1996; ALESSIO & BLASI, 1997; SENTURK et all., 2001; ATALAY & LAAKSONEN 2002; GANDRA et al., 2004).

O exercício físico intenso pode ativar três principais vias de formação de ERO: produção mitocondrial, produção citoplasmática e produção favorecida pelos íons ferro e cobre.

2.11.1 Produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio

Na mitocôndria, o oxigênio consumido é reduzido à água, a enzima catalisadora desta reação é a citocromo oxidase, a qual impede a produção elevada de ERO. No entanto, de 2% a 5% do oxigênio consumido pelos organismos gera

normalmente ERO nestas organelas, com a formação do íon superóxido e de peróxido de hidrogênio (PARKER, 2002). Considerando que durante o exercício o consumo total de O₂ aumenta de 10 a 20 vezes, ocorre um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular, e que o nível de fluxo sanguíneo no músculo é cerca de 10 vezes maior, é razoável supor que a produção mitocondrial de superóxido se encontra igualmente aumentada (KOURY & DONANGELO, 2003).

2.11.2 Produção citoplasmática de espécies reativas de oxigênio

Durante o exercício, o fluxo sanguíneo é restrito em diversos órgãos e tecidos, para aumentar o aporte para os músculos ativos. Assim, as regiões privadas temporariamente do fluxo entram num estado de hipóxia, que é maior quanto mais intenso o exercício e quando se supera a capacidade aeróbia máxima (VO₂ max). Inclusive o próprio músculo ativo entra em um estado de hipóxia por insuficiência do aporte energético. Ao finalizar a atividade intensa, todas as áreas afetadas são reoxigenadas, compreendendo o fenômeno de isquemia-reperfusão, com grande produção de ERO (PARKER, 2002). Devido ao estado de hipoxia ocorre elevação da atividade do ciclo de degradação das purinas. Neste ciclo, a adenosina monofosfato (AMP) é desaminada pela enzima adenilato desaminase, à inosina monofosfato (IMP) que se acumula no músculo esquelético. Como a IMP não se difunde rapidamente do músculo esquelético durante o exercício intenso, o seu acúmulo pode levá-la a uma via secundária de metabolização, ocasionando a formação de hipoxantina, xantina, ácido úrico, oxi-radicais e peróxido de hidrogênio, produtos finais da degradação de adeninas. Na presença de oxigênio molecular, a enzima xantina oxidase catalisa a oxidação da hipoxantina a xantina e esta à ácido úrico. Em condições de repouso, esta enzima está na forma de xantina

desidrogenase (pouco ativa), utilizando o NAD⁺ como aceptor de elétrons. Quando há isquemia provocada pelo exercício intenso, essa enzima é convertida à forma oxidase usando o oxigênio molecular como aceptor de elétrons, gerando com isso íon superóxido e peróxido de hidrogênio (KOURY & DONANGELO, 2003).

2.11.3 Produção de espécies reativas de oxigênio favorecidas pelos íons ferro e cobre

O ferro e o cobre são transportados, utilizados e estocados ligados a proteínas específicas (transferrina, ferritina e ceruloplasmina), as quais previnem ou minimizam as reações de oxidação catalisadas por estes minerais. Existem evidências de que no citossol das células hepáticas há “ferro livre” ou “ferro lábil” (não ligado a ferritina), definido como aquele ligado fracamente a compostos de baixo peso molecular. Este ferro é facilmente dissociado na forma de íon, tornando-se cataliticamente ativo e apto a participar das reações de produção de ERO através da reação de Fenton. Essas espécies causam vários prejuízos celulares, inclusive às proteínas reguladoras e/ou limitadoras da captação do ferro extracelular. Como consequência do excesso oxidativo, ocorre injúria celular com a possível destruição da membrana e morte celular. Existem fatores durante a atividade física intensa, tal como a acidose metabólica, que podem liberar ferro da hemoglobina (ou da mioglobina), tornando-o disponível para participar da formação do radical OH[•] intracelular. Nos eritrócitos, esta liberação é acompanhada pela formação de metahemoglobina, principalmente quando os mesmos estão depletados de glutatona reduzida. A liberação do ferro é acompanhada pela peroxidação lipídica da membrana e como consequência ocorre hemólise (KOURY & DONANGELO, 2003).

2.12 Mecanismos de Defesa Antioxidante

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

Entre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante do organismo destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutational peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO. Através delas, as células tentam manter baixas as quantidades do radical superóxido e de peróxidos de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil.

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos é específica na remoção do radical $O_2^{\bullet-}$, catalisa a dismutação do radical $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 através da seguinte reação: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. O H_2O_2 por sua vez é degradado pela ação da CAT ou GPx, resultando em água e O_2 . As SOD que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD) estão presentes em quase todas as células eucarióticas. Nas células animais, a maior quantidade de CuZn-SOD está no citosol, mas pode estar presente nos peroxissomas, lisossomas, núcleo e no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria. A SOD que contém manganês no seu sítio ativo (Mn-SOD) é encontrada em bactérias, plantas e animais. Na maioria dos tecidos animais este tipo de SOD está localizado na mitocôndria.

O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é removido geralmente por dois tipos

de enzimas: (a) catalase (CAT), que catalisa diretamente a decomposição de H_2O_2 e (b) peroxidases (GPx), as quais removem H_2O_2 para oxidar outros substratos (SH_2).

A atividade da catalase (CAT) está localizada em grande quantidade nos peroxissomas. Uma pequena concentração de CAT pode ser encontrada, também, na mitocôndria (fígado), nos cloroplastos e no retículo endoplasmático.

A família das glutathionas peroxidases (GPx) removem H_2O_2 acoplando sua redução à água com a oxidação da glutathiona reduzida (GSH). Também as enzimas GPx podem agir sobre outros peróxidos além do H_2O_2 . Elas contêm selênio (Se) no sítio ativo e estão vastamente distribuídas nos tecidos.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo tiol (-SH) e é substrato para a GPx. A glutathiona oxidada (GSSG), resultante da reação catalisada pela GPx, é reduzida a GSH pela enzima glutathiona redutase (GRd) que utiliza NADPH para catalisar a reação.

Além da sua função como cofator para a família de GPx, a glutathiona está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ácido ascórbico, comunicação entre células e prevenção da oxidação de grupos -SH de proteínas evitando pontes intercadeias. Em adição, a GSH pode quelar íons cobre e diminuir sua habilidade para gerar radicais livres. A maior parte da glutathiona livre intracelular *in vivo* está na forma reduzida (GSH) e não na forma oxidada (GSSG). Contudo, uma parte pode ser encontrada como dissulfetos mistos com outros compostos que contêm grupos -SH. Os grupos tióis (-SH) nas proteínas são freqüentemente essenciais para a sua estabilidade e/ou função. Além disso, os grupos tióis de proteínas (proteína -SH) podem reagir com GSSG e formar dissulfetos mistos, processo denominado S-tiologia de proteínas.

Como as defesas antioxidantes fisiológicas podem variar notavelmente de um indivíduo para outro, hábitos dietéticos que assegurem o fornecimento adequado de

uma combinação de antioxidantes pode ser uma medida prudente a indivíduos que praticam atividade física regular. Também, devido ao fato de que o exercício extenuante agudo e o exercício crônico aumentam o consumo de vários antioxidantes, é concebível que a suplementação dietética de específicos antioxidantes seja benéfica.

2.13 Organocalcogênios

2.13.1 Selênio

O selênio é um elemento traço, cuja essencialidade nutricional foi demonstrada em 1957 (SCHWARTZ & FOLTZ, 1957). Atualmente, a deficiência de selênio tem sido apontada como a principal causa de algumas patologias tal como a degeneração da musculatura esquelética cardíaca e hepática. Outras patologias associadas à deficiência de selênio, encontradas em humanos, são: problemas musculares, alterações digestivas, doenças cardiovasculares, alterações reumáticas, alguns tipos de neoplasias e diabetes. (ORTUÑO et al., 1996; JASKIEWICZ et al., 1998; DOUILLET et al., 1999; NAVARRO-ALARCÓN et al., 2000).

Atualmente, o selênio tem despertado um grande interesse científico entre os pesquisadores no que diz respeito ao diabetes, pois diversas pesquisas com animais, particularmente roedores, têm demonstrado a atividade insulinomimética do selênio principalmente na forma inorgânica de selenato de sódio (McNEILL et al., 1991; BECKER et al., 1996; BATTELL et al. 1998; MUELLER et al., 2003). O selênio apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante como antioxidante, participando como grupo prostético da enzima glutathione peroxidase na forma de selenocisteína, um dos principais sistemas antioxidantes no organismo (LANDESTEIN, 1979; MULLER et al.; 1984; WINGLER & BRIGELIUS-FLOHÉ,

1999).

Com a descoberta do papel essencial do selênio no centro ativo da enzima glutationa peroxidase e com o aumento do entendimento do papel fisiológico do selênio na regulação do dano oxidativo (CADENAS & SIES, 1985; URSINI & BINDOLI, 1987), aumentou o interesse na síntese de compostos orgânicos contendo selênio que possuam propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (PARNHAM & GRAF, 1991).

2.13.2 Ebselen

Experimentos feitos *in vitro* revelaram que o composto (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona) ou Ebselen, como este composto é chamado, exibe atividade glutationa peroxidase, *per se*, catalizando a redução da H₂O₂ e de hidroperóxidos na presença de glutationa como substrato (MULLER et al.; 1984; MUGESH, et al., 2001; MULLER et al.; 2001, KLOTZ & SIES, 2003;). Por inibir a peroxidação lipídica o Ebselen tem sido usado como antioxidante, como neuroprotetor em cultura de neurônios, no tratamento clínico de pacientes com isquemia aguda (YAMAGUCHI et al., 1998; Kondoh et al., 1999) e como antiinflamatório (PARNHAM & GRAF, 1991, NOGUEIRA et al., 2004). Devido aos diversos indicativos clínicos de redução de danos cerebrais após aneurisma, este composto aponta como um promissor agente neuroprotetor (SAITO et al., 1998).

Existem diversos estudos demonstrando a atividade do tipo tiol peroxidase do Ebselen, o que poderá motivar o uso terapêutico destes compostos. De fato, isto representaria uma vantagem econômica, uma vez que a síntese destes compostos é muito simples.

3 Objetivos

Objetivos Gerais

Considerando que diversos estudos comprovam o efeito nocivo do estresse oxidativo no Diabetes mellitus e no exercício físico, o presente trabalho visa:

↪ Induzir estresse oxidativo *in vivo* e *in vitro* e investigar a resposta de eritrócitos humanos submetidos à incubação com altas concentrações de glicose e frutose sobre alguns parâmetros indicativos de estresse oxidativo;

↪ Investigar o efeito de altas concentrações de glicose ou frutose sobre a atividade de enzimas sulfidrílicas;

↪ Investigar o efeito de altas concentrações de glicose ou frutose sobre a glicação da hemoglobina e resistência osmótica dos eritrócitos de pessoas normais e diabéticas tipo II e o possível papel protetor do ebselen;

↪ Investigar o efeito da suplementação de selênio na dieta sobre a atividade de enzimas sulfidrílicas como δ -ALA-D, LDH e SDH, sensíveis a elementos pró-oxidantes, em diferentes tecidos de camundongos exercitados;

↪ Investigar o efeito do exercício físico em camundongos alimentados com dietas contendo elevados níveis de glicose ou sacarose sobre a resistência a insulina, perfil oxidativo e influência sobre a atividade da enzima δ -ALA-D.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos, os quais encontram-se aqui organizados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos. Os artigos estão aqui dispostos de maneira a proporcionar um melhor entendimento do estudo como um todo.

**4.1 ARTIGO – 1 EBSELEN EXHIBITS GLYCATION-INHIBITING PROPERTIES
AND PROTECTS AGAINST OSMOTIC FRAGILITY OF HUMAN
ERYTHROCYTES *IN VITRO***

Julio C. Soares, Vanderlei Folmer, João T. Rocha

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

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

*CORRESPONDING AUTHOR:

JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Phone: 021-55 220-8140

FAX: 021-55 220-8978

e-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

ABSTRACT

Diabetic status is associated with an increase in oxidative stress markers in humans and animal models. Here we evaluated the *in vitro* effects of high glucose concentrations on the profile of oxidative stress and osmotic fragility on erythrocytes of control and diabetic patients. Ebselen is an organochalcogen that is under clinical trials for the treatment of other diseases associated with oxidative stress. Here we evaluated whether its antioxidant properties could afford some protection against glucose-induced osmotic fragility and also whether ebselen could act as an inhibitor of hemoglobin glycation. Exposure of erythrocytes to glucose (5-100 mmol/l) caused a concentration dependent increase on HbA1c ($p < 0.001$) and TBA-RS contents ($p < 0.004$). Non-protein SH groups (NPSH) also increased significantly as the concentration of glucose increased up to 30 mmol/l ($p < 0.001$). The osmotic fragility was more pronounced in erythrocytes of uncontrolled diabetic patients than in those of non-diabetic subjects. Ebselen significantly reduced the glucose-induced increase in osmotic fragility and inhibited HbA1c formation ($P < 0.0001$). Results of the present study indicate that erythrocytes from patients with uncontrolled diabetes are more sensitive to osmotic shock than those from patients with controlled diabetes and normal subjects. Furthermore, the protective role of ebselen against osmotic fragility indicates that erythrocytes from patients with uncontrolled diabetes are exposed to an increased production of free radical *in vivo*. Here we also demonstrated for the first time that ebselen also showed *in vitro* glycation-inhibiting properties, indicating a possible therapeutic use of this compound. However, other studies are necessary to establish whether ebselen could be considered for the treatment of diabetic patients.

Keywords: Hyperglycemia; Oxidative stress; TBA-RS; Erythrocytes, Ebselen

INTRODUCTION

Diabetic state has been shown to be associated with increased oxidative stress and the persistence of hyperglycemia has been reported to cause an increased production of oxygen free radicals through glucose auto-oxidation, non-enzymatic glycation, advanced glycation endproducts formation and polyol pathway (1-15). Importantly, elevated levels of circulating glucose can produce permanent chemical alterations in proteins and increase lipid peroxidation in a variety of experimental models of hyperglycemia (12, 15, 16). Furthermore, the deleterious effects of hyperglycemia on the properties of physiologically abundant proteins such as hemoglobin, albumin, and collagen have been investigated (10, 14).

Antioxidant deficiency in erythrocytes has been reported to be one of the first alterations resulting from hyperglycemia even before the development of full diabetic state. Consequently, supplementation with antioxidants has been proposed as a complementary treatment for diabetes and some of the anti-diabetic agents may have by themselves antioxidant properties independently of their role in glucose control (2, 6, 17-20).

Erythrocytes are constantly exposed to reactive oxygen species and this can be enhanced by hyperglycemia (21). The oxidation of erythrocytes has been extensively studied as a model of oxidative damage to biomembranes in which the free radicals attack erythrocyte membranes, oxidizing lipids and proteins. These alterations in membrane structure can subsequently cause hemolysis (22-24) and, in line with this, previous reports have described an increase in the osmotic fragility of erythrocytes in experimental models of oxidative stress (22, 24-26). However, there are scant data on the literature about the osmotic fragility of erythrocytes from diabetics patients.

Ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3 2*H* -one) is a mimetic of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) (22, 27-32) and have been used with success in the treatment of pathological situation associated with oxidative stress (27, 33-36). In fact, the mechanism of ebselen antioxidant effects can be related to its GPx-like activity and to a direct inhibition of pro-oxidative cellular pathways such as the inhibition of inflammatory cascade (for review see 37 and 38).

To the best of our knowledge, there is no data in the literature regarding the potential protective effect of ebselen against hyperglycaemia induced oxidative stress in erythrocytes. The aim of this study was to investigate the response of human erythrocytes to incubations with relatively high concentrations of glucose and fructose in selected parameters indicative of oxidative stress. Furthermore, the *in vitro* glycation of hemoglobin and osmotic fragility of erythrocytes were also investigated because data in the literature indicate that oxidative stress produced by hyperglycemia may be an important factor interfering with hemoglobin glycation (6, 12, 39, 40) and with erythrocyte osmotic fragility. We also investigated whether ebselen modified hemoglobin glycation or osmotic fragility of erythrocyte exposed to high concentration of glucose or fructose. Importantly, here we demonstrated for the first time, that ebselen afforded protection against *in vitro* osmotic lysis of erythrocytes of uncontrolled type II diabetic patients and reduced osmotic fragility and the hemoglobin glycation of erythrocytes from normal subjects exposed to hyperglycemia.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Controlled type II diabetics patients were classified as those whose fasting blood glucose levels were less than 110 mg/dl for at least 4 weeks and whose glycated hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) was less than 8%. Subjects were considered uncontrolled type II diabetics when their fasting blood glucose levels were higher than 180 mg/dl and their glycated hemoglobin was higher than 8.5%.

Blood sample collection

Blood samples from 20 healthy donors and 20 samples from diabetic patients (10 controlled diabetic and 10 uncontrolled diabetic) (10 ml each) were drawn in the fasting state and processed within 1h of collection. Blood samples were transferred to sterile polypropylene tubes containing heparin. For experiments *in vitro*, samples were centrifuged for 10 min at 1,500g and erythrocytes were washed three times with NaCl 0.9% (wt/vol).

Tubes containing 1.5 ml of cell suspension from healthy donors were incubated with different glucose or fructose concentrations at 37°C for 24 or 48 hours. The composition of the erythrocyte suspension was as follows (in mmol/l): sodium chloride 150, glucose or fructose 0, 10, 20, 30, 40 or 100 and Tris/HCl 10, pH 7.4. Gentamicin 400 µg/ml was used to inhibit contaminations with bacteria and, in some experiments, 2.5 mmol/l sodium azide was included in the medium to study the pro-oxidant activity of 0.5 mmol/l H₂O₂.

