



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Efeito da Faseolamina sobre parâmetros bioquímicos gerais e oxidativos
do coração de ratos diabéticos induzidos por STZ.**

Aluno: Renato José da Silva Oliveira

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientadores: Alberto da Silva Moraes

UBERLÂNDIA - MG

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeito da Faseolamina sobre parâmetros bioquímicos gerais e oxidativos do coração de ratos diabéticos induzidos por STZ.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do Título
de Mestre em Genética e
Bioquímica, Área Bioquímica.

Aluno: Renato José da Silva Oliveira

Orientador: Foued Salmen Espindola

Co-Orientadores: Alberto da Silva Moraes

UBERLÂNDIA - MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

O48e Oliveira, Renato José da Silva, 1984-
 Efeito da faseolamina sobre parâmetros bioquímicos gerais e
 oxidativos do coração de ratos diabéticos induzidos por STZ
 [manuscrito] / Renato José da Silva Oliveira. - 2010.
 85 f. : il.

 Orientador: Foued Salmen Espíndola
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

 Inclui bibliografia.

 1. Diabetes - Teses. 2. Glicemia - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 616.379-008.64

Palavras-chave: diabetes, estresse oxidativo, inibidor da alfa-amilase, colágeno tipo I, faseolamina.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Efeito da Faseolamina sobre parâmetros bioquímicos gerais e oxidativos do coração de ratos diabéticos induzidos por STZ

ALUNO: Renato José da Silva Oliveira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Examinadores: Dr. Rene de Oliveira Beleboni

Dra. Nádia Carla Cheik

Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Dr. Rubens Cecchini

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA - MG

2010

DEDICATÓRIA

A minha querida mãe, pelo total apoio, força,
compreensão e incentivo ao estudo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer a Deus por toda a serenidade e fé, fundamentais nesta etapa da minha vida

À toda a minha família pela força, entusiasmo, coragem transmitidos a mim a cada visita.

À minha mãe, meu maior exemplo de vida, pelo conforto dado em um momento de desespero, pelos preciosos conselhos. Obrigado por ser meu porto seguro em todas as horas.

À minha avó e meu irmão, por todas as orações carinho e paciência. Por saberem relevar a irritação de um aluno de mestrado que não conseguiu fazer seu experimento funcionar naquela semana.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, orientador desta dissertação, por ter acreditado e contribuído para que um grande sonho se realizasse.

Ao apoio do meu co-orientador, Prof. Alberto da Silva Moraes, sempre disposto a esclarecer dúvidas dando todo suporte para as análises histológicas.

A todos os meus amigos do Labibi e Labes: Ismail, Renata, Tatiane Vanessa, Neire, Leo Bruno, Leo Gomes, Artur, Alice, Miguel e Olga.

À Luciana Karen Calábria, pela amizade verdadeira e carinho . Obrigado por me fazer enxergar além do obstáculo, por me trazer calma nos momentos de desespero, por estar do meu lado sempre. Sou grato pelas idéias brilhantes, pelos feriados de trabalho e toda a confiança.

À minha grande amiga, parceira e co-orientadora, Vanessa Neves de Oliveira de Oliveira, agradeço pelos “empurrões” nos momentos mais difíceis desta etapa. Os finais de semana de trabalho árduo ficaram cada vez mais produtivos e

nossos objetivos mais próximos, graças a sua perseverança e entusiasmo. Obrigado pelos conselhos, orientação e principalmente pela amizade.

À minha companheira de bancada Simone, que se tornou uma grande amiga. Gostaria de agradecer as angustias compartilhadas e as comemorações de um experimento. Agradeço pela dupla formada e por me ensinar a ser paciente e confiar no êxito.

Aos meus amigos: Lígia, Deborah, Fran, Yalle, Ana Paula e Lara, Tati Tanabi e Tati Sartori, vocês desempenharam o importante papel de amigos e família. Tornou o final do dia mais descontraído, as noites mais especiais e me fizeram, ao menos por algumas horas, esquecer as dificuldades da vida. Muito obrigado a todos vocês.