Erythrocyte osmotic fragility

Red blood cell osmotic fragility test is based on the measure of the resistance

of red blood cells to lyses as a function of decreasing NaCl concentration. After incubation with 0 or 100 mmol/l of fructose or 5 mmol/l of glucose at 37°C for 24 hours, erythrocytes were washed in isotonic saline 2 times and incubated for 30 minutes at 37°C in decreasing NaCl hypotonic concentrations (50, 25 and 0 mmol/l). After incubation, erythrocytes were centrifuged for 10 min at 1.500 x g and hemoglobin was determined in the supernatants using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

Biochemical assays

Hydrogen peroxide quantification

The assay of hydrogen peroxide (H₂O₂) is based on the oxidation of ferrous ions (Fe²⁺) to ferric ions (Fe³⁺) by hydrogen peroxide under acidic conditions, according to Jiang et al., (1990) [41]. The amount of H₂O₂ produced was measured at 560 nm, using H₂O₂ to build standard curves. Hydrogen peroxide was quantified by the difference between the quantities of peroxide found in an aliquot of a supernatant minus the quantity found in another aliquot of the same supernatant after incubation for 20 min in the presence of catalase (150 UI/ml).

Biochemical Analysis

Glycated hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) percent was determined using the glycoaffinity columns from Labtest commercial kit (Belo Horizonte, MG, Brazil). Plasmatic glucose, cholesterol, high density lipoprotein, triglyceride and creatinine were measured with commercial kits using enzymatic methods (Labtest, Minas Gerais, Brazil).

Thiobarbituric acid reactive species assay

Thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS) were determined according to Ohkawa et al. (1979) [42], with few modifications. Blood was precipitated with one volume of TCA (40%) and left on ice for 30 min before centrifugation. TBA-RS were quantified by adding 1000 μ l of the supernatant fractions to the color reaction medium. The amount of TBA-RS produced was measured at 532 nm, using MDA to construct standard curves.

SOD activity in erythrocytes

The SOD assay method is based on the capacity of the enzyme to inhibit the epinephrine autoxidation at alkaline pH, observed at 480 nm, according to Sun & Zigman (1978) [43].

Catalase activity

The catalase assay method was based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm, according to Sinha (1972) [44].

Determination of sulfhydryl status erythrocytes

Erythrocyte sulfhydryl groups were determined using Ellman's reagent, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) with few modifications. Blood was precipitated with 1 volume of 5% TCA. After centrifugation, the supernatant was neutralized with Tris-NaOH and non-protein sulfhydryl groups (NPSH) were quantified on these supernatant fractions. The sulfhydryl concentration was calculated against a standard curve of cysteine (45).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. The results were evaluated by ANOVA (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL). When the ANOVA was significant, differences between groups were determined using Duncan's Multiple Range test (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL). Pearson correlation coefficients were determined by linear regression analysis. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Biochemical Parameters from type II diabetics patients

Fasting blood glucose, glycated hemoglobin, cholesterol, high density lipoproteins, triglycerides and creatinine from type II DM patients and control subjects are summarized in **Table 1**. Fasting blood glucose levels of type II DM patients were higher than those of controls ($p < 0.01$) and the hyperglycaemia was higher in uncontrolled than in controlled diabetic patients. HbA1c was higher in uncontrolled diabetics than in controlled diabetics subjects (**Table 1**). The other parameters evaluated were similar among the three groups.

In vitro exposure to high concentrations of glucose increases erythrocyte TBA-RS, SOD and Catalase

Incubations of erythrocytes with increasing concentrations of glucose (10 up to 100 mmol/l) resulted in a significant concentration-dependent increase of erythrocytes TBA-RS content compared to control group (**Figure 1 A**). Inclusion of H_2O_2 (0.5 mmol/l) caused a significant increase in TBA-RS content and simultaneous exposure to increasing concentrations of glucose caused an additional increase in TBA-RS production. A statistically significant positive correlation was found between the glucose concentration and TBA-RS content [$r = 0.74$, $p < 0.0001$] (**Figure 1 B**).

The activity of SOD and catalase from erythrocytes increased as a function of glucose concentration and at 30-40 mmol/l glucose were about 60% and 40% higher than that of erythrocytes incubated in the presence of 5 mmol/l glucose ($p < 0.001$) (**Table 2**).

Glucose and fructose induce an increase in the level of erythrocytes NPSH in vitro

Non-protein SH groups (NPSH) from erythrocytes increased significantly as the concentration of glucose increased from 5 to 30 mmol/l (the increase in sulfhydryl groups was about 3-4 fold) ($p < 0.001$). Thereafter, NPSH tended to return to control levels. In the presence of 0.5 mmol/l of H_2O_2 , the increase in NPSH caused by glucose was reduced. However, the profile of NPSH increase was similar to that observed with glucose alone. Fructose caused a small increase in NPSH (about 40%), when compared to the effect of glucose. The increase in NPSH caused by fructose was significant from 30 to 100 mmol/l ($p < 0.01$), (**Figure 2**).

High concentrations of glucose increase in vitro H_2O_2 production by erythrocytes

No significant differences were found in hydrogen peroxide production between erythrocytes incubated with 5 mmol/l of glucose and erythrocytes incubated with 10 mmol/l of glucose. However, incubation of erythrocytes for 24 hours with 100 mmol/l of glucose resulted in a significant increase of about 3 times in H_2O_2 contents ($p < 0.001$) (**Figure 3**).

In vitro Fructose-induced hypotonic fragility is attenuated by the antioxidant Ebselen

Hypotonic concentrations of NaCl induced progressive lyses on the erythrocytes and previous incubation of erythrocytes for 24 hours with fructose (100 mmol/l) caused a significant increase in cell lyses when compared with erythrocytes

exposed to fructose 5 mmol/l ($p < 0.001$). Ebselen, a selenium-containing organic compound with antioxidant properties, partially suppressed fructose-induced hemolysis (**Figure 4**).

Erythrocytes from Uncontrolled Diabetic Patients are more sensitive to Osmotic Shock than Non-Diabetic Patients

Variation of osmotic pressure induced a more pronounced lyses on erythrocytes of the uncontrolled diabetic patients when compared to erythrocytes of the non-diabetic subjects ($p < 0.001$). Ebselen (5 $\mu\text{mol/l}$) decreased significantly the hemolysis of erythrocytes of diabetic patients incubated with 5 mmol/l of glucose (**Figure 5**).

Ebselen Inhibits Hemoglobin Glycation in vitro

The percentage of HbA1c was significantly higher for erythrocytes incubated for 48 hours with 100 mmol/l of glucose ($P < 0.001$) or fructose ($P < 0.001$) compared with those incubated with 5 mmol/l of glucose. Ebselen inhibited glycated hemoglobin formation induced by either 100 mmol/l of glucose or fructose (**Figure 6**).

The capability of ebselen to protect hemoglobin glycation was tested in erythrocytes incubated for 48 h with increasing glucose concentrations (up to 200 mmol/l). The percentage of HbA1c formed was dependent on glucose concentration and ebselen 5 $\mu\text{mol/l}$ was able to inhibit glycation up to 100 mmol/l of glucose ($P < 0.01$) (**Figure 7**).

DISCUSSION

Results of the present investigation clearly indicated that exposure to relatively high concentrations of glucose for a short time (1 or 2 days) caused a marked increase in erythrocyte oxidative stress as determined by TBA-RS and H₂O₂ levels. This short exposures protocol to glucose or fructose also caused an increase in the hemoglobin glycation and in the erythrocyte susceptibility to osmotic lysis. Since the erythrocyte vulnerability to osmotic shock is related to membrane properties (21, 26), it is reasonable to suppose that the increase in osmotic fragility is linked to the increase in lipoperoxidation caused by glucose and fructose. This is represented in the **Scheme 1**.

HEMOGLOBIN GLYCATION

HYPERGLYCAEMIA → ↑

PEROXIDE PRODUCTION → MEMBRANE PEROXIDATION

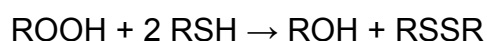
↓

INCREASED OSMOTIC FRAGILITY

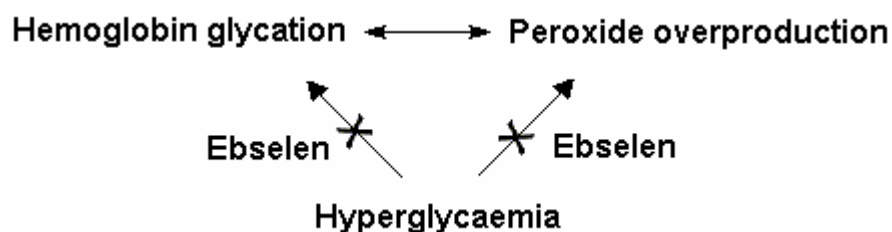
The incubation of erythrocytes with glucose also caused a significant increase in SOD and catalase activity, which may represent a compensatory response to the increase in peroxide formation caused by the hyperglycaemia in vitro. Although the effect of diabetes on the activity of antioxidant enzymes are quite contradictory in the literature (1-3, 6), our results clearly indicated that short term exposure to high concentrations of glucose can modulate the activity of two important anti-oxidant enzymes, which could in turn counteract the deleterious effects of hydroperoxide and other oxygen radicals, such as superoxide. In fact, literature data clearly indicate that exposure to high concentrations of glucose can result in the overproduction of superoxide (2, 3, 6, 11, 12). However, the increase in catalase activity was not

sufficient to counteract the increased hydrogen peroxide formation observed after incubation of erythrocytes with 100 mmol/l of glucose.

Ebselen is an organochalcogen with antioxidant properties (for review see 37 and 38) that mimics GPx. Thus, the protection afforded by ebselen in the presence of high concentrations of glucose or fructose can be attributed to its capacity of decomposing H_2O_2 and lipid peroxide in the presence of reducing thiols. Of particular importance, the erythrocytes in the presence of reducing sugars can produce reduced thiols, which in turn could be the substrate for ebselen in the generic reaction represent bellow:



Ebselen also reduced hemoglobin glycation and reduced the osmotic fragility of erythrocytes from uncontrolled diabetic patients and from normal subjects exposed to glucose or fructose in vitro. For the best of our knowledge, it is the first demonstration that ebselen can reduce the osmotic fragility of erythrocytes under pro-oxidant activity and inhibit hemoglobic glycation in vitro. The mechanism underling the protective effect of ebselen is certainly related to its antioxidant activity as a thiol peroxidase mimetic. The results of the present investigation raise also the possibility that ebselen could act directly by inhibiting hemoglobin glycation. These mechanisms are represented in Scheme 2.



Scheme 2 – Ebselen reduces the pro-oxidative effect of Hyperglycemia

In conclusion, the results of the present investigation demonstrated for the first time that ebselen act as protective agent against the erythrocyte toxicity caused by hyperglycemia. The mechanism of ebselen is attributable to its thiol peroxidase like activity and also to its ability to reduce the glycation of proteins. Of particular importance for the therapeutic use of ebselen in diseases associated with oxidative stress, recent studies have demonstrated that ebselen was partially successful as a neuroprotective agent against cerebral ischemia in humans (27, 30). Thus, it is possible that ebselen could also be considered as a potential drug for the treatment of diabetes. However, the chronic use of ebselen has not yet been accessed in humans and in experimental animals.

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

REFERENCES

1. Atalay M, Laaksonen DE (2002) Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *J Sports Sci & Med* 1: 1-14
2. Aydýn A, Orhan H, Sayala A, Ozata M, Sahim G, Isymer A (2001) Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemetic control. *Clin Biochem* 34: 65–70
3. Domínguez C, Rutz E, Gussinye M, Carrascosa A (1998) Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 21: 1736–1742
4. Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412
5. Baynes JW, Thorpe SR (1999) Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9
6. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J (2000) Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diab & Metab* 26: 163-176
7. Brownlee M, Cerami A (1981) The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med* 50: 385-432
8. Brownlee M (1984) Advanced protein glycation in diabetes and aging. *Annu. Rev Med* 46: 223-234
9. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813–820
10. Fu MX, Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW (1992) Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes* 41: 42–48
11. Hans HP, Du X, Edelstein D, et al. (2003) Benfotiamine blocks three major

- pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* 9 (Suppl. 3): 294-299
12. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP (1998) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. *Biochem J* 256: 205-212
 13. Hunt JV, Smith CC, Wolff SP (1990) Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 39: 1420-1424
 14. Schwartz JG (1995) The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Review* 3: 269-287
 15. Wolff SP, Dean RT (1987) Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 245: 243–250
 16. Jain SK, Lim G (2001) Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ / K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Rad Biol & Med* 30: 232-237
 17. Hayoz D, Ziegler T, Brunner HR, Ruiz J (1998) Diabetes mellitus and vascular lesions. *Metabolism* 47: 16-19
 18. Jain SK, Vie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T (1996) Effect of modest vitamin E supplementation on blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 15: 458-461
 19. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, et al. (1999) Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 48: 2398-2406
 20. Paolisso G, d'Amore A, Galzerano D (1993) Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 16: 1433-1437

21. Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL, Armstrong D (1996) Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia III. Effects of antioxidants. *Diabetes* 45 (Suppl. 9): 1233-1237
22. Kondo H, Takahashi M, Niki E (1997) Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Letters* 413: 236-238
23. Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Montedoro G, Zappia V (1999) Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem* 10: 159-165
24. Tiano L, Fedeli D, Santroni AM, Villarini M, Engman L, Falcioni G (2000) Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. *Mutat Res* 464: 269-277
25. Tesoriere L, D'Arpa D, Conti S, Giaccone V, Pintaudi AM, Livrea MA (1999) Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insights into the radical-scavenging activity. *J Pineal Res* 27: 95-105
26. Brzezinska SE (2001) Erythrocyte osmotic fragility test as the measure of defence against free radicals in rabbits of different age. *Acta Vet Hung* 49: 413-419
27. Saito I, Asano T, Takakura K (1998) Neuroprotective effect of antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg.* 42 (Suppl. 2): 269-277
28. Arteel GE, Sies H (2001) The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ Toxicol Phar* 10 (Suppl. 4): 153-158
29. Sies H (1997) Ebselen as a glutathione peroxidase mimic and as scavenger of peroxynitrite. *Adv Pharmacol* 38: 229-246
30. Yamaguchi T, Sano K, Takakura K (1998) Ebselen in acute ischemic stroke. *Am Heart Ass* 29: 12-17

31. Zhao R, Masayasu H, Holmgren A (2002) Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc Natl Acad Sci* 99 (Suppl. 13): 8579-8584
32. Klotz LO, Sies H (2003) Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol Lett.* 140 (Suppl. 141): 125-132
33. Porciuncula LO, Rocha JBT, Boeck CR, Vendite D, Souza DO (2001) Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosc Lett* 299 (Suppl. 3): 217-220
34. Porciúncula LO, Rocha JBT, Cimarosti H, et al. (2003) Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosc Lett* 346: 101-104
35. Burger ME, Alves A, Callegari L, et al. (2003) Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Prog. Neuro-Psycopharmac. and Biol Psychiat* 27: 135-140
36. Farina M, Frizzo ME, Soares FA, et al. (2003) Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol Lett* 144 (Suppl. 3): 351-357
37. Mugesh G, du Mont WW, Sies H (2001) Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev* 101: 2125-2179
38. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104, in press
39. Bourdon E, Loreau N, Blache D (1999) Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 13: 233-244
40. Folmer V, Soares JCM, Rocha JBT (2002) Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *Int J Biochem & Cell Biol* 34: 1279–1285

41. Jiang ZY, Alisson CS, Wolff SP (1990) Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *Febs* 268: 69-71
42. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358
43. Sun M & Zigman S (1978) An Improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem* 90: 81-89
44. Sinha KA (1972) Colorimetric assay of catalase. *Anal Biochem* 47: 389-394
45. Ellman GL (1959) Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77

TABLE 1

Fasting blood glucose levels, glycated hemoglobin, cholesterol, high density lipoprotein, triglyceride and creatinine plasmatic of control group, controlled type II DM patients and uncontrolled type II DM patients. Values are expressed as Mean \pm SEM.

	Control Group	Type II DM (n)	
		Controlled	Uncontrolled
Glucose (mg/dL)	89 \pm 14 a	116 \pm 7.9 b	204 \pm 22 c
HbA1c (%)	< 7.0	7.1 \pm 0.74	10.82 \pm 2 *
Cholesterol (mg/dl)	208 \pm 44	198 \pm 19	218 \pm 48
HDL (mg/dl)	47 \pm 13	40.7 \pm 8.4	55 \pm 6.8
Triglycerides	128 \pm 70	153 \pm 25	171 \pm 79
Creatinine (mg/dl)	0.97 \pm 0.31	0.92 \pm 0.20	0.90 \pm 0.34

(* , b, c denote $p < 0.001$)

TABLE 2

SOD and Catalase activities in erythrocytes incubated for 24hs with glucose 5 mmol/l up to 100 mmol/l. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group.

GLICOSE (mg/dl)	SUPERÓXIDE DISMUTASE UI / mg Hb	CATALASE UI / mg Hb
5	0.32 \pm 0.02	36.60 \pm 1.80
10	0.36 \pm 0.02	44.78 \pm 4.80
20	0.42 \pm 0.01 *	43.40 \pm 5.20
30	0.45 \pm 0.02 *	51.37 \pm 1.60 *
40	0.48 \pm 0.01 *	52.15 \pm 4.00 *
100	0.45 \pm 0.01 *	53.11 \pm 2.50 *

(* $p < 0.001$)

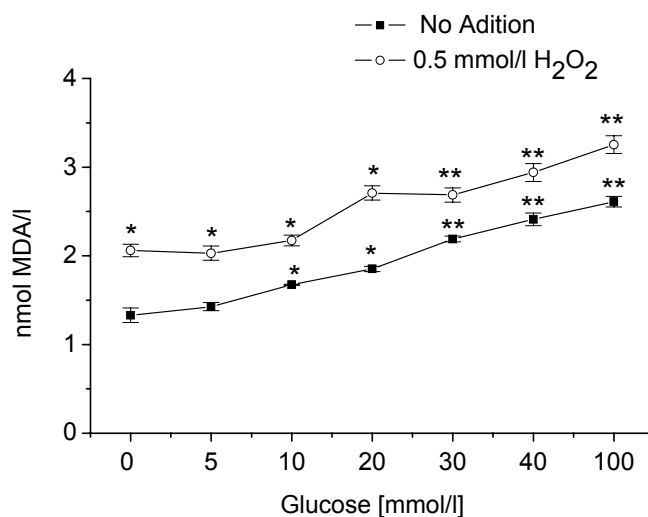


Figure 1A. TBA-RS content in erythrocytes from normals subjects incubated for 24h with different glucose concentrations in the absence or presence of 0.5 mmol/l H₂O₂ plus 2.5 mmol/l sodium azide. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group (* p<0.004; ** p<0.001).

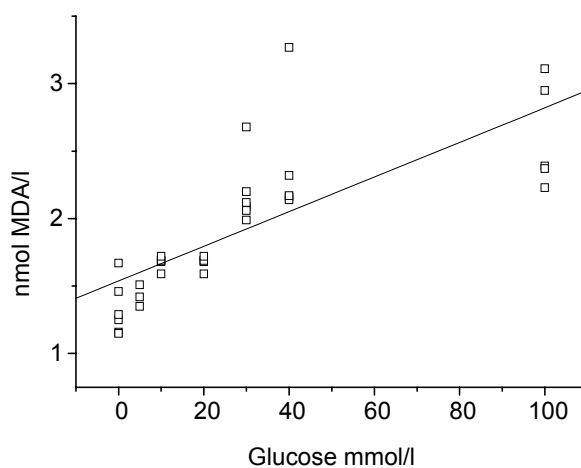


Figure 1B. Correlation between TBA-RS content and glucose concentrations in erythrocytes from normals subjects incubated for 24h with different glucose concentrations in the absence or presence of 0.5 mmol/l H₂O₂ plus 2.5 mmol/l sodium azide. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group (r = 0.74).

$p < 0.0001$).

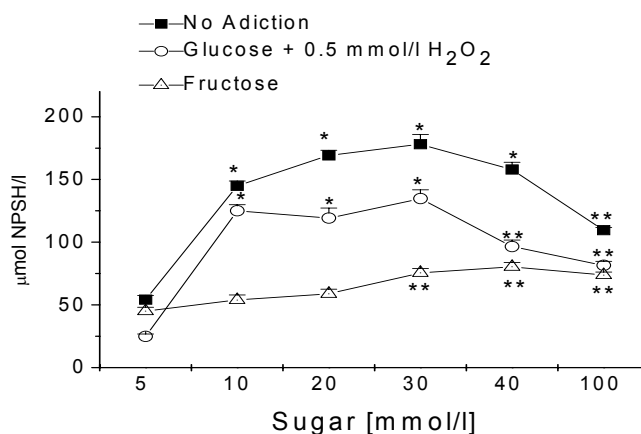


Figure 2. Non-protein thiol groups (NPSH) from erythrocytes from normal subjects incubated for 24h with different concentrations of glucose (in absence or presence of 0.5 mmol/l H₂O₂) or fructose. Sodium azide (2.5 mmol/l) was included in the Incubation medium containing 0.5 mmol/l H₂O₂ in order to inhibit catalase. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group (* $p < 0.001$; ** $p < 0.01$).

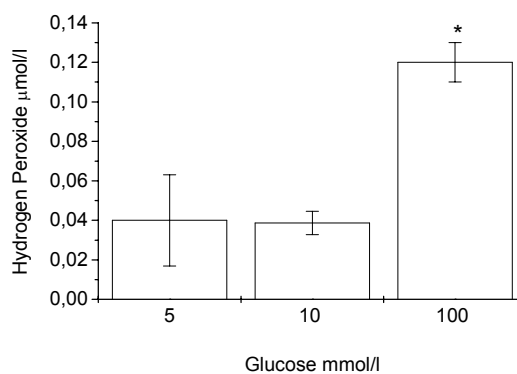


Figure 3. Hydrogen peroxide content in erythrocytes from normal subjects incubated for 24h with 5, 10 or 100 mmol/l of glucose. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group (* $p < 0.001$).

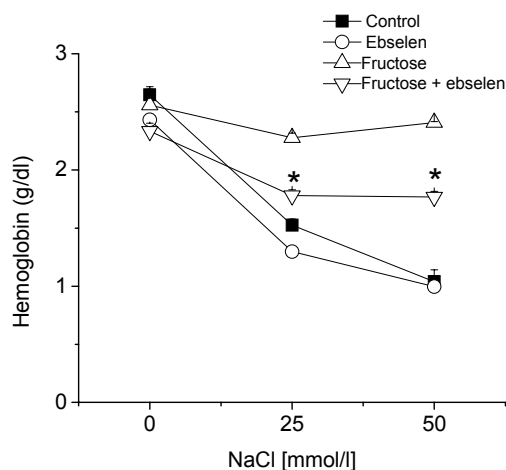


Figure 4. Osmotic fragility test show hemoglobin levels in supernatant of erythrocytes incubated for 24h with fructose 5 mmol/l (control) and 100 mmol/l, with or without 5 μ mol/l of ebselen, submitted at decreasing NaCl concentration hypotonic for 30 min at 37°C. Data are expressed as mean \pm SEM for 5 samples per group (* p <0.001).

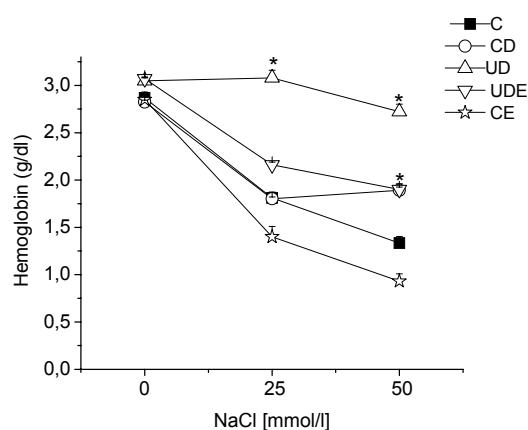


Figure 5. Osmotic fragility test show hemoglobin levels in supernatant of erythrocytes of Control group (C), Control plus of Ebselen 5 μ M (CE), Controlled Diabetic (CD), Uncontrolled Diabetic (UD) and Uncontrolled Diabetic plus Ebselen 5 μ M (UDE) incubated for 24h with glucose 5 mmol/l, submitted at decreasing NaCl concentration hypotonic for 30 min at 37°C. Data are expressed as mean \pm SEM for 10 samples per group (* p <0.001).

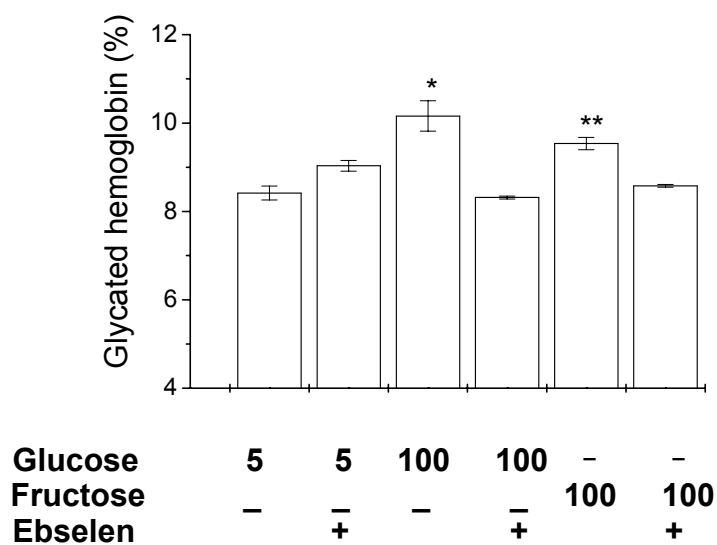


Figure 6. Glycated hemoglobin (GHbA1c) levels in erythrocytes incubated for 48h with different glucose or fructose concentrations, with or without 5 μ M of ebselen. Data are expressed as mean \pm SEM for 5- 7 samples per group (*, $P < 0.0001$) (**, $P < 0.01$).

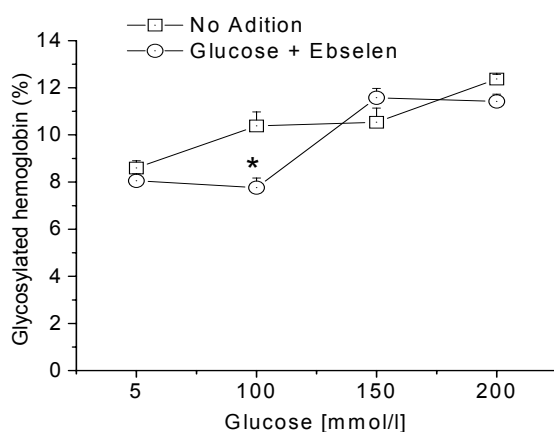


Figure 7. Glycated hemoglobin (GHbA1c) levels in erythrocytes incubated for 48h with crescents glucose concentrations, with or without 5 μ M of ebselen. Data are expressed

as mean \pm SEM for 5-7 samples per group (*, $P < 0.01$).

4.2 ARTIGO – 2 EFFECT OF HIGH CONCENTRATION OF REDUCING MONOSACCHARIDE ON IN VITRO Δ -AMINOLEVULINATE DEHYDRATASE ACTIVITY OF HUMAN ERYTHROCYTE

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

Soares, JCM; Gabriel, D, Folmer, V; Augusti, GR; Rocha, JBT*

*** JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA**

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

Phone: 021-55 220-8140; FAX: 021-55-220-8031

E-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of high glucose concentrations on essential heme enzyme δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) and also evaluate a potential protective effects of ebselen on the activity of this enzyme. Erythrocytes incubated with increasing concentrations of glucose (10 up to 40mmol/l) for 24hs caused a significant increase of δ -ALA-D activity ($p<0,001$). In the presence of higher glucose concentration (100 mmol/l), the δ -ALA-D activity return to control level and decreased at 200 mmol/l of glucose. TBARS levels was significantly increased in glucose concentration-dependent manner when compared with erythrocytes of control group (incubated with glucose 5mmol/l) ($p<0,004$). Non-protein SH groups (NPSH) also increased significantly when the concentration of glucose increased up to 30 mmol/l ($p<0,001$) and tend to return to control value when erythrocytes was incubated with glucose 100 mmol/l. Addition of DTT in the assay mixture reverted the inhibition of the δ -ALA-D caused by incubation of the erythrocytes for 48h with glucose 200 mmol/l. Results of the present study indicate that high levels of glucose cause inhibitions of the sulfhydryl-containing enzyme δ -ALA-D probably via oxidation of SH groups. Thus, δ -ALA-D activity alterations found in this work stated this enzyme as a potential target for screening the physiologic or pathologic protein oxidations caused by hyperglycemia.

Keywords: δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) – Ebselen – Sugar reducing – Oxidative stress

INTRODUCTION

Diabetic state has been shown to be associated with an increased oxidative stress, and the persistence of hyperglycemia has been reported to cause increased production of oxygen free radicals [1-17]. Pro-oxidative state can produce permanent chemical alterations in proteins and increase lipid peroxidation in a variety of experimental models of hyperglycemia [17, 18].

In vitro exposure of macromolecules to glucose concentrations representative of hyperglycemia is widely considered a relevant model for the functional degenerations occurring in diabetes mellitus [13]. Furthermore, the deleterious effects of hyperglycemia on the properties of physiologically abundant proteins such as hemoglobin, albumin, and collagen have been investigated [16]. Nonenzymatic glycation is the first of a series of reactions caused for hyperglycemia and this process can promote *in vivo* and *in vitro* cross-linking of proteins [6]. It is known that protein cross-linking may either alter protein functions or change their susceptibility to enzymatic degradation [19].

δ -Aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) is an essential enzyme for all aerobic organisms because participates in the biosynthesis pathway of tetrapyrrole molecules, which constitute prosthetic groups of physiologically significant proteins such as hemoglobin and cytochromes [20; 21]. This enzyme is one good marker for oxidative stress because its sulfhydryl nature renders the enzyme highly sensitive to the presence of pro-oxidant elements which oxidize its essential sulfhydryl groups [8-10, 22-25]. Of particular importance, the heme synthetic pathway is impaired in porphyria and a frequent coexistence of diabetes mellitus and porphyria disease has been reported in humans and experimental animal models [26, 27], which can be casually linked to inhibition of this enzyme found in diabetics [28, 29].

The aim of this study was to investigate the effect of in vitro glucose incubation on δ -ALA-D activity and whether the activity of enzyme could be correlated with TBARS production and non-protein -SH content from human erythrocytes.

MATERIAL AND METHODS

Compounds

5-aminolevulinic acid, DL-dithiothreitol, and malondialdehyde (MDA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO., USA). Mono- and dibasic potassium phosphate, acetic acid, ortho-phosphoric acid, tris buffer (tris[hydroxymethyl]aminomethane), glucose, hydrogen chloride, trichloroacetic acid and sodium chloride were obtained from Merck (Rio de Janeiro, Brazil).

Blood sample collection

Blood samples from 20 healthy donors (10 ml each) were drawn in the fasting state and processed within 1h of collection, blood samples were transferred to polypropylene tubes sterile containing herparin. For experiments in vitro the samples were centrifuged for 10 min at 1,500g and erythrocytes were washed three times with NaCl 0.9% (wt/vol).

Tubes containing 1,5 ml of cell suspension from healthy donors were incubated with different glucose or fructose concentrations at 37 degree for 24 or 48 hours. The composition of erythrocytes suspension was as follows (in mmol/l): sodium chloride 150, glucose 5, 10, 20, 30, 40 and 100; Tris HCl 10, pH 7,4; Gentamicin 400 μ g was used to inhibit contaminations with bacteria.

Biochemical assays

δ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa et al., (1982) [30], by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation. Except that 84 mmol/l potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.4 mmol/l ALA were used. The reaction was started 10 min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. Incubations were carried out for 1 h at 37°C. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt. The reaction rates were linear with respect to time of incubation and added protein for all experimental conditions.

Thiobarbituric acid reactive species assay

Thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS) were determined according to Ohkawa et al. (1979) [31], with few modifications. Blood was precipitated with one volume of TCA (40%) and left on ice for 30 min before centrifugation. TBARS were quantified by adding 1000 μl of the supernatant fractions to the color reaction medium. The amount of TBA-RS produced was measured at 532 nm, using MDA to construct standard curves.

Determination of erythrocytes sulfhydryl status

Erythrocyte non-protein sulfhydryl groups were determined using Ellman's reagent, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoate) with few modifications. Blood was precipitated with 1 volume of 5% TCA. After centrifugation, the supernatant was neutralized with Tris-NaOH and non-protein sulfhydryl groups (NPSH) were quantified on these supernatant fractions. The sulfhydryl concentration was calculated against a standard curve of cysteine [32].

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. The results were evaluated by ANOVA (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL). When the ANOVA was significant, differences between groups were determined using Duncan's Multiple Range test (SPSS for Windows 8.0, SPSS 1998, Chicago, IL). Pearson correlation coefficients were determined by linear regression analysis. Differences between groups were considered to be significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Incubations of erythrocytes with increasing concentrations of glucose (10 up to 40 mmol/l) for 24h resulted in a significant increase of δ -ALA-D activity ($p < 0,001$; **Figure 1**). In presence of glucose 100 mmol/l, the δ -ALA-D activity return to control level. **Figure 2**

Incubations of erythrocytes with 100 to 200 mmol/l glucose for 48h resulted in a significant decrease of δ -ALA-D activity when compared with erythrocytes of control group (incubated with glucose 5 mmol/l) ($p < 0,001$). Involvement of cysteinyl groups in δ -ALA-D inhibition caused by 48 h exposure to glucose was examined by testing the possible restoration effect of dithiothreitol on this enzyme. Addition of DTT (2 mmol/l) in the assay mixture increased δ -ALA-D activity about 120%, but the activity did not return to the control level.

Non-protein SH groups (NPSH) from erythrocytes significantly increased as the concentration of glucose increased from 5 to 30 mmol/l. Thereafter, NPSH tended to return to control levels (**Figure 3**). A statistically significant positive correlation was found between δ -ALA-D Activity and NPSH groups from erythrocytes incubated 24h with different glucose concentrations. ($r = 0.65$, $p < 0.0001$) **Figure 4**

Incubations of erythrocytes 24h and 48h with increasing concentrations of glucose (100 up to 200 mmol/l) resulted in a significant concentration-dependent increase of erythrocytes TBA-RS content compared with control group (**Figure 5 and 6** respectively).

DISCUSSION

Glycation of protein play a significant role in protein aging [7, 13, 33] and this reaction starts with the reversible formation of a Schiff base between glucose and protein amino groups. Other characteristic of the hyperglycemia is that can produce an increased production of oxygen free and this also contribute with permanent chemical alterations in proteins. In the present study, we showed that the exposure to high concentrations of glucose up to 40 mmol/l for 24h caused a significant increase in δ -ALA-D activity of erythrocytes probably by an indirect mechanism via production of low-molecular -SH containing molecules (possibly glutathione) derived from the metabolism of glucose via pentose pathway. In fact, we found a positive correlation between δ -ALA-D activity and NPSH groups in erythrocytes incubated for 24 h with glucose. The protecting effect of glucose decreased when the blood was incubated with 100 mmol/l of glucose. The decrease in NPSH can be due to the fact that elevated extra and intracellular glucose concentrations stimulate the polyol pathway, which depletes the intracellular NADPH levels [5, 34, 35]. In addition, the decrease can be also a consequence of elevated production of free radicals, that was confirmed by an increase in erythrocyte TBARS. The formed radicals could interact either directly or indirectly with thiols, oxidizing them to disulfides [36-40].

The molecular mechanism underlying δ -ALA -D impairment in diabetes is still not completely understood, but may be caused either by glycation of the active site lysine residue involved in Schiff's base formation with the first δ -ALA molecule or oxidation of essential reduced cysteinyl residues of the enzyme [8, 10, 19]. Over production of free radicals could be also contributing to the formation of adducts between the aldehyde group of glucose and the amino group of lysine in δ -ALA-D.

The oxidation of cysteinyl groups in δ -ALA-D inhibition caused by high glucose

concentration was verified by testing the effect of dithiothreitol (DTT). DTT additions reduced the δ -ALA-D inhibition induced by high glucose exposure. However, the restoration of enzyme activity was not complete. This may indicate that glucose inhibit the enzyme activity by two distinct mechanisms: 1) one involving the oxidation of cysteinyl residues and 2) the other involving a formation of an intermediate between glucose and the lysil residue at the active site of the enzyme. Probably the oxidation of cysteinyl residues was mediated by glucose autoxidation and free radical production.

δ -ALA-D activity and oxidative stress have been focused in this work, in an attempt to better understand the mechanisms for the pathogenesis of some of the diabetes complications. In general, the pro-oxidizing shift of δ -ALA-D associated with hyperglycemia observed in erythrocytes incubated with high glucose concentrations can be interpreted to reflect a widening of the imbalance between antioxidants and pro-oxidants, as observed from elevated TBARS levels. We argue that δ -ALA-D activity alterations found in this work stated this enzyme as a potential target for screening the physiologic or pathologic protein oxidations caused by hyperglycemia.