À Deborah Cristina Rocha Fagundes por todo apoio no preparo, processamento e coloração histológica. Sua ajuda nesta etapa foi imprescindível.

Aos momentos de diversão, tristeza, angustia, reflexão e alegrias proporcionados pelos amigos Mariah e Pedro Paulo. Chegar neste momento seria muito difícil sem a presença de vocês.

Aos funcionários, coordenadores e professores do Instituto de Genética e Bioquímica.

Ao Prof. Antonio Vicente Mundim e ao técnico Felipe Cesar Gonçalves do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária pelo prontidão e dedicação a este trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de mestrado.

Sumário

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
1. DIABETES, COMPLICAÇÕES E ESTRESSE OXIDATIVO	3
1.1. DIABETES MELLITUS	3
1.1.1. SINALIZAÇÃO INSULÍNICA, REGULAÇÃO E METABOLISMO DA GLICOSE	4
1.1.2. ANTIDIABÉTICOS ORAIS	6
1.2. COMPLICAÇÕES CAUSADAS PELO DIABETES- CARDIOMIOPATIAS	8
1.3. DIABETES EXPERIMENTAL	11
1.4. RADICAIS LIVRES	13
1.4.1 FORMAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES	13
1.4.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E NITROGÊNIO (ERONS)	14
1.4.3 FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO FAVORECIDAS POR METAIS	16
1.4.4 MECANISMOS DE DEFESA ANTIOXIDANTES	17
1.5. ESTRESSE OXIDATIVO	22
1.5.1 ESTRESSE OXIDATIVO NO DIABETES	23
1.5.2 ATIVIDADE DA VIA DO POLIOL	24
1.5.3 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA - PFGA.	25
1.5.4 METABOLISMO E AÇÃO DO PFGA	26
1.5.5 ATIVAÇÃO DA VIA DA PROTEÍNA QUINASE C (PKC)	29
1.5.6 AUMENTO DO FLUXO PELA VIA DAS HEXOSAMINAS	30
1.6 REFERENCIAS	31
CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO	48
2.0. OXIDATIVE STRESS EVALUATION AND COLLAGEN TYPE I DEPOSITION IN HEART OF STZ- INDUCED DIABETIC RATS TREATED WITH PHASEOLAMIN.	50
2.1. ABSTRACT	51
2.2. INTRODUTION	53
2.3. MATERIAL AND METHODS	54
2.3.1. ANIMAL	54
2.3.2. INDUCTION OF DIABETES	55
2.3.3. GROUP DISTRIBUTION	55

2.3.4. COLLECTION OF SAMPLE -----	55
2.3.5. METABOLIC CONTROL PARAMETERS-----	55
2.3.6. HEART HOMOGENIZATION PROCEDURES -----	56
2.3.7. HISTOLOGY AND MEASUREMENT OF COLLAGEN -----	56
2.3.8. ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS -----	56
2.3.9. STATISTICAL ANALYSIS -----	57
2.4. RESULTS-----	57
2.5. DISCUSSION-----	59
2.6. ACKNOWLEDGEMENTS -----	63
FIGURES LEGENDS -----	64
FIGURE 1 -----	65
FIGURE 2 -----	65
TABLE-----	66
TABLE 1 -----	66
REFERENCES ² -----	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema representando as fases de secreção da insulina em um indivíduo sadio. Adaptado de Albuquerque, 2010.	4
Figura 2- Esquema simplificado da sinalização insulínica. Adaptado de Saltiel e Kahn, 2001.	5
Figura 3- Figura demonstrando o mecanismo de ação das glitazonas e como elas interagem com as adipocitocinas. Adaptada de Gomes, 2006.	8
Figura 4- Causas e contribuições dos danos ao coração de diabéticos. Adaptado de Marwick, 2008.	9
Figura 5- Esquema representado as reações de Fenton e de Haber-Weiss catalizadas por metais, como geradores de EROs. Adaptado de Ferreira, A. L. e Matsubara, L. S., 1997).	16
Figura 6- Efeito da hiperglicemia na via do poliol. Adaptado de Nussey, 2001. ...	24
Figura 7- Formação dos produtos finais de glicação avançada. Adaptado de Ahmed, 2005.	27
Figura 8- Descrição esquemática da formação de ligações cruzadas de colágeno, adaptado de Cerami, Vlassara <i>et al.</i> , 1987.	28
Figura 9 - Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia-induzida. Adaptado de Hadi e Suwaidi, 2007)	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio adenocorticotrófico
O₂- Oxigênio singlete
CAT- Catalase
DAG - Diacilglicerol
DE – Disfunção endotelial
DM - Diabetes Mellitus
DM1- DM tipo 1
DM2- DM tipo 2
DM1A- Diabetes melito tipo 1 auto-imune
eNOS- NOS endotelial
ERONs- Espécies reativas do oxigênio e nitrogênio
EROs- Espécies reativas de oxigênio
ET-1 – Endotelina 1
GFAT - Glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase
GLUT-4- Transportador de glicose tipo 4
GR- Glutathione redutase
GSH- Glutathione reduzida
GSH-Px- Glutathione peroxidase
GSSG- Glutathione oxidada
GPI- glicosilfosfatidilinositol
H₂O₂ -Peróxido de hidrogênio
HbA1c- Hemoglobina glicada
HNO₂- Ácido nitroso
HOCl- Ácido hipocloroso
HOONO- Peroxinitroso
IR- Receptor de insulina
IRS- Substrato do receptor de insulina
LDL- Lipoproteína de baixa densidade
LPO- Lipoperoxidação
Mn-SOD - Superóxido dismutase dependente de manganês
N₂O₃- Óxido nitroso

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NaOCl- Hipoclorito de sódio
NF- κ B - Fator Nuclear kappa β
NO $\cdot$ - Óxido nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato
NOS- Óxido nítrico sintase
O₂ - Oxigênio molecular
O₂⁻ - Radical ânion superóxido
OH $\cdot$ - Radical hidroxila
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PAI-1 - Inibidor do ativador do plasminogênio-1
PFGA- Produtos finais da glicação avançada
PI 3- Quinase- fosfatidilinositol 3-quinase
PKC- Proteína quinase C
PPAR-gama- Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
RO $\cdot$ - Radical alcóxila
ROO $\cdot$ - Radical peróxila
Se- Selênio
-SH- Grupamento sulfidrílicos
SOD- Superóxido dismutase
STZ- Estreptozotocina
TGF- β - Fator de crescimento de transformação beta
TNF- α - Fator de necrose tumoral
UDP- Uridina difosfato
VEGF- Fator de crescimento vascular derivado do endotélio
XO- Xantina oxidase

APRESENTAÇÃO

A linha de pesquisa, Diabetes e Estresse Oxidativo, implantada nos laboratórios de Bioquímica do Exercício e Saúde (LABES) e Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI) no ano de 2008, permitiu a realização de inúmeros estudos utilizando modelos animais diabéticos induzidos, possibilitando um maior entendimento desta patologia e suas complicações, contribuindo de modo direto ou indireto com os tratamentos convencionais e complementares. A equipe envolvida nesta linha de pesquisa é formada por pesquisadores com interesses diversos sobre o efeito agudo e crônico do diabetes em diversos tecidos (glândula parótida, cérebro, coração).

O diabetes *mellitus* é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, onde se destaca o estado hiperglicêmico, resultante de defeitos na ação e/ou secreção de insulina em indivíduos portadores de diabetes, a redução na ingestão energética e perda moderada de peso melhoram a resistência à insulina no músculo esquelético e a glicemia em curto prazo. A prolongada exposição a altas concentrações de glicose pode alavancar a produção de espécies reativas de oxigênio contribuindo, pois, para o surgimento de complicações, como cardiomiopatias. Assim, o tratamento do diabetes tem como objetivo o efeito normoglicêmico, a fim de reduzir e/ou prevenir os efeitos deste estado sobre o sistema neural, muscular, cardíaco e renal.