REFERENCES

1. Allen, D.A., S. Harwood, M. Varagunam, M.J. Raftery and M.M Yaqoob, 2003. High Glucose-Induced Oxidative Stress Causes Apoptosis in Proximal Tubular Epithelial Cells and is Mediated by Multiple Caspases. *Faseb J.*, 17: 908-911.
2. Ansari, N.H., L. Wang, A.A. Erwin and D.F Church, 1996. Glucose-Dependent Formation of Free Radical Species in Lens Homogenate. *Biochem. Mol. Med.*, 59: 68-71.
3. Aydýn, A., H. Orhan, A. Sayala, M. Ozata, G. Sahim and A. Isymer, 2001. Oxidative Stress and Nitric Oxide Related Parameters in Type II Diabetes Mellitus: Effects of Glycemic Control. *Clin. Biochem.*, 34: 65–70.
4. Baynes, J.W and S.R. Thorpe, 1999. Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications: A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*, 48:1-9.
5. Bonnefont-Rousselot, D., J.P. Bastard, M.B. Jaudon and J. Delattre, 2000. Consequences of the Diabetic Status on the Oxidant/Antioxidant Balance. *Diabetes Metabol.*, 26: 163-176.
6. Brownlee, M., A. Cerami and H. Vlassara, 1998. Advanced Glycosylation End Products in Tissue and the Biochemical Basis of Diabetic Complications. *N. Engl. Med.* 318: 1315-1321.
7. Day, J., S. Thorpe and J. Baynes, 1979. Nonenzymatically Glucosylated Albumin: *In Vitro* Preparation and Isolation From Normal Human Serum. *J. Biol. Chem.*, 254:394-400.
8. Folmer, V., J.C.M. Soares and J.B.T. Rocha, 2002. Oxidative Stress in Mice is Dependent on the Free Glucose Content of the Diet. *The Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, 34: 1279–1285.
9. Folmer, V., F.W. Santos, L. Savegnago, V.B. Brito, C.W. Nogueira and J.B.T.

- Rocha, 2004. High Sucrose Consumption Potentiates the Sub-Acute Cadmium Effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on Delta-Aminolevulinate Dehydratase in Mice. *Toxicol. Letters*, 153 (3): 333-341.
10. Folmer, V., J.C.M. Soares, D. Gabriel and J.B.T. Rocha, 2003. High-Fat Diet Causes δ -Aminolevulinate Dehydratase Inhibition and Hemoglobin Glycation Related to Lipid Peroxidation in Mice. *J. Nut.*, 133: 2165-2170.
 11. Fu, M.X, K.J. Knecht, S.R. Thorpe and J.W. Baynes, 1992. Role of Oxygen in Crosslinking and Chemical Modification of Collagen by Glucose. *Diabetes*, 41: 42–48.
 12. Hans, H.P, X. Du, D. Edelstein, T. Taguchi, T. Matsumura, Q. Ju, J. Lin, A. Bierhaus, P. Nawroth, D. Hannak, M. Neumaier, R. Bergfeld, I. Giardino and M. Brownlee, 2003. Benfotiamine Blocks Three Major Pathways of Hyperglycemic Damage and Prevents Experimental Diabetic Retinopathy. *Nat. Med.*, 9: 294-299.
 13. Hunt, J.V, R.T. Dean and S.P. Wolff, 1998. Hydroxyl Radical Production and Autoxidative Glycosylation. *Biochem. J.*, 256: 205-212.
 14. Nakamura, Y, Q. Feng, T. Kumagai, K. Torikai, H. Ohigashi, T. Osawa, N. Noguchi, E. Niki and K. Uchida, 2002. Ebselen, A Glutathione Peroxidase Mimetic Seleno-Organic Compound, As A Multifunctional Antioxidant. *The J. Biol. Chem.*, 277: 2687-2694.
 15. Sensi, M., F. Pricci, G. Pugliese, M.G. De Rossi, A.F.G. Petrucci, A. Cristina, S. Morano, G. Pozzessere, E. Valle, D. Andreani and D. Di Mario, 1995. Role of Advanced Glycation End Products (AGE) in Late Diabetic Complications. *Diabetes. Res. Clin. Pr.*, 28: 9-17.
 16. Schwartz, J.G., 1995. The Role of Glycohemoglobin and Other Proteins in Diabetes Management. *Diabetes Rev.*, 3: 269-287.
 17. Wolff, S.P and R.T. Dean, 1987. Glucose Autoxidation and Protein Modification.

- The potential Role of 'Autoxidative Glycosylation' in Diabetes. *Biochem. J.*, 245: 243–250.
18. Jain, S.K. and G. Lim, 2001. Pyridoxine and Pyridoxamine Inhibits Superoxide Radicals and Prevents Lipid Peroxidation, Protein Glycosylation, and (Na⁺ / K⁺)-ATPase Activity Reduction in High Glucose-Treated Human Erythrocytes. *Free Rad. Biol. & Med.*, 30: 232-237.
 19. Caballero, F.A., E.N. Gerez, C.F. Polo, E.S Vasquez and A.M.C Batlle, 1998. Reducing Sugar Trigger δ -Aminolevulinate Dehydratase Inactivation: Evidence in Vitro Aspirin Prevention. *Gen. Pharmacol.*, 31: 441-445.
 20. Jaffe, E.K., S. Ali, L.W. Mitchell, K.M Taylor, M. Volin and G.D. Markham, 1995. Characterization of the Role of the Stimulatory Magnesium of *Escherichia Coli* Porphobilinogen Synthase. *Biochem.*, 34: 244-251.
 21. Sassa, S., 1998. ALAD Porphyria. *Seminars in Liver Disease*, 18: 95-101.
 22. Folmer, V., R.C. Bolzan, M. Farina, G. Zeni, C.W. Nogueira, T. Emanuelli and J.B.T. Rocha, 2005. Mechanism of Delta-Aminolevulinate Dehydratase Inhibition by Phenyl Selenoacetylene Involves its Conversion to Diphenyl Diselenide. *Toxicol.*, 206 (3): 403-411.
 23. Soares, J.C.M., V. Folmer and J.B.T. Rocha, 2002. Influence of Dietary Selenium Supplementation and Exercise on Thiol-Containing Enzymes In Mice. *Nutrition* 19: 627-632.
 24. Nogueira, C.W., G. Zeni and J.B.T. Rocha, 2004. Organoselenium and Organotellurium Compounds: Toxicology And Pharmacology. *Chem. Rev.*, 104 (12): 6255-6285.
 25. Rocha, J.B.T., S.M. Tuerlinckx, M.R.C. Schetinger and V. Folmer, 2004. Effect of Group 13 Metals on Porphobilinogen Synthase In Vitro. *Toxicol. Appl Pharmacol.*, 200 (3): 169-176.

26. Bitar, M. and M. Weiner, 1984. Diabetes-Induced Metabolic Alterations in Heme Synthesis and Degradation and Various Heme-Containing Enzymes in Female Rats. *Diabetes*. 33: 37-44.
27. Scassa, M.E., C.L. Varone, L. Montero and E.T. Cánepa, 1998. Insulin Inhibits δ -Aminolevulinic Synthase Gene Expression in Rat Hepatocytes and Human Hepatoma Cells. *Exp. Cell. Res.*, 244: 460-469.
28. Caballero, F., E. Gerez, C. Polo, O. Mompo, E. Vazquez, R. Schultz, J. Bernabé and A. Batlle, 1995. Alteraciones en el Camino Metabolico del Hemo en Pacientes Diabeticos. *Medicina*, 55 (b): 117-124.
29. Fernández-Cuartero, B., J.L. Rebollar, A. Batlle and R.E. Salamanca, 1999. Delta Aminolevulinic Dehydratase (ALA-D) Activity in Human and Experimental Diabetes Mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31: 479-488.
30. Sassa, S., 1982. Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Assay. *Enzyme* 28:133-145.
31. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi, 1979. Assay For Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-358.
32. Ellman, G.L., 1959. Tissue Sulphydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
33. Carubelli R., j. Schineider, Q. Pye and R. Floyd, 1994. Citotoxic Effects of Autoxidative Glycation. *Free Radic Biol Mol.*, 18: 265-269.
34. Nakamura, J., N. Koh, F.S. Sakakibara and Y. Hamada, 1995. Polyol Patway , 2,3 Diphosphoglycerate in Erythrocytes and Diabetic Neuropathy in Rats. *Eur. J. Pharm.*, 294: 207 – 214.

35. Jozwik, M., M. Jozwik, M. Jozwik, M. Szczypka, J. Gajewska and J. Laskowska-Klita, 1997. Antioxidant Defence of Red Blood Cells and Plasma in Stored Human Blood. *Clin Chim Acta*, 267: 129–142.
36. Misra, H.P. Generation of Superoxide Free Radical during the Autoxidation of Thiols. *The J. Biol. Chem.* 249 (7): 2151-2155.
37. Radi, R., J.S. Bechman, K.M. Bush and B.A. Freeman, 1991. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryl. *J Biol Chem.*, 266 (7): 4244-4250.
38. BOURDON, E., N. LOREAU and D. BLACHE, 1999. Glucose and Free Radicals Impair the Antioxidant Properties of Serum Albumin. *FASEB J.*, 13: 233-244.
39. Dean, R.T., S. Fu, R. Stocker And M.J. Davies, 1997. Biochemistry and Pathology of Radical-Mediated Protein Oxidation. *Biochem. J.*, 324: 1-18.
40. Carty, J.L., R. Bevan, H. Waller, N. Mistry, M. Cooke, J. Lunec and H.R. Griffiths, 2000. The Effects of Vitamin C Supplementation on Protein Oxidation in Healthy Volunteers. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 273: 729–735.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. δ -ALA-D activity in erythrocytes incubated for 24 h with glucose (5 to 100 mmol/l). Erythrocytes were incubated at 37°C. Results are expressed as means \pm SEM for six sample per group ($P < 0.001$).

Figure 2. δ -ALA-D activity in erythrocytes incubated for 48 h with glucose (5 to 200 mmol/l). After the pre-incubation of 48 h δ -ALA-D from erythrocytes was determined either in the absence or the presence of 2 mmol/l DTT. Erythrocytes were incubated at 37°C. Results are expressed as means \pm SEM for ten samples per group (*** $P < 0.001$; ** $P < 0.001$**).

Figure 3. Non-protein thiol groups (NPSH) from erythrocytes incubated for 24 h at 37°C with different concentrations of glucose. Data are expressed as mean \pm SEM for 6 samples per group. (* $p < 0.001$; ** $p < 0.01$).

Figure 4 Correlation between δ -ALA-D Activity and NPSH from erythrocytes incubated for 24h with different glucose concentrations. Data are expressed as mean for 6 samples per glucose concentration ($r = 0.65$, $p < 0.0001$)

Figure 5. TBARS content in erythrocytes incubated for 24h at 37°C with glucose in the concentrations of 5 mmol/l up to 200 mmol/l. Data are expressed as mean \pm SEM for 8 samples per group (* $p < 0.001$).

Figure 6. TBARS content in erythrocytes incubated for 48h at 37°C with glucose in the concentrations of 5 mmol/l up to 200 mmol/l. Data are expressed as mean \pm SEM for 8 samples per group (* $p < 0.001$).

FIGURES

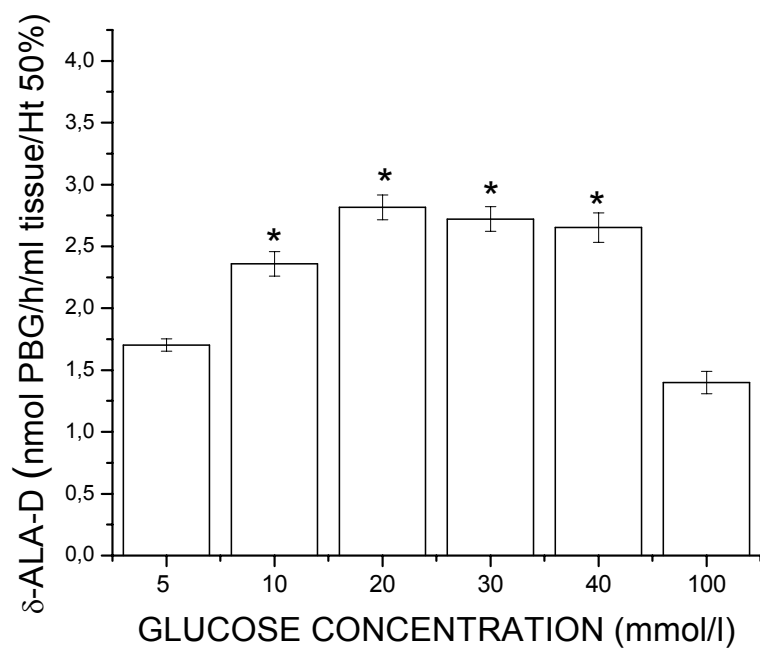


Figure 1, Soares et al.

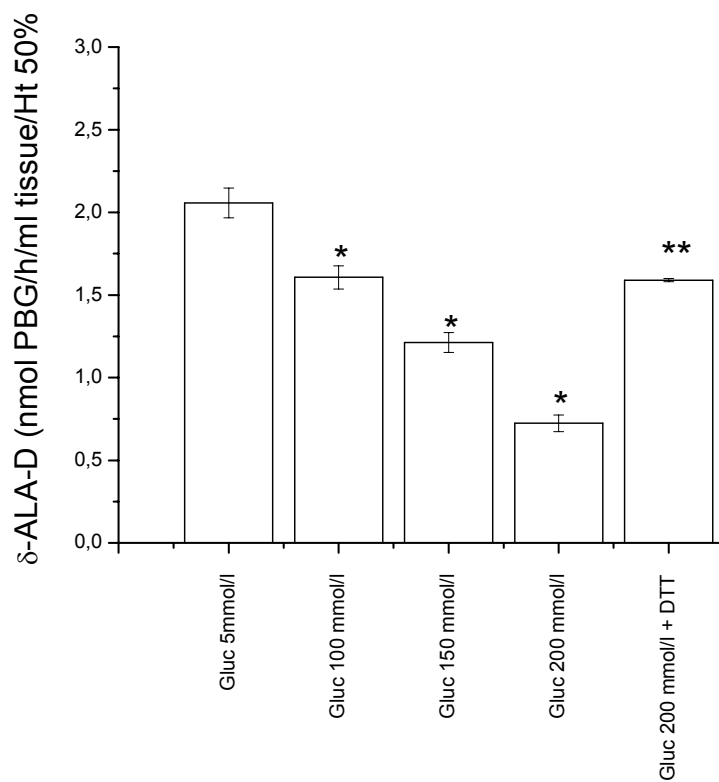


Figure 2, Soares et al

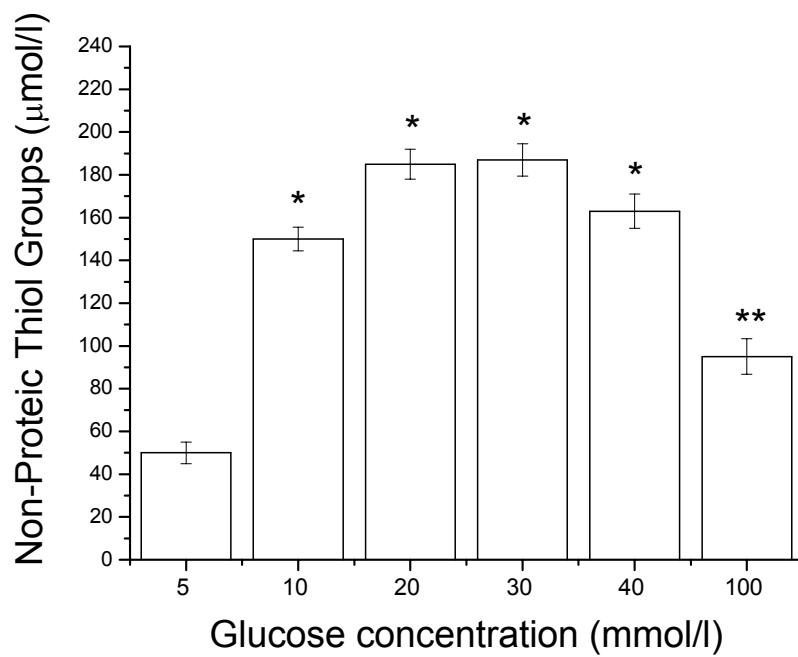


Figure 3, Soares et al.

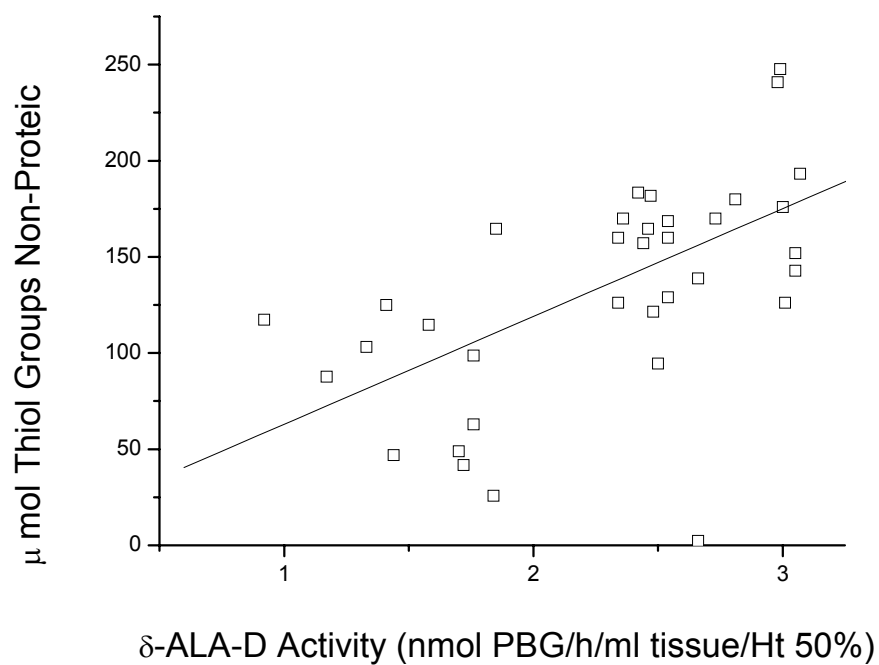


Figure 4, Soares et al.

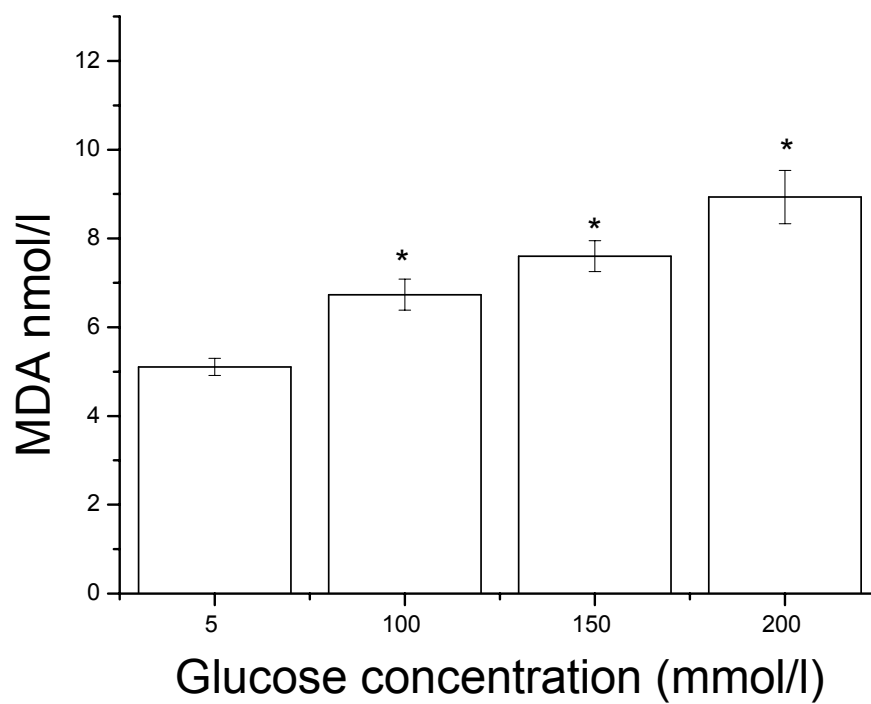


Figure 5, Soares et al.

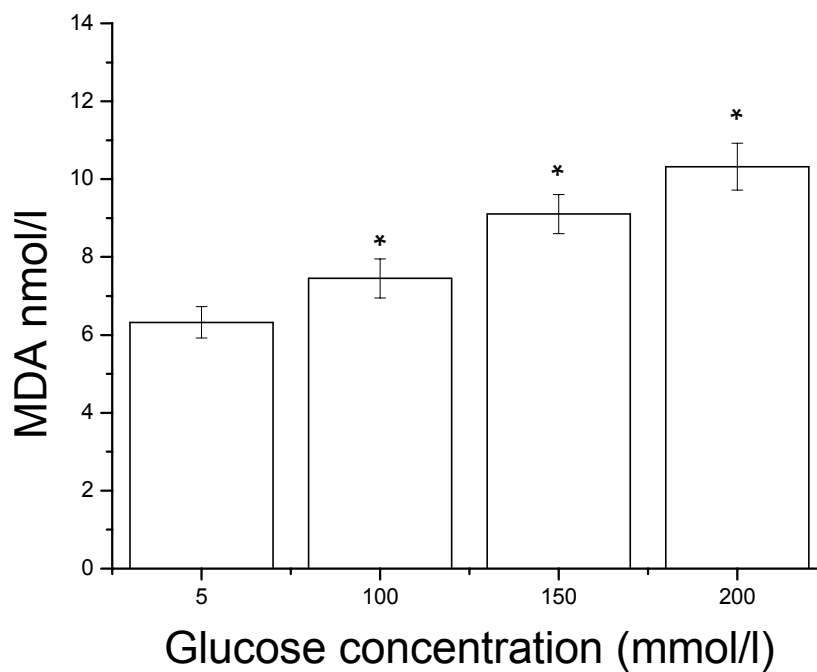


Figure 6, Soares et al.

**4.3 ARTIGO – 3 INFLUENCE OF DIETARY SELENIUM SUPPLEMENTATION
AND EXERCISE ON THIOL CONTAINING ENZYMES IN MICE**

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

Soares, JCM; Folmer, V; Rocha, JBT*

*** JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA**

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

Phone: 021-55 220-8140; FAX: 021-55-220-8031

E-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

4.4 ARTIGO – 4 EXERCISE TRAINING REVERSES THE DELETERIOUS EFFECT OF SUCROSE INTAKE ON INSULIN RESISTANCE AND VISCERAL FAT MASS DEPOSITION IN MICE

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

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

*CORRESPONDING AUTHOR:

JOÃO BATISTA TEIXEIRA DA ROCHA

Phone: 021-55 220-8140

FAX: 021-55-220-8031

e-mail: jbtrocha@yahoo.com.br

ABSTRACT

Abnormal fat deposition has been identified as an important mechanism of obesity-associated with insulin resistance. Literature data also indicate that exercise can improve insulin action. The heme pathway enzyme δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) is a good marker for oxidative stress and this sulfhydryl enzyme is inhibited in diabetes, an oxidative pathology. The aim of this study was to evaluate the effects of physical exercise on glucose plasmatic levels, insulin resistance, profile of oxidative status and influence on δ -ALA-D activity of mice fed high levels sucrose (20% in drinking water). Glucose ($P < 0.003$) and insulin ($P < 0.01$) plasma levels, as well as abdominal fat index ($P < 0.001$) were significantly higher in mice fed high levels of sucrose in the water when compared to control group. There was no difference in these parameters between exercised mice fed high sucrose and control group. Liver, kidney and brain δ -ALA-D activity and TBARS in high sucrose-fed mice with and without exercise were not different than there of control group. Results of the present study possibly indicate that sucrose administration in water caused marked insulin resistance and that physical exercise was efficient to increase insulin sensitivity in mice with insulin resistance and also to prevent the abdominal fat index increase induced by high ingestion of sucrose.

Keywords: δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) Sucrose – Oxidative stress – Insulin resistance – visceral fat

INTRODUCTION

Insulin resistance of skeletal muscle glucose transport represents a major defect in the normal maintenance of euglycemia (1). This insulin resistance is frequently accompanied by a variety of metabolic and cardiovascular abnormalities, including hypertension, glucose intolerance, Type 2 diabetes, dyslipidemia, atherosclerosis, and central obesity, a condition referred to as “syndrome X” (1-3) or the “insulin resistance syndrome” (2, 3). The link among these disorders has been attributed to hyperinsulinemia, a consequence of the insulin resistance (1, 4). The obese rat is an animal model of severe skeletal muscle insulin resistance that is also characterized by marked hyperinsulinemia, glucose intolerance, dyslipidemia, and central adiposity (1, 5) and therefore is a suitable animal model of the insulin resistance syndrome. In a similar way to humans, feeding chronically animals with diets containing high proportion of rapidly absorbable glucose or with a high proportion of fat promotes the development of insulin resistance (6, 7).

Elevated levels of circulating glucose can produce permanent chemical alterations in proteins and increase lipid peroxidation in a variety of experimental models of hyperglycemia (6, 8). In line with this, overproduction of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant depletion have been associated with the onset of diabetes (6, 9, 10). Furthermore, the deleterious effects of hyperglycemia on the properties of physiologically abundant proteins such as hemoglobin, albumin and collagen have been investigated (11-13).

Physical exercise induces a series of normal physiological and biochemical adaptations (14) and numerous metabolic factors can contribute to the improvements in glucose homeostasis that are seen after acute or chronic exercise and exercise training in individuals with insulin resistance (1). These adaptive responses include enhanced insulin action on the skeletal muscle glucose transport system,

normalization of glycemia, normalization of an abnormal blood lipid profile (1, 14-21) and decrease in oxidative stress (22, 23).

δ -ALA-D is an essential enzyme for all aerobic organisms because it participates in the biosynthesis pathway of tetrapyrrole molecules, which constitute prosthetic groups of physiologically important proteins such as hemoglobin and cytochromes (24, 25). δ -ALA-D is a sulfhydryl-containing enzyme; consequently, its activity is highly sensitive to the presence of prooxidant elements, which can oxidize its –SH groups (27, 28). Of particular importance is the impairment of the heme synthetic pathway in porphyria. The frequent coexistence of diabetes mellitus and porphyria disease has been reported in humans and experimental animal models (29, 30); this can be causally linked to the inhibition of this enzyme that occurs in diabetics (31, 32).

The present study was designed to evaluate the effect of physical exercise on insulin resistance, lipid peroxidation levels in different tissues (brain, liver, kidney) and on δ -ALA-D activity (from liver and kidney) in mice feeding ad libitum with high sucrose in the water.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals. 5-aminolevulinic acid (ALA), DL-dithiothreitol (DTT) and malondialdehyde (MDA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Mono- and dibasic potassium phosphate, acetic acid, orthophosphoric acid, Tris buffer, sucrose, trichloroacetic acid and sodium chloride were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

Animals and diets

Male mice (3-month-old) weighing 25–30 g from our own breeding colony were maintained under controlled conditions of room temperature (20–25 °C) and under natural lighting. Mice were divided in four groups: control group (cont), control exercised (Cont+Exer), sucrose exercised (Sucr+Exer) and sucrose (Sucr). Groups III and IV received ad libitum a solution of 20% sucrose dissolved in water for 26 weeks. Commercial diets and water were given ad libitum and consume was measured daily.

Training Program

A special swim-training model was used. Mice were adapted to swim at 30°C at 4d/wk (rest on weekends and Wednesday) for 4wk before experimental training. During week 1, mice swam 15 min. During week 2 to 4, mice swam for 20, 30 and 40min respectively with an extra weight fixed to the tail (3% of the animal's body weight). After this adaptation period, only the exercised groups were subjected to swim training for 26 wk at 30°C for 40 min, 4d/wk (rest on weekends and Wednesday) with the tail weight (3% of the animal's body weight).

Tissue preparation. Mice were killed by decapitation. The liver was quickly

removed, placed on ice, and homogenized in seven volumes of cold 0.2 mmol/l BHT +0.9% NaCl. The homogenate was centrifuged at $4000 \times g$ at 4°C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S1) that was used for biochemical assay.

Biochemical assay

δ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa (33) by measuring the rate of product (PBG) formation except that 84 mmol/lol/l potassium phosphate buffer, pH 6.4, and 2.4 mmol/l ALA were used (34, 35). All experiments were carried out after 10 min of pre-incubation. The reaction was started 10 min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. Incubation was carried out for 1 h at 39°C . Reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ for the Ehrlich-PBG salt. The reaction rates were linear with respect to time of incubation and added protein for all experimental conditions.

Thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS) were determined according to Ohkawa et al. (36). Briefly, the reaction mixture contained 100 μl 8.1% SDS, 200 μl low-speed supernatant fraction (S1), 750 μl 1.267 mol/l acetic acid, 270 mmol/l HCl, pH 3.5, and 750 μl 0.8% TBA. TBA-RS were quantified by adding S1 directly to the above reaction medium. Samples were incubated at 100°C for 60 min and then centrifuged at $1000 \times g$ for 15 min at 4°C . The amount of TBA-RS produced was measured at 532 nm, using MDA to construct standard curves.

Protein was measured by the method of Bradford (37) using bovine serum albumin as standard. Following collection, blood samples were transferred to polypropylene tubes containing EDTA (12 mg/ml) and stored on ice. Plasma samples were harvested by centrifugation and stored frozen until the time for assay. Glucose was measured with commercial kits using enzymatic methods (Labtest, Minas Gerais,

Brazil) and plasma insulin was measured by radioimmunoassay (Linco Research, St. Charles, MO).

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple range test when appropriate. Differences between groups were considered to be significant when $P \leq 0.05$.

RESULTS

Body weight gain. The body weight of mice fed with solution of sucrose was significantly higher than that of mice from the control group after 6 wk up to 26 wk of experiment ($P < 0.001$). After 10 wk up to 26-wk of experiment, body weight of mice from exercised and exercised+sucrose groups were lower than that of the mice of the control group ($P < 0.001$) **Figure 1**.

Food Consumption. Food consumption of mice groups feed on sucrose solution were significantly lower than that of mice from the control group after 4 wk of experiment and this persisted until the end of the experiment ($P < 0.001$ for Suc or Suc+Exc groups). **Figure 2**

Insulin and glucose levels. Plasma insulin levels was significantly higher in mice fed on sucrose in water than in those groups that did not receive sucrose ($P < 0.001$). The insulin levels in exercised mice fed on sucrose in water was similar to that of control groups (Cont and Cont-Exer) **Figure 3A**. Similarly, plasma glucose levels in mice fed on high sucrose in water was significantly higher than those of mice from control (Cont and Cont-Exer) and Sucr-Exerc groups ($P < 0.01$). **Figure 3 B**.

Abdominal fat index. Mice feeding on solution of sucrose showed abdominal fat index significantly higher than that of those from the other groups (Cont, Cont-Exer and Sucr-Exer) ($P < 0.001$). **Figure 4**.

δ-ALA-D activity. Liver δ -ALA-D activity of sucrose fed mice with and without exercise was not different from that of control groups. Addition of DTT (2 mmol) had no significant effect on δ -ALA-D activity; for all groups tested. **Figure 5.**

Tissues TBA-RS levels. Basal TBA-RS levels in hepatic, renal and cerebral tissues of mice fed on sucrose in water with and without exercise were not different from that of control groups **Figure 6.**

Tissues non-protein SH groups levels. Non-protein SH groups from liver, kidney and brain tissues of mice was similar among the different treatment groups. **Figure 7.**

DISCUSSION

Chronic intake of diets with a high proportion of rapidly absorbable glucose promotes the development of insulin resistance (38-40). In the present study, plasma insulin and glucose levels were significantly higher in mice fed on sucrose in water than in those that did not receive sucrose. Similarly, a high fat abdominal index was found in this group. These parameters characterize a classical index of insulin resistance. Visceral and intramuscular fat accumulation have been implicated in the development of insulin resistance in obese and type 2 diabetes subjects and, in line with this, literature data indicate that visceral fat excess is a good marker for insulin resistance (41).

Physical exercise has been reported as an important factor that can increase insulin responsiveness by tissues (1, 42-47). Results of the present investigation clearly demonstrated that exercise re-established all the alterations caused by a high sucrose diet in water and restored to control levels the abdominal fat index, plasma glucose and insulin in a mice model of diet-induced insulin resistance. For the best of our knowledge, this is the first time that the deleterious effect of a sucrose diet

Results from this study are essentially similar to those from human studies in which physical exercise has invariable beneficial effects causing decrease in body weight and visceral fat accumulation in relatively short time intervals (1,42-46). Furthermore, present results are also somewhat similar to those showing that physical exercise causes weight-loss and reduces the incidence of Type 2 diabetes in overweight men with impaired glucose tolerance (1, 42, 43).

Aerobic exercise can significantly lower plasma glucose levels, owing to normal contraction induced stimulation of GLUT-4 glucose transporter translocation and glucose transport activity in insulin-resistant skeletal muscle. In fact, training induced enhancement of insulin action is associated with upregulation of specific components of the glucose transport system in insulin-resistant muscle and includes increased protein expression of GLUT-4 and insulin receptor substrate-1.(1, 47).

Previously, we have observed that exhaustive exercise associated with selenium deficiency caused an inhibition of the sulfhydryl-containing enzyme δ -ALA-D (27). The enzyme inhibition could be a consequence of oxidation of critical thiol groups of enzyme by ROS produced during exercise (27). Since there are indications in literature that high sucrose diets can induce oxidative stress in rodents, we sought to determine whether an association between exercise and sucrose could lead to an inhibition of the enzyme. However, we did not observe increase of lipoperoxidation in cerebral, renal and hepatic tissues of mice fed on high sucrose with or without exercise compared with those that did not receive sucrose in water. In the same way, δ -ALA-D activity and NPSH groups from hepatic tissue was not decreased by sucrose feeding or by exercise. The absence of effect of high sucrose feeding on liver δ -ALA-D activity is in accordance with previous observation from our laboratory (Folmer et al. submitted).

Although physical exercise may acutely induce oxidative damage, regular

training appears to enhance antioxidant defenses and may reduce oxidative stress after exercise, and in some animal studies, it has been associated with a decreased lipid peroxidation (23, 48). To maximize the benefits of exercise, it is important to understand the effect of acute and long term physical exercise on oxidative stress and antioxidant defenses in diabetes (23). Some evidence also supports a role of physical fitness in decreasing lipid peroxidation (48). If regular physical exercise can be shown to have a protective effect against oxidative stress in DM, this may have direct impact on the use of physical exercise as a safe therapeutic modality in diabetes (23, 48).

In conclusion, the present results clearly indicated that moderate chronic exercise had favorable influence on the insulin resistance in mice caused by a high-sucrose diet. The present results strongly indicate that exercise can be considered a good practice for obese subjects or for those consuming high quantities of free-sugar in the diet.