No capítulo I, construímos uma fundamentação teórica baseada no Diabetes *Mellitus*, suas complicações com ênfase nas cardiomiopatias e a íntima relação do desequilíbrio redox induzido pela doença. Além disso abordamos a formação dos radicais livres e terapias anti-hiperglicêmicas orais associadas ao tratamento convencional.

O capítulo II consiste em um artigo científico, que aborda a avaliação da glicemia, parâmetros bioquímicos e oxidativos, análise do conteúdo de colágeno do coração de ratos diabéticos induzidos por streptozotocina que receberam tratamento oral com faseolamina.

Capítulo 1- Fundamentação Teórica

1. Diabetes, complicações e estresse oxidativo

1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultante da deficiência na secreção de insulina e/ou da incapacidade da insulina exercer adequadamente seus efeitos. Além disso, o diabetes é uma enfermidade endócrino-metabólica que afeta mais de 30 milhões de pessoas em todo o mundo, apresentando como característica principal alguns sintomas como: poliúria, polidipsia, perda de peso, hiperglicemia, glicosúria, cetose e acidose (Rao, Padmanabhan *et al.*, 1992).

Estimativas apontam que, enquanto em 2000 havia 171 milhões de pessoas com diabetes no mundo, em 2030 esse valor atingirá 366 milhões. Neste cenário, o Brasil terá cerca de 11,3 milhões de diabéticos (Rathmann e Giani, 2004). De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) de 1998, a prevalência de diabetes auto-referido pela população idosa brasileira foi de 10,3%. (Lima-Costa, Barreto *et al.*, 2003). O diabetes, embora com menor prevalência se comparado a outras morbidades, é uma doença altamente limitante, podendo causar cegueira, amputações, nefropatias, complicações cardiovasculares e encefálicas, entre outras, que acarretam prejuízos à capacidade funcional, autonomia e qualidade de vida do indivíduo. Também é uma das principais causas de mortes prematuras, em virtude do aumento do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, as quais contribuem para 50% a 80% das mortes dos diabéticos (Schaan, Harzheim *et al.*, 2004). Esses dados elucidam o impacto do alto custo social e financeiro do diabetes ao sistema de saúde, à família e à pessoa portadora da doença.

1.1.1. O diabetes pode ser classificada em DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos específicos (Diabetes, 2002). O DM1, foco do nosso trabalho, ocorre devido à destruição das células beta pancreáticas por razões não conhecidas e que acomete 5% a 10% do total de casos de diabetes mellitus. O desencadeamento rápido da

doença é mais freqüente em crianças e adolescentes, já em adultos se manifesta de forma lenta e progressiva sendo referida como diabetes latente auto-imune do adulto. Na maioria dos casos, esta destruição é auto-imune e constitui o subgrupo de diabetes denominado de tipo 1A (DM1A) podendo apresentar-se isolado ou associado a outras endocrinopatias auto-imunes. Sinalização insulínica, regulação e metabolismo da glicose

Produzido pelas células beta do pâncreas, o hormônio anabólico, insulina, tem sua síntese desencadeada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Após sua liberação acontece o aumento da captação de glicose pelos tecidos corpóreos, aumento na síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, redução da lipólise, proteólise e produção hepática de glicose (Saad e Zecchin, 2008).

A secreção insulínica ocorre em duas fases: A primeira fase necessária para inibir a produção de glicose hepática e utilizar a glicose proveniente de refeições; enquanto que a segunda fase auxilia na manutenção basal dos níveis de glicemia (figura 1).

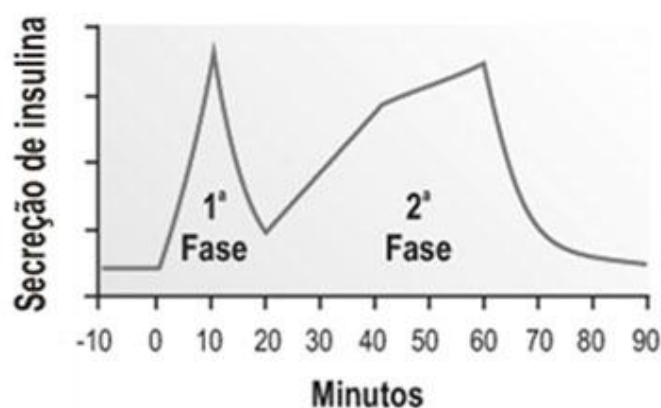


Figura 1- Esquema representando as fases de secreção da insulina em um indivíduo sadio. Adaptado de Albuquerque, 2010.