REFERENCES

1. Henriksen E J: Exercise Effects of Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J. Appl. Physiol.* 93: 788–796, 2002.
2. Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. *Diab.* 37: 1595–1607, 1988.
3. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (Syndrome X): an expanded definition. *Annu. Rev. Med.*44: 121– 131, 1993.
4. DeFronzo RA and Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diab. Care* 14: 173–194, 1991.
5. Mathe D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. *Diab. Metab.* 21: 106–111, 1995.
6. Folmer, V.; Soares, J., C., M.; Rocha, J., B., T. Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content of the diet. *The Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 34:1279–1285, 2002.
7. Byrnes SE, Miller JCB, Denyer GS: Amylopectin starch promotes the development of insulin resistance in rats, *J. Nutr.* 125: 1430–1437, 1995.
8. Collier A, Wilson R. & Bradley H: Free radical activity in type2 diabetes. *Diabetic Med.* 7: 27–30, 1990.
9. Hunt J.V, Dean RT & Wolff SP: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation, Glucose oxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. *Biochem. J.* 256: 205–212, 1988.
10. Wolff SP & Dean RT: Glucose autoxidation and protein modification the potential

- role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.* 245: 243–250, 1987.
11. Schwartz JG: The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Rev.* 3: 269–287.aging. *Annu. Rev. Med.* 46: 223–234, 1995.
 12. Fu MX, Knecht KJ., Thorpe SR & Baynes J W: Role of oxygen in crosslinking and chemical modification of collagen by glucose. *Diabetes* 41: 42–48, 1992.
 13. Folmer V.; Soares, JCM, Gabriel D, Rocha JBT: High-fat diet causes δ -aminolevulinate dehydratase inhibition and hemoglobin glycation related to lipid peroxidation in mice. *J. Nut.* 133(7):2165-2170, 2003.
 14. Balogh N, Gaál T, Ribiczeyné P, Petri A: Biochemical and Antioxidant Changes in Plasma and Erythrocytes of Pentathlon Horses Before and After Exercise. *Veterinary Clinical Pathology* 30(4): 214-218, 2001
 15. Goodyear LJ and Kahn BB: Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med* 49: 235–261, 1998.
 16. Hayashi T, Wojtaszewski JF, and Goodyear LJ: Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E1039–E1051, 1997.
 17. Becker-Zimmermann K, Berger M, Berchtold P, Gries FA, Herberg L and Schwenen M: Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats. *Diabetologia* 22: 468–474, 1982.
 18. Helmrich SP, Ragland DR, Leung RW, and Paffenbarger RS: Physical activity and reduced occurrence of non-insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 325: 147–152, 1991.
 19. Dumke CL, Kim J, Arias EB, and Cartee GD: Role of kallikrein-kininogen system in insulin-stimulated glucose transport after muscle contractions. *J Appl*

- Physiol* 92: 657–664, 2002.
20. Berger M, Kemmer FW, Becker K, Herberg L, Schwenen M, Gjinavci A, and Berchtold P. Effect of physical training on glucose tolerance and on glucose metabolism of skeletal muscle in anaesthetized normal rats. *Diabetologia* 16: 179–184, 1979.
 21. James DE, Burleigh KM, Kraegen EW, and Chisholm DJ: Effect of acute exercise and prolonged training on insulin response to intravenous glucose in vivo in rat. *J Appl Physiol* 55:1660–1664, 1983.
 22. Senturk Uk, Gunduz F, Kuru O, Aktekin Mr, Kipmen D, Yalcin O, Bor-Kuç Ukatay M, Yesilkaya A and Baskurt O: Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 91: 1999–2004, 2001.
 23. Atalay M and Laaksonen DE: Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science and Medicine* (2002) 1: 1-14, 2002
 24. Jaffe EK, Ali S, Mitchell L. W, Taylor KM, Volin M & Markham GD Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. *Biochemistry* 34: 244–251, 1995.
 25. Sassa, S: ALAD porphyria. *Semin. Liver Dis.* 18: 95–101, 1998.
 26. Barbosa NBV, Rocha JBT, Zeni G, Emanuelli T, Beque MC & Braga AL: Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149: 243–253, 1998.
 27. Soares, J. C. M; Folmer, V, , ROCHA J. B. T. Influence of Dietary Selenium Supplementation and Exercise on Thiol-Containing Enzymes In Mice. *Nutrition* 19: 627-632, 2002.
 28. Maciel E. M, Bolzan R. C, Braga A L, Rocha, J.B.R. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects δ -aminolevulinate dehydratase from

- liver, kidney and brain of mice. *J Biochem Mol Toxicol* 14: 310-319, 2000.
29. Bitar, M.; Weiner, M. Diabetes-induced metabolic alterations in heme synthesis and degradation and various heme-containing enzymes in female rats. *Diab.* 33:37-44; 1984.
30. Scassa, M.E.; Varone, C.L.; Montero, L.; Cánepa, E.T. Insulin inhibits δ -aminolevulinate synthase gene expression in rat hepatocytes and human hepatoma cells, *Exp. Cell. Res.* 244:460-469; 1998.
31. Caballero, F.; Gerez, E.; Polo, C.; Mompó, O.; Vázquez, E.; Schultz, R.; Bernabo, J.; Batlle, A. Alteraciones en el camino metabólico del hemo en pacientes diabéticos. *Medicina* 55:b117-124; 1995.
32. Fernández-Cuartero, B.; Rebollar, J.L.; Batlle, A.; Salamanca, R.E. Delta aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:479-488; 1999.
33. Sassa, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28:133-145; 1982.
34. Emanuelli T, Rocha JBT, Pereira ME, Porciuncula LO, Morsch, VM, Martins AF & Souza DO: Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on δ -aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. *Pharmacol. Toxicol.* 79: 136–143, 1996.
35. Rocha, JBT, Pereira ME, Emanuelli T, Christofari RS. & Souza DO: Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in brain, liver kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100: 27–37, 1995.
36. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by

- thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95:351-358, 1979.
37. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254, 1976.
 38. Folmer V, Soares JCM, Rocha JBT: Oxidative stress in mice is dependent on the free glucose content in the diet. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34: 1279–1285, 2002.
 39. Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford JL, Bruce DG, Pascoe WS: Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 237: 885–888, 1987.
 40. Higgins JA, Miller JCB, Denyer GS: Development of insulin resistance in rats is dependent on the rate of glucose absorption from diet. *J. Nutr.* 126: 596–602, 1996.
 41. Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A, Manco M, Morroni M, Cinti S, Granzotto M, Vettor R, Camastra S, Ferrannini E. Insulin resistance in morbid obesity: Reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes.* 51: 144–151, 2002.
 42. Tuomilehto J, Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Valle TT, Hamalainen H, Ilanne-Parikka P, Keinanen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Aunola S, Cepaitis Z, Moltchanov V, Hakumaki M, Mannelin M, Martikkala V, Sundvall J, Uusitupa M. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344: 1343–1350, 2001.
 43. Helmrich SP, Ragland DR, Leung RW, Paffenbarger RS. Physical activity and reduced occurrence of non-insulindependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 325: 147–152, 1991.
 44. Ivy JL. Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin

- resistance and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Medicine* 24: 321-336, 1997.
45. Rice B, Janssen I, Hudson R, Ross R. Effects of aerobic or resistance exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. *Diabetes Care* 22: 684-691, 1999.
46. Ross R, Dagnone D, Jones PJ, Smith, H, Paddags A, Hudson R, Janssen I. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 133: 92-103, 2000.
47. COX, JH.; CORTRIGHT, R. N.; DOHM, G. L. Effect of aging on response to exercise training in humans: skeletal muscle GLUT-4 and insulin sensitivity. *J Appl Physiol.* 86: 2019-2025, 1999.
48. Laaksonen DE: Role of physical exercise, fitness and aerobic training in type 1 diabetic and healthy men in relation to the lipid profile, lipid peroxidation and the metabolic syndrome. *J Sports Sci & Med* 2(1):1-66, 2003.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Weight gain in mice from the control group (Cont ○), exercised (Cont + Exer ●), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer ▲) and only fed high sucrose (Sucr Δ) diets for 26 wk. Values are means ± SD, $n = 10$ per group. *Different from control, ($P < 0.001$).

Figure 2. Food consumption in mice from the control group (Cont ○), exercised (Cont + Exer ●), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer ▲) and only fed high sucrose (Sucr Δ) diets for 26 wk. Values are means ± SD, $n = 10$ per group. *Different from control, ($P < 0.001$).

Figure 3. Plasma insulin (3A) and glucose (3B) concentrations in mice after a 12-h period of starvation, and previously treated with different diets for 26 wk: control (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr). Results are expressed as mean ± SD. for ten animals per group. (* Different from control, $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$).

Figure 4. Abdominal fat index in mice from the control group (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets for 26 wk. Values are means ± SD, $n = 10$ per group. *Different from control, ($P < 0.001$).

Figure 5. δ -ALA-D activity in liver of mice from the control group (Cont ○), exercised (Cont + Exer ●), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer ▲) and only fed high sucrose (Sucr Δ) diets for 26 wk, in the absence or the presence of DTT (2 mmol/L). Data are expressed as mean ± SD for 8-10 animals per group.

Figure 6. Basal TBA-RS levels in liver, kidney and brain tissues of mice from the control (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets for 26 wk. Results are expressed as mean \pm SD. for ten animals per group

Figure 7. Levels of NPSH groups from liver, kidney and brain tissues of mice from the control (Cont), exercised (Cont + Exer), fed high sucrose and exercised (Sucr + Exer) and only fed high sucrose (Sucr) diets for 26 wk. Results are expressed as mean \pm SD for ten animals per group.

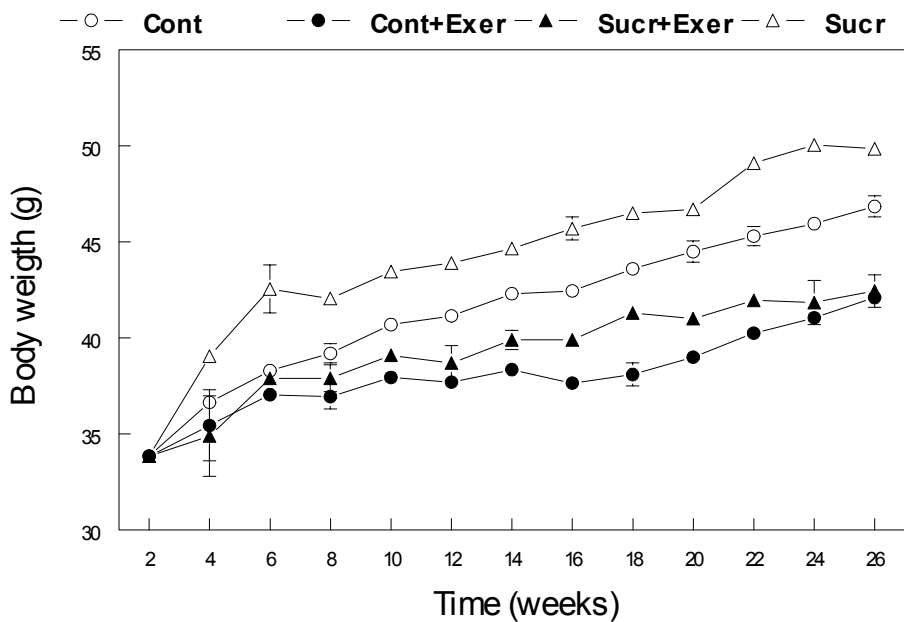


Figure 1, Soares et al.

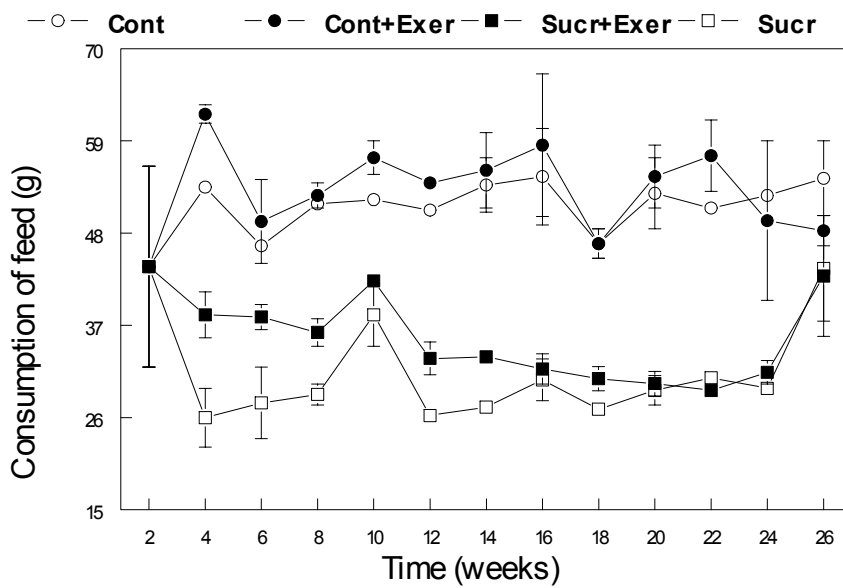


Figure 2, Soares et al.

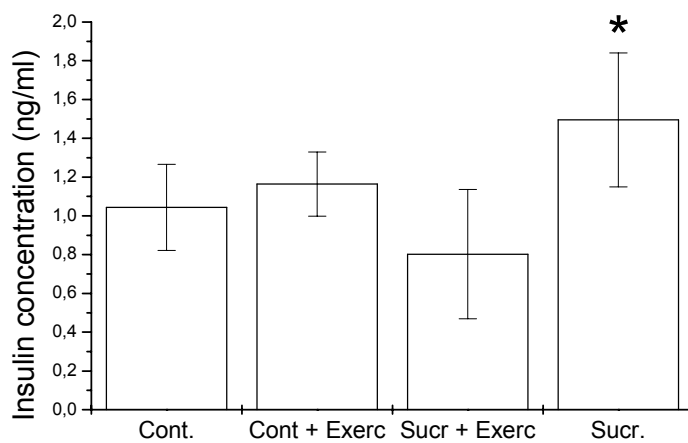


Figure 3A, Soares et al.

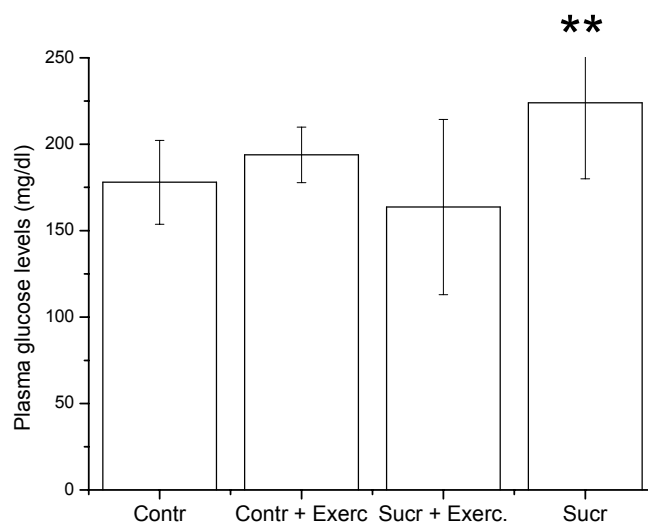


Figure 3B, Soares et al.

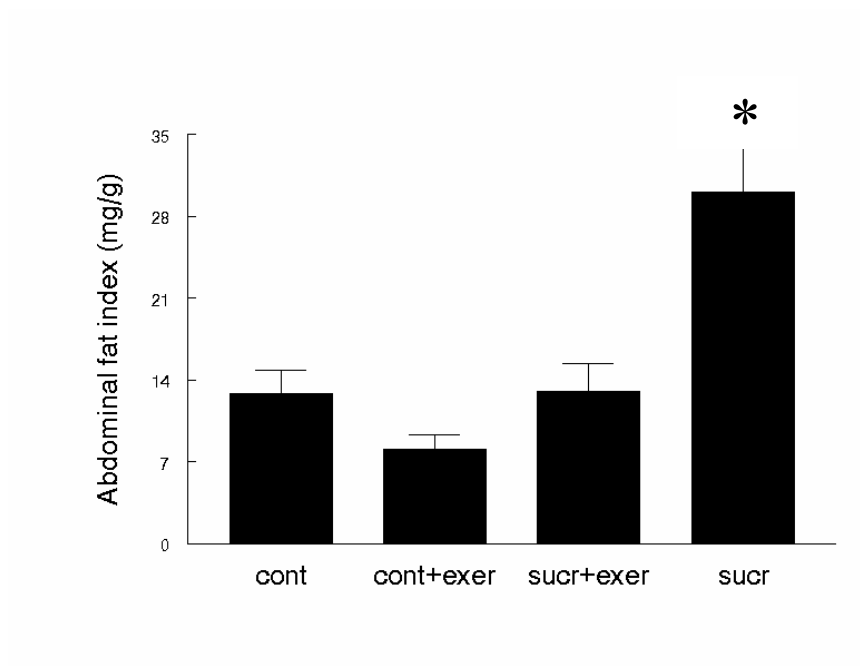


Figure 4. Soares et al.

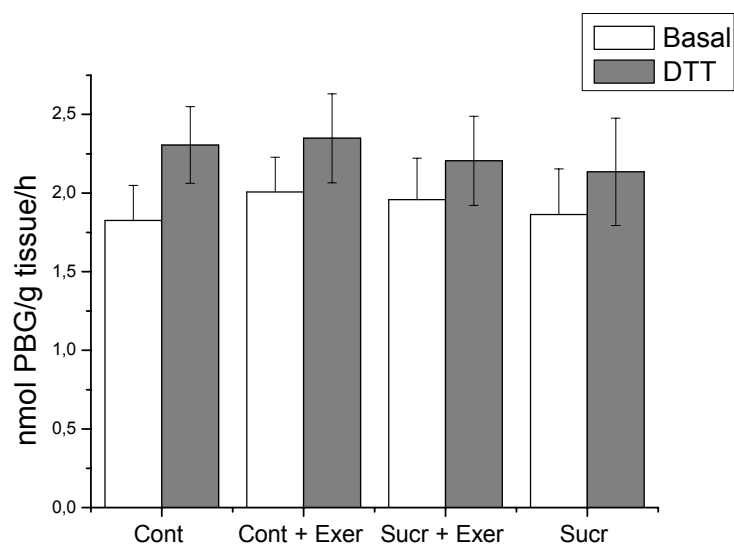


Figure 5. Soares et al.

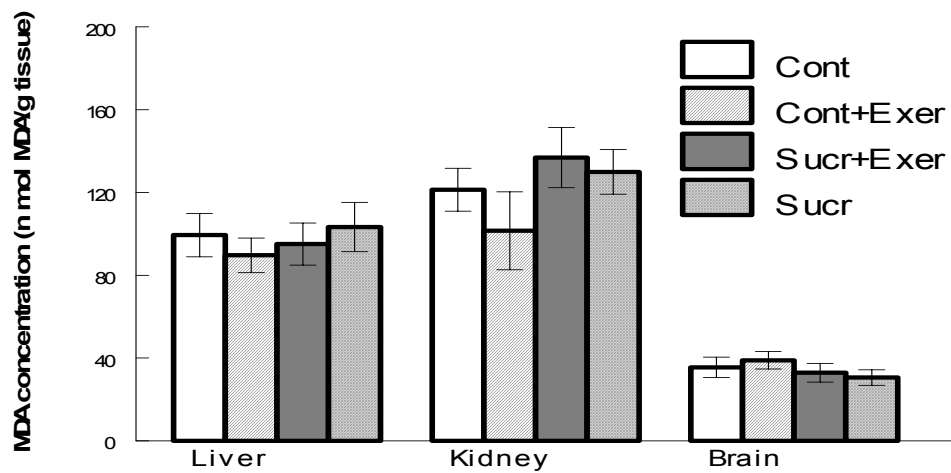


Figure 6, Soares et al.

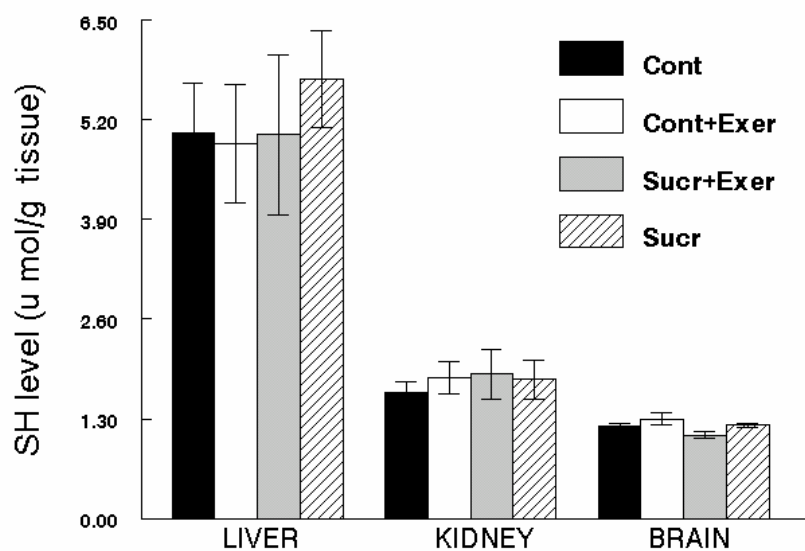


Figure 7, Soares et al.

8. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

De uma maneira geral, nosso modelo de indução de estresse oxidativo *in vitro*, através da incubação de eritrócitos humanos com altas concentrações de glicose, comprovaram ser eficaz em elevar os níveis de lipoperoxidação nos eritrócitos (**Artigos 1 e 2**). Estes achados estão de acordo com os resultados encontrados na literatura, comprovando o efeito nocivo de altas concentrações de glicose sobre diferentes órgãos e tecidos tanto *in vivo* como *in vitro*. (DAY et al., 1979; BROWNLEE et al., 1984; WOLFF & DEAN, 1987; HUNT et al., 1988; COLLIER et al., 1990; FU et al., 1992; BROWNLEE, 1994; SCHWARTZ, 1995; DOMÍNGUEZ et al., 1998; MOHAMED et al., 1999;).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a exposição dos eritrócitos à concentrações relativamente altas de glicose por um período de 1 a 2 dias, causam marcado aumento do estresse oxidativo (**Artigos 1 e 2**). A exposição dos eritrócitos à glicose também causou um aumento na glicação da hemoglobina e susceptibilidade à hemólise osmótica em eritrócitos de pessoas saudáveis e em eritrócitos de pacientes diabéticos descontrolados (**Artigo 1**). Supostamente este aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos está ligado ao aumento da peroxidação lipídica causada pela glicose ou frutose, pois o ebselen foi capaz de proteger os eritrócitos de pessoas saudáveis e eritrócitos de pacientes diabéticos descontrolados, diminuindo a fragilidade osmótica frente à incubação com altas concentrações de glicose *in vitro*. Ebselen é um organocalcogênio com atividade antioxidante que atua mimetizando a atividade da enzima glutathione peroxidase. A proteção conferida pelo ebselen aos eritrócitos expostos a elevadas concentrações de glicose pode ser atribuída a sua capacidade de decompor H_2O_2 e lipoperóxidos na presença de grupamentos tióis reduzidos. Cabe ressaltar que os eritrócitos na presença deste açúcar redutor utilizado no estudo (**Artigos 1 e 2**) aumentou os

níveis de grupos tióis reduzidos os quais poderiam ser substrato para o ebselen **(Artigo 1)**.

Ebselen também foi capaz de diminuir a glicação da hemoglobina **(Artigo 1)**, Recentes estudos em animais de laboratório demonstram que antioxidantes, como vitamina E e selênio, são capazes de diminuir a glicação causada pela hiperglicemia, porém, o mecanismo pelo qual estes compostos agem inibindo a glicação ainda não é conhecido.

Neste estudo **(Artigo 2)** também demonstra-se que a exposição dos eritrócitos à concentrações relativamente altas de glicose (até 40 mmol/l) determina um aumento significativo na atividade da enzima δ -ALA-D, possivelmente pela capacidade redutora que este açúcar possui. Este aumento na atividade da enzima tende a retornar aos níveis do controle quando incubado com 100 mmol/l de glicose, o que coincide também com o maior aumento dos níveis de TBA-RS e tendência dos níveis de grupamentos tióis reduzidos retornarem aos níveis do controle. A incubação dos eritrócitos a partir de 100 mmol/l de glicose, retorna a atividade da enzima aos níveis do controle, começando a inibir sua atividade em concentrações maiores. Provavelmente isto ocorre pela oxidação dos grupamentos SH da enzima, o que pode ser evidenciado quando se adiciona DTT (agente redutor) no meio aumentando em 120% a atividade da enzima. Isto fica visualizado também pela correlação positiva entre atividade enzimática da δ -ALA-D e estado redox dos grupamentos tióis eritrocitários. A tese de que os grupos SH da enzima provavelmente estão sendo oxidados por ação de espécies reativas é reforçada por dados que evidenciam uma correlação negativa entre o aumento da atividade da δ -ALA-D e os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico *in vitro*. (Folmer et al., 2002).

Como verificado nos nossos resultados, onde a atividade da δ -ALA-D foi inibida por elevadas concentrações de glicose e prevenida esta inibição pelo DTT, a literatura cita que o estresse oxidativo está relacionado como a principal causa da inibição da δ -ALA-D em eritrócitos de camundongos diabéticos e também em eritrócitos humanos (BITAR et al., 1984; FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999; FOLMER et al., 2002). A incubação dos eritrócitos com elevadas concentrações de glicose, também aumentou significativamente a atividade das enzimas SOD e catalase, o qual pode ser interpretado como uma resposta compensatória ao aumento na produção de peróxidos causados pela hiperglicemia. Isto indica que altas concentrações de glicose em curto período de tempo também podem modular a atividade destas duas enzimas antioxidantes no sentido a neutralizar a ação de peróxidos formados.

O exercício físico é de fundamental importância na terapia do Diabetes mellitus, pois aumenta muito a sensibilidade tecidual à insulina. No entanto, os efeitos benéficos do exercício podem desaparecer quando o indivíduo o faz sem um treinamento adequado ou ultrapassa a intensidade de exercício que indivíduo está acostumado. Neste caso, os músculos esqueléticos geram continuamente uma cascata de intermediários metabólicos de baixo peso molecular, difusíveis, derivados da redução monoelétrica do oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio.

Neste estudo (**ARTIGO 3**) foi verificada a interação entre o efeito do exercício físico e o efeito da suplementação de diferentes níveis selênio na dieta, sobre a atividade das enzimas δ -ALA-D, SDH e LDH de diferentes tecidos de camundongos. A suplementação com selênio na dieta elimina a inibição causada pelo efeito do exercício físico nos animais não suplementado com selênio. Verificando-se assim que há um efeito aditivo do exercício físico e o nível de selênio na dieta. Este efeito

inibitório provavelmente está ligado a oxidação dos grupamentos tiois presentes no sítio ativo da enzima, pela ação de espécies reativas do oxigênio geradas durante o exercício intenso. Além disso, o acúmulo de ALA causado pela inibição da enzima também contribui para o efeito pró-oxidante. A oxidação dos grupamentos tiois do sítio ativo da enzima provavelmente por EROS tenha alterado a conformação da enzima, de maneira a não ser possível a reversão da inibição pelo DDT.

A atividade da SDH foi inibida nos músculos esqueléticos e cardíacos de camundongos exercitados sem suplementação de selênio. De maneira semelhante à δ -ALA-D, a SDH é sensível à oxidação dos grupos -SH e perde sua atividade quando estes estão oxidados. Inúmeros estudos citados na literatura demonstram um aumento na produção de EROS durante o exercício intenso o que provavelmente é o responsável pela oxidação dos grupos -SH da enzima neste caso. A atividade da LDH no músculo esquelético e cardíaco não foi alterada, tanto pela suplementação de selênio na dieta quanto pelo exercício físico. Embora esta enzima contenha grupos -SH passíveis de serem oxidados, o estado redox dos mesmos podem não ser essencial para a atividade da enzima.

O elevado percentual de sacarose ingerido diariamente pelos camundongos no modelo experimental utilizado (**ARTIGO 4**), causou níveis plasmáticos elevados de glicose e insulina e também um maior índice de gordura corporal, caracterizando um clássico índice de resistência a insulina. Estes achados estão de acordo com os resultados encontrados por vários autores que trabalharam com diferentes protocolos, usando roedores como modelo animal (STORLIEN et al., 1986; BYRNES et al., 1995; HIGGINS et al., 1996; HANSEN et al., 1998; STORLIEN et al., 2000).

Neste modelo experimental o exercício físico mostrou-se eficiente em aumentar a sensibilidade à insulina e ao contrário dos resultados obtidos no modelo anterior (**ARTIGO 3**), não alterou a atividade da δ -ALA-D nem aumentou os níveis

de lipoperoxidação nos diferentes tecidos de camundongos submetidos ao exercício físico. Cabe ressaltar que no primeiro modelo, os animais eram submetidos à natação com um sobrepeso equivalente a 5% do peso corporal durante 60 minutos, 4 vezes por semana por um período de 8 semanas, enquanto que no segundo modelo experimental os animais eram submetidos a natação com um sobrepeso equivalente a 3% do peso corporal durante 40 minutos, 4 vezes por semana por um período de 26 semanas. Tal diferença entre os dois modelos experimentais de exercício físico confere ao primeiro um caráter mais agudo e exaustivo com relação ao segundo modelo experimental. Já está bem descrito na literatura que embora o exercício físico intenso possa induzir dano oxidativo, o treinamento físico regular é capaz de aumentar as defesas antioxidantes e diminuir a lipoperoxidação (SEM, 1995; JI, 1996; ALESSIO & BLASI, 1997; SENTURK et al., 2001; ATALAY & LAAKSONEN 2002; GANDRA et al., 2004). Isto ganha maior importância quando se trata de pacientes diabéticos, tendo em vista que o exercício físico é capaz de aumentar a sensibilidade à insulina e melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados nesta tese, pode-se concluir que:

- A incubação de eritrócitos *in vitro* com altas concentrações de glicose ou frutose leva a um aumento na lipoperoxidação (indicando uma situação de estresse oxidativo);
- Ebselen oferece proteção aos eritrócitos de pacientes com diabetes mellitus tipo II descontrolado, contra hemólise osmótica *in vitro*;
- Ebselen diminui a fragilidade osmótica e glicação de eritrócitos de pessoas normais expostos à situação de hiperglicemia;
- Concentrações elevadas de glicose no sangue contribuem para a diminuição da atividade de enzimas tiólicas provavelmente por

oxidação dos seus grupos –SH.

- Exercício físico associado com baixos níveis de selênio na dieta prejudica a atividade de enzimas tiólicas como δ -ALA-D e SDH;
- Exercício físico de intensidade moderada aumenta a sensibilidade à insulina em camundongos com resistência à insulina induzida pela dieta com sacarose; e
- As alterações na atividade da δ -ALA-D encontradas neste trabalho colocam esta enzima, tal como hemoglobina, albumina e colágeno, como um alvo potencial para detecção das oxidações fisiológicas ou patológicas causadas pelo DM.

9. Referências Bibliográficas:

ADA, AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Alexandria, V. A. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diab. Care**, v. 20, p. 1183, 1997.

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

ALESSIO, H. M & BLASI, E. R. Physical activity as a natural antioxidant booster and its effect on a healthy life span. **Res Q Exerc Sport** v. 68, p. 292–302, 1997.

JI, L. L. Exercise, oxidative stress, and antioxidants. **Am J Sports Med** v. 24 p. 20–24, 1996.

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

ARCIERO, P. J.; VUKOVICH, M. D.; HOLLOSZY, J. O. Comparison of short-term diet and exercise on insulin action in individuals with abnormal glucose tolerance. **J Appl Physiol** v. 86, p. 1930-1935, 1999.

ATALAY, M & LAAKSONEN, D. E. Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise. **J Sports Sci. Med.** v 1, p. 1-14, 2002.

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

- BARBOSA, N. B. V.; ROCHA, J. B. T.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M. C.; BRAGA, A. L. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 149, p. 243-253, 1998.
- BATLLE, A. M. DEL C. & STELLA, A. M. Delta-aminolevulinatase: its mechanism of action. **Int. J. Biochem.**, v. 9, p. 861-864, 1978.
- BATNA, A.; FUCHS, C.; SPITELLER. Lipid peroxidation in presence of ebslen. **Chem. Physics of Lipids**. 87, p. 149-158, 1997.
- BATTELL, M. L.; McNEILL, J. H.; DELGATTY, H. L. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* v. 179, p. 37-34, 1998.
- BAYNES, J. W. Perspectives in diabetes. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, p. 405-412, 1991.
- BECHARA, E. J. H.; MEDEIROS, M. H. G.; MONTEIRO, H. P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C. A.; ADBALLA, D. S. P.; ONUKI, J.; WENDEL, C. M. A.; NASCI, P. D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Química Nova** v. 16, p. 385-392, 1993.
- BECKER, D. J.; REUL, B.; OZCELIKAY, A. T.; HENQUIN, J. C.; BRICHARD, S. M. Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liverglycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. **Diabetologia**. V. 39, p. 3-11, 1996.

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

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

BLAIR, S. N.; KOHL, H. W.; PAFFENBARGER, R. S.; CLARK, D. G.; COOPER, K. H.; GIBBONS, L. W. Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. **JAMA**, v. 262, p. 2395-2401, 1989.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D; BASTARD, J. P; JAUDON, M. C.; DELATTRE, J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diab & Metab** v. 26, p. 163-176, 2000.

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

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

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

BRZEZINSKA, S. E. Erythrocyte osmotic fragility test as the measure of defence

- against free radicals in rabbits of different age. **Acta Vet Hung.** 49, p. 413-419 2001.
- BUEGE, J. A. & AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52, p. 302-309, 1978.
- BURNHAM, T. K. & FOSSNAUGH, R. P. Porphyrin, diabetes, and their relationship. A case report. **Arch. Dermatol.**, v. 83, p. 717-722, 1961.
- BYRNES, S. E.; MILLER, J. C. B.; DENYER, G. S. Amylopectin starch promotes the development of insulin resistance in rats. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1430-1437, 1995.
- CABALLERO, F. A.; GEREZ, E.; BATLLE, A.; VAZQUEZ, E. Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. **Chem. Biol. Interact.** v. 126, p. 215-225, 2000.
- CABALLERO, F.; GEREZ, E.; PÓLO, C.; MOMPO, O.; VAZQUEZ, E.; SCHULTZ, R.; BERNABO, J.; BATLLE, A. Alteraciones en el camino metabólico del hemo en pacientes diabéticos. **Med.** v. 55, p. 117-124, 1995.
- CABALLERO, F. A.; GEREZ, E. N.; POLO, C. F.; VAZQUEZ, E. S.; BATLLE, A. M. C. Reducing sugars trigger δ -aminolevulinic acid dehydratase inactivation: evidence of in vitro aspirin prevention. **Gen Pharmac.**, v. 31, p. 441-445, 1988.
- CADENAS, E & SIES, H. Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity. **Adv Enzyme Regul.** v. 23, p. 217-237, 1985.

- CARUBELLI, R.; SCHNEIDER, J. E.; FLOYD, R. Cytotoxic Effects of Autoxidative Glycation. **Free Radic Biol Mol.**, v. 18, p. 265-269, 1994.
- CHEVALIER, F.; CHOBERT, J. M.; DALGALARRONDO, M.; CHOISSET, Y.; HAERTLE, T. Maillard glycation of beta-lactoglobulin induces conformation changes. **Nahrung**, v. 46, p. 58-63, 2002.
- CHILIBECK, P.D.; BELL, G. J.; SOCHA, T. The effect of aerobic exercise training on the distribution of succinate dehydrogenase activity throughout muscle fibres. **Can J Appl Physiol.** v. 23(1), p. 74-86, 1998.
- CHINARRO, S.; STELLA, A. M.; BERGES, L.; SALAMANCA, R. E.; BATTLE, A. M. DEL C. Aminolevulinato dehidratasa properties y mecanismo de acción. **N. Arch. Fac. Med.**, v. 41, p. 61-70, 1983.
- COLLIER, A.; WILSON, R.; BRADLEY, H. Free radical activity in type 2 diabetes. **Diab. Med.**, v. 7, p. 27-30, 1990.
- COX, J. H.; CORTRIGHT, R. N.; DOHM, G. L. Effect of aging on response to exercise training in humans: skeletal muscle GLUT-4 and insulin sensitivity. **J Appl Physiol** v. 86, p. 2019-2025, 1999.
- DAY, J. F.; THORNBURG, S. R.; BAYNES, J. W. Non-enzymatically glycosylated albumin. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 595-597, 1979.
- DENGEL, D. R.; PRATLEY, R. E.; HAGBERG, J. M. Distinct effects of aerobic exercise training and weight loss on glucose homeostasis in obese sedentary men. **J Appl Physiol** v. 81, 318-325, 1996.

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

DOMÍNGUEZ, C.; RUTZ, E.; GUSSINYE, M.; CARRASCOSA, A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. **Diabetes Care**. V. 21, p. 1736–1742, 1998.

DOUILLET, C.; TABIB, A.; BOST, M.; ACCOMINOTTI, M.; BORSON-CHAZOT, F.; CIAVATTI, M. Selenium in Diabetes: Effects of Selenium on Nephropathy in Type I Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **J. Trace Elem. Exp Med**. v. 12, p. 379-392, 1999.

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

EKELUND, L. G.; HASKELL, W. L.; JOHNSON, J. L.; WHALEY, F. S.; CRIQUI, M. H.; SHEPS, D. S. Physical fitness as a predictor of cardiovascular mortality in asymptomatic North American men. The lipid research clinics mortality follow-up study. **N Engl J Med** v. 319, p. 1379-1384, 1988.