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua

como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor de insulina (IR) (Pessin e Saltiel, 2000). Uma vez ativado, o IR fosforila os resíduos de tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS). Os IRS criam sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia 2 de Src 2 (SH2), dentre as quais se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) (White, 1998). Tais vias de transdução de sinal levam a ações metabólicas como a translocação de algumas vesículas contendo transportadores de glicose tipo 4 (GLUT-4), transcrição de genes específicos para o crescimento e diferenciação celular (Figura 2).

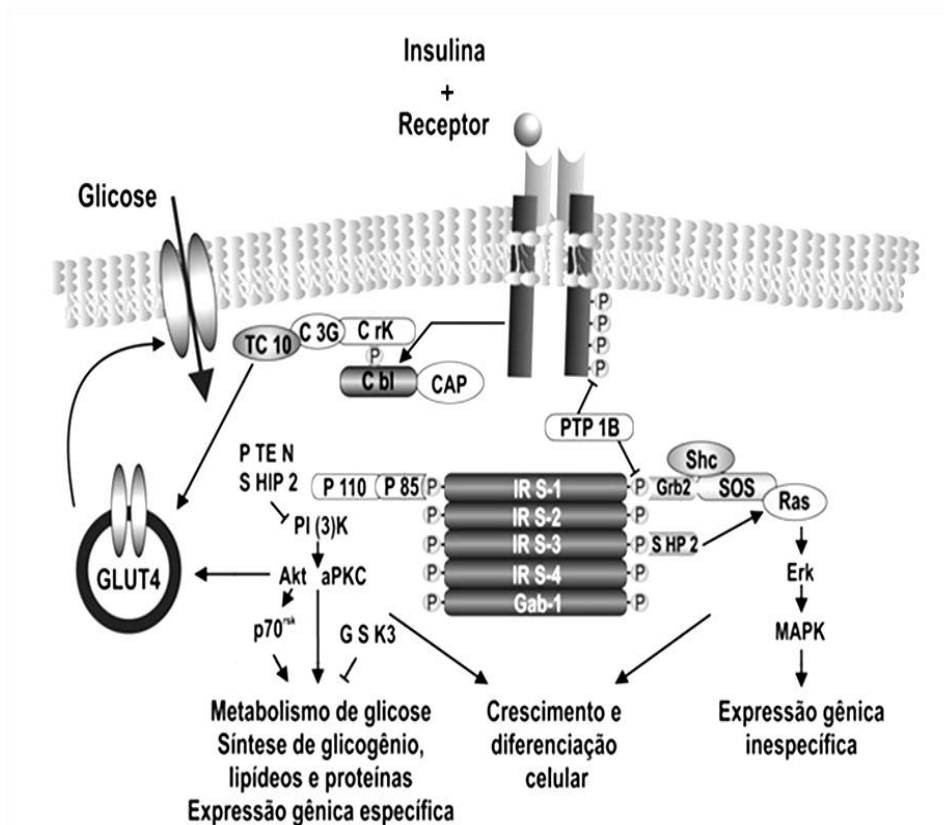


Figura 2- Esquema simplificado da sinalização insulínica. Adaptado de Saltiel e Kahn, 2001.

Em condições fisiológicas, a concentração plasmática de glicose se encontra constante, o que garante suprimento adequado de nutrientes a todos os tecidos corpóreos. O controle do metabolismo da glicose é conduzido por sistemas hormonais envolvendo a insulina (hormônio hipoglicemiante), o glucagon (hormônio hiperglicemiante) e o hormônio do crescimento (inibidor da captação de glicose plasmática pelas células).