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

FALCIONI, G. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutat Res**. 464, p. 269-277, 2000.

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

FERNANDEZ, A. A & FINK, N. E. Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: a definition by application of a mathematical model. **Clin. Lab. Med.** 38, p. 433-436, 2000.

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

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

FORBES, J. M.; THALLAS, V.; THOMAS, M. C.; FOUNDS, H. W.; BURNS, W. C.; JERUMS, G.; COOPER, M. E. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes. **FASEB J**, v. 17, p. 1762-1764, 2003.

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

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

GANDRA, P. G; ALVES, A. A, MACEDO, D. V. Determinação eletroquímica da

- capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Quim. Nova** v. 27(6), p. 980-985, 2004.
- GANNON, M. Molecular genetic analysis of diabetes in mice. **Trends Genet** v. 10, p. 23-28, 2001.
- GARRY, M & DENIS, J. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. **Diabetes** v. 51(1), p. 7-18, 2002.
- GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J. J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 61, p. 618-629, 1955.
- GIBBS, P. N. B.; GORE, M. G.; JORDAN, P. M. Investigation os the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolevulinate dehydratase. **Biochem. J.**, v. 225, p. 573-580, 1985.
- GIBBS, P. N. B. & JORDAN, P. P. M. Identification of lysine at the active site of human delta-aminolevulinate dehydratase. **Biochem. J.**, v. 236, p. 447-451, 1986.
- GIBSON, K. D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase. **Biochem. J.**, v. 61, p. 618-629, 1955.
- GOEREZ, G. & KORDA, S. Porphyria cutânea tarda (PCT) und Diabetes Mellitus. **Z. Haut.**, v. 52, p 1165-1174, 1977.

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

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

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

GOERING, P. L.; MISTRY, P.; FOWLER, B. A. A low molecular weight lead-binding protein in brain attenuates lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase: comparison with a renal lead-binding protein. **J. Pharmacol. Exp. Therap.**, v. 237, p. 220-225, 1986.

GOLLNICK, P. D. & KING, D. W. Effect of exercise and training on mitochondria of rat skeletal muscle. **Am J Physiol.** v. 216(6), p. 1502-1509, 1969.

GRECO, A. V.; MINGRONE, G.; GIANCATERINI, A.; MANCO, M.; MORRONI, M.; CINTI, S.; GRANZOTTO, M.; VETTOR, R.; CAMASTRA, S.; FERRANNINI, E. Insulin resistance in morbid obesity: Reversal with intramyocellular fat depletion. v. 51, p. 144–151, 2002.

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

HAGERHALL C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved

- theme. **Biochim Biophys Acta**. 1320 (2), p. 107-141, 1997.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. In: **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press Inc. N. Y. 3th ed, 1999.
- HALLIWELL, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals in vivo. **Biochem. J.**, v. 205, p. 462-472, 1982.
- HANSEN, P. A.; DONG, H. H.; MARSHALL, B. A.; NOLTE, L. A.; CHEN, M. M.; MUECKLER, M.; HOLLOSZY, J. O. A high fat diet impairs stimulation of glucose transport in muscle: Functional evaluation of potential mechanisms. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 26157-26163, 1998.
- HANS, H. P.; DU, X.; EDELSTEIN, D.; TAGUCHI, T.; MATSUMURA, T.; JU, Q.; LIN, J.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; HANNAK, D.; NEUMAIER, M.; BERGFELD, R.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. **Nat. Med.** v. 9 (Suppl. 3), p. 294-299, 2003.
- HARDIN, D. S; AZZARELLI, B; EDWARDS, J. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT4 in skeletal muscles. **J Clin Endocrinol Metab** v. 80, p. 2437-2446, 1995.
- HENRIKSEN, E. J. Exercise Effects of Muscle Insulin Signaling and Action Invited Review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. **J Appl Physiol** v. 93, p. 788–796, 2002.

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

HOLLOSZI, J. O. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **J Appl Physiol.** v. 56(4), p. 831-838, 1984.

HOLLOSZI, J. O. Biochemical adaptations in muscle. effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **J Biol Chem.** v. 242(9), p. 2278-2282, 1967.

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

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

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

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

JAFFE, E. K.; MARKHAM, G. D.; RAJAGOPALAN, J. S. ¹⁵N and ¹³C NMR studies of ligands bound to the 280 000 dalton protein porphobilinogen synthase elucidate

- the structures of enzyme-bound product and a schiff base intermediate. **Biochem.**, v. 29, p. 8345-8350, 1990.
- JAFFE, E. K.; VOLIN, M.; NYERS, C. B. 5-Chloro[1,4-¹³C]levulinic acid modification of mammalian and bacterial porphobilinogen synthase suggests an active site containing two Zn (II). **Biochem.**, v. 33, p. 11554-11562, 1994.
- JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W. F. O.; ROSSOUW, J. E. Selenium and other mineral element in populations at risk for esophageal cancer. **Cancer** v. 62, 2635–2639, 1998.
- KATZEL L.I.; BLEECKER, E. R.; COLMAN, E. G. Effects of weight loss vs. aerobic exercise training on risk factors for coronary disease in healthy, obese, middle-aged and older men. **JAMA** v. 274, p.1915-1921, 1995.
- KEDZIORA, J., BUCZYNSKI, A. & KEDZIORA-KORNATOWSKA, K. Effect of physical exercise on antioxidative enzymatic defense in blood platelets from healthy men. **Int. J. Occup. Med. Envir. Health.**, v. 8, p. 33-39, 1995.
- KLOTZ, L. O.; SIES, H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. **Toxicol Lett.** v. 140 (Suppl. 141), p. 125-132, 2003
- KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **FEBS Letters.** 413 p. 236-238, 1997.
- KOURY, J. C & DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev. Nutr.** v. 16(4), p. 433-441, 2003.
- KUTZENKO, A. S.; LAMZIN, V. S. Conserved supersecondary structural motif in NAD-dependent dehydrogenases. **FEBS Lett.** v. 423(1), p. 105-109, 1998.
- LAKKA, T. A.; VENÄLÄINEN, J. M.; RAURAMAA, R.; SALONEN, R.; TUOMILEHTO,

- J.; SALONEN, J. T. Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction. **N Engl J Méd** v. 330, p. 1549-1554, 1999.
- LANDESTEIN, R.; EPP, O.; BARTLES, K.; WENDEL, A. Structure analysis and molecular **Mol Biol** v. 134, p. 199-218, 1979.
- LAUKKANEN, J. A.; LAKKA, T. A.; RAURAMAA, R.; KUHANEN, R.; VENALAINEN, J. M.; SALONEN, R.; SALONEN, J. T. (2001) Cardiovascular Fitness as a Predictor of Mortality in Men. **Arch Intern Med** v. 161, 825-831, 2001.
- LE BLANC, J; NADEAU, A; BOULAY, M. Effects of physical training and adiposity on glucose metabolism and 125I-insulin binding. **J Appl Physiol** v. 46, p. 235-239, 1979.
- LE-QUOC. K.; LE-QUOC, D.; GAUDEMER, Y. Evidence for the existence of two classes of sulfhydryl groups essential for membrane-bound succinate dehydrogenase activity. **Biochemistry**. v. 20(7), p. 1705-1710, 1981.
- MACIEL, E. N.; BOLZAN, R. C.; BRAGA, A. L.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affects aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 14, p. 310-319, 2000.
- McNEILL, J. H.; DELGATTY, H. L.; BATTELL, M. L. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**. v. 40, p. 1675-1678, 1991.

- MEERSON, F. Z.; KAGAN, V. E.; KOSLOV, Y. P.; BELKINA, L. M.; ARKIPENKO, Y. V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. **Basic Res. Cardiol.**, v. 77, p. 465-485, 1982.
- MINKOWSKI, O. Historical development of the theory of pancreatic diabetes (Introduction and translation by R. Levine). **Diabetes**, v. 38, p. 1, 1989.
- MOHAMED, A. K.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER R.; NAWROTH, P. P. The role of oxidative stress and NF- κ B activation in late diabetic complications. **Biofactors**, v. 10, p. 157-167, 1999.
- MONTEIRO, H. P.; BECHARA, E. J. H.; ABDALLA, D. S. P. Free radicals involvement in neurological porphyrias and lead poisoning. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 103, p. 73-83, 1991.
- MOY, C. S.; SONGER, T. J.; LAPORTE, R. E.; DORMAN, J. S.; KRISKA, A. M.; ORCHARD, T. J.; BECKER, D. J.; DRASH, A. L. Insulin-dependent diabetes mellitus, physical activity, and death. **Am J Epidemiol** v. 137, p. 74-81, 1993.
- MUELLER, A. S.; PALLAUF, J.; RAFAEL, J. The chemical form of selenium affects insulinomimetic properties of the trace element: investigations in type II diabetic dbdb mice. **J. Nutr. Biochem.** V. 14, p. 637-647, 2003.
- MUGESH G, DU MONT WW, SIES H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chem Rev** v. 101, p. 2125-2179, 2001.
- MUGESH, G.; PANDA, A.; SING, H. B.; PUNEKAR, N. S.; BUTCHER, R. J. Glutathione peroxidase-like antioxidant activity of diaryl diselenides: A mechanistic study. **J. Am. Chem. Soc.** v. 123, p. 839-850, 2001.
- MULLER, A.; CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. A novel biologically active seleno-

- organic compound-I: Glutathione peroxidase-like activity *in vitro* and antioxidant capacity of pz 51 (ebselen). **Biochem. Pharmacol.** v. 33(20), p. 3235-3239, 1984.
- NAKAMURA, J.; KOH, N.; SAKAKIBARA, F.S.; HAMADA, Y. Polyol pathway, 2,3 diphosphoglycerate in erythrocytes and diabetic neuropathy in rats. **E. J. Pharmacol.** 294, p. 207-214, 1995.
- NAVARRO-ALARCÓN, M.; LÓPES-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci Total Environ.** v. 249, p. 347-371, 2000.
- NELSON, H. M.; UCHES, M. A.; MEREDITH, P. A. Zinc, cooper and delta-aminolevulinic acid dehydratase *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology.**, v. 21, p. 261-266, 1981.
- NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chem Rev** v.104, 2004 in press.
- OTEIZA, P. I.; KLEINMAN, C. G.; DEMASI, M.; BECHARA, E. J. H. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 316, p. 607-611, 1994.
- ORTUNO, J.; ROS, G.; PERIAGO, M. J.; MARTINEZ, C.; LOPEZ, G.; RODRIGO, J. Nutritional importance of selenium] **Arch Latinoam Nutr.** V.47(1), v. 6-13, 1997.
- PAFFENBARGER, R. S.; HYDE, R. T.; WING, A. L.; HSIEH, C. C. Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni. **N Engl J Med**, v. 314, p. 605-613, 1986.
- PARKER, L. Antioxidantes y atletismo. Revision Temática. 1999. Rev. Antioxidante y Calidad de vida. Disponible na internet:

<http://www.antioxidantes.com.ar/12/art008.htm> Capturada em 16/01/20025.

PARNHAM, M. J.; LEYCK, S.; GRAF, E.; DOWLING, E. J; BLAKE, D. R. The pharmacology of ebselen. **Agents Actions**. V. 32(1-2), p. 4-9, 1991.

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

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

PERSEGHIN, G; PRICE, T. B; PETERSEN, K. F. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **N Engl J Med** v. 335, p. 3157-3162, 1996.

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

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

RAMASAMY, R.; TRUEBLOOD, N.; SCHAEFER, S. Metabolic effects of aldose reductase inhibition during low-flow ischemia and reperfusion. **Am. J. Physiol.** 275 (*Heart Circ. Physiol.* 44): p. 195–203, 1998.

- RICE, B; JANSSEN, I; HUDSON, R. Effects of aerobic or resistance exercise and/or diet on glucose tolerance and plasma insulin levels in obese men. **Diabetes Care** v. 22, p. 684-691, 1999.
- RIZVI, S. I. & ZAID, M. A. Intracellular reduced glutathione content in normal and type 2 diabetic erythrocytes: Effect of insulin and (-) epicatechin. **J. Physiol. and Pharmacol.** 52, p. 483-488, 2001.
- ROCHA, J. B. T.; FREITAS, A. J.; MARQUES, M. B.; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 26, 1077-1083, 1993.
- ROCHA, J. B. T; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; SOUZA, D. O. Effects of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicol.**, v. 100, 27-37, 1995.
- ROCHA, J. B. T; PEREIRA, M. E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus malacatus* (Pisces, Pimelodidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 94B, p. 65-69, 1989.
- RODRIGUES, A. L. S.; ROCHA, J. B. T.; PEREIRA, M. E.; SOUZA, D. O. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 57, p. 47-53, 1996.

SAITO, I.; ASANO, T.; TAKAKURA, K. Neuroprotective effect of antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurg.** v.42 (Suppl. 2), p. 269-277, 1998.

SANDVIK, L.; ERIKSEN, J.; THAULOW, E.; ERIKSEN, G.; MUNDAL, R.; RODAHL, K. Physical fitness as a predictor of mortality among healthy, middleaged Norwegian men. **N Engl J Méd** v. 328, p. 533-537, 1993.

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

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

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

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

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

SCHWARTZ K & FOLTZ C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **J Am Chem Soc** v. 79, 3292-3293, 1957.

SEN, C. K. Oxidants and antioxidants in exercise. **J Appl Physiol** v. 79, p. 675-686, 1995.

SENTURK, U., K.; GUNDUZ, F.; KURU, O.; AKTEKIN, M. R.; KIPMEN, D.; YALCIN, O.; BOR-KUÇUKATAY, M.; YESILKAYA, A.; BASKURT, O. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. **J Appl Physiol** v. 91, p. 1999–2004, 2001.

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

SHARMAN, E. H. & BONDY SH. Effects of age and dietary antioxidants on cerebral electron transport chain activity. **Neurobiol Aging**. v. 22(4), p. 629-634, 2001.

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

SIMONEAU, J. A.; LORTIE, G.; BOULAY, M. R. Effects of two high-intensity intermittent training programs interspaced by detraining on human skeletal muscle and performance. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. v. 56(5), p. 516-521, 1987.

SINGER, T. P & JOHNSON, M. K. The prosthetic groups of succinate dehydrogenase: 30 years from discovery to identification. **FEBS Lett** v.190 (2), p. 189-198, 1985.

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

SOLUIS, T.; SASTRA, S.; THALLAS, V.; MMORTENSEN, S.B.; WILKEN, M.; CLAUSEN, J.T.; BJERRUM O.J.; PETERSEN, H.; LAU, J.; JERUMS, G; BOEL, E.; COOPER, M.E. A novel inhibitor of advanced glycation end-products

formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. **Diabetologia**, v. 42, p. 472-479, 1999.

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

SOUZA, D. O. Effects of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology**, v. 100, 27-37, 1995.

STEFANICK, M. L.; MACKEY, S.; SHEEHAN, M.; ELLSWORTH, N.; HASKELL, W. L.; WOOD, P. D. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. **N Engl J Med** v. 339, p. 12-20, 1998.

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

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

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

- TAMAI, H.; SHIOI, Y.; SASA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. **Plant & Cell Physiol.**, v. 20, p. 435-444, 1979.
- TAPPEL, A. L. Lipid peroxidation damage to cell components. **Fed. Proc.** v. 32, p. 1870-1974, 1973.
- TERBLANCHE, S. E.; GOHIL, K.; PACKER, L. The effects of endurance training and exhaustive exercise on mitochondrial enzymes in tissues of the rat (*Rattus norvegicus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v. 128(4), p. 889-896, 2001.
- TESORIERE, L.; D'ARPA, D.; CONTI, S.; GIACCONE, V.; PINTAUDI, A. M.; LIVREA, M. A. Melatonin protects human red blood cells from oxidative hemolysis: new insights into the radical-scavenging activity. **J Pineal Res.** 27, p. 95-105, 1999.
- TIANO, L.; FEDELI, D.; SANTRONI, A.M.; VILLARINI, M.; ENGMAN, L.; TRUEBLOOD, N. & RAMASAMY, R. Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts. **Am. J. Physiol.** 275 (*Heart Circ. Physiol.* 44): p. 75-83, 1998.
- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 570, p. 167-178, 1979.
- URSINI, F & BINDOLI A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem Phys Lipids.** v. 44(2-4), p. 255-276, 1987.

VALLEE, B. L. & WACKER, W. E. C. Zinc, a component of rabbit muscle lactic dehydrogenase. **J Am Chem Soc.** v. 78, p. 1767-1771, 1956.

NEWLANDS, J. B. Studies of lactic dehydrogenases of heart. III. Action of inhibitors. **J Biol Chem.** v. 208, p. 225-230, 1954.

VLASSARA, H. Advanced glycation end products (AGEs) colocalize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. **Am. J. Phatol.**, v. 150, p. 523-539, 1997.

WALLBERG-HENRIKSSON, H.; GUNNARSSON, R.; HENRIKSSON, J.; DE FRONZO, R.; FELIG, P.; OSTMAN, J.; WAHREN, J. Increased peripheral insulin sensitivity and muscle mitochondrial enzymes but unchanged blood glucose control in type I diabetics after physical training. **Diabetes** v. 31, p. 1044-1050, 1982.

WALLBERG-HENRIKSSON, H.; GUNNARSSON, R.; ROSSNER, S.; WAHREN, J. Long-term physical training in female type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: absence of significant effect on glycaemic control and lipoprotein levels. **Diabetologia** v. 29, 53-57, 1986.

WEI, M.; GIBBONS, L. W.; KAMPERT, J. B.; NICHAMAN, M. Z. BLAIR, S. N. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. **Ann. Intern. Med** v. 132, p. 605-611, 2000.

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

WINGLER, K.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. **Biofactors** v.10, p. 245–249, 1999.

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

WOLFF, S. P.; DEAN, R. T. Monosaccharide autoxidation: a potential source of oxidative stress in diabetes? **Bioel. Bioen.**, v. 18, p. 283-293, 1987.

YKI-JARVINEN, H.; DEFRONZO, R. A.; KOIVISTO, V. A. Normalization of insulin sensitivity in type I diabetic subjects by physical training during insulin pump therapy. **Diabetes Care** v. 7, p. 520-527, 1984.

YAMAGUCHI, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K. Ebselen in acute ischemic stroke. **Am Heart Ass** v. 29, p. 12-17, 1998.