1.1.2. Antidiabéticos orais

De forma geral podemos dizer que os antidiabéticos orais são substâncias que têm a finalidade de diminuir e/ou manter a glicemia normal (jejum <100mg/dL e pós-sobrecarga <140mg/dL). Os antidiabéticos orais podem atuar na redução da velocidade de absorção de glicídios (inibidores da α -glicosidases), produção hepática de glicose (biguanidas), no aumento da sua utilização periférica (glitazonas) e no incremento da secreção pancreática de insulina (sulfoniluréias e glinidas). Além disso, podem ser classificados em duas categorias: anti-hiperglicemiantes (não aumentam a secreção de insulina) e hipoglicemiantes (aumentam a secreção da insulina) (Albuquerque e Netto, 2010).

Os tratamentos com drogas capazes de inibir a atividade da α -glicosidases estão associados a dietas, outros antidiabéticos, e até mesmo ao uso de insulina (Van De Laar, Lucassen *et al.*, 2005). O mecanismo de ação destas drogas se baseia na redução da digestão de carboidratos, devido à inibição competitiva de algumas glicosidases, como a glicoamilase, sacarase, isomaltase e a maltase. Os inibidores comercialmente mais utilizados são a acarbose, voglibose e miglitol (Faure, Pallardo *et al.*, 2002; Shen, Sun *et al.*, 2009). Pesquisas mostram que a associação entre acarbose e sulfonilureias leva a uma redução da glicose pós-prandial em cerca de 54mg/dL, e de hemoglobina glicada (HbA1c) em torno de 0,4 – 0,6 % (Clissold e Edwards, 1988), além disso, controlam o peso corpóreo e a pressão sanguíneas destes pacientes (Calle-Pascual, Garcia-Honduvilla *et al.*, 1995).

A biguanida (e.x. metformina) é um agente anti-hiperglicemiante usado para diminuir a glicemia, e conseqüentemente, melhorar o controle metabólico do paciente diabético. A redução dos níveis glicêmicos ocorre mediante inibição da

gliconeogênese, e na presença de insulina, estimula a captação de glicose periférica pelos tecidos, principalmente músculos esqueléticos. O tratamento com este medicamento também diminui a absorção de glicose pelo trato gastrointestinal, entretanto seu efeito direto sobre as células beta não é bem compreendido. Entretanto estudos mostram que a metformina reduz os níveis de HbA1c, melhorando o perfil lipídico e a atividade fibrinolítica (Bailey, 1999; Fisman, Tenenbaum *et al.*, 2004). Em contrapartida, algumas pesquisas também mostram que altas doses de metformina não diminuem a hiperglicemia e aumentam os riscos cardiovasculares (Fisman, Tenenbaum *et al.*, 1999; Bailey, Bagdonas *et al.*, 2005).

As glitazonas (e.x. rosiglitazona e pioglitazona) melhoram a resistência insulínica, no tecido adiposo, músculo e fígado (Figura 3). As glitazonas são agonistas PPAR-gama que melhoram a sensibilidade insulínica. Estas drogas induzem à transcrição de genes relacionados ao metabolismo glicídico e lipídico e à expressão de proteínas inflamatórias e endoteliais associadas com o processo aterosclerótico, resultando em melhora da função endotelial (Gomes, 2006).

Este medicamento tem efeito sobre o tecido adiposo resultando no aumento da sensibilidade à insulina, diminuição dos ácidos graxos livres (cerca de 25%), além de aumentar a concentração sérica de adiponectinas no tecido muscular e fígado (Martens, Visseren *et al.*, 2002). As glitazonas reduzem os níveis celulares de TNF- α , que fosforila os resíduos de serina ao invés de tirosina, o primeiro mensageiro da via de transmissão de sinal da insulina, restringindo a transdução do sinal. A exposição prolongada de pacientes a droga pode causar o aumento da lipólise e conseqüente liberação aumentada de ácidos graxos livres, induzindo a quadros de lipotoxicidade, prejudicando a secreção de insulina (Bajaj, Suraamornkul *et al.*, 2004).

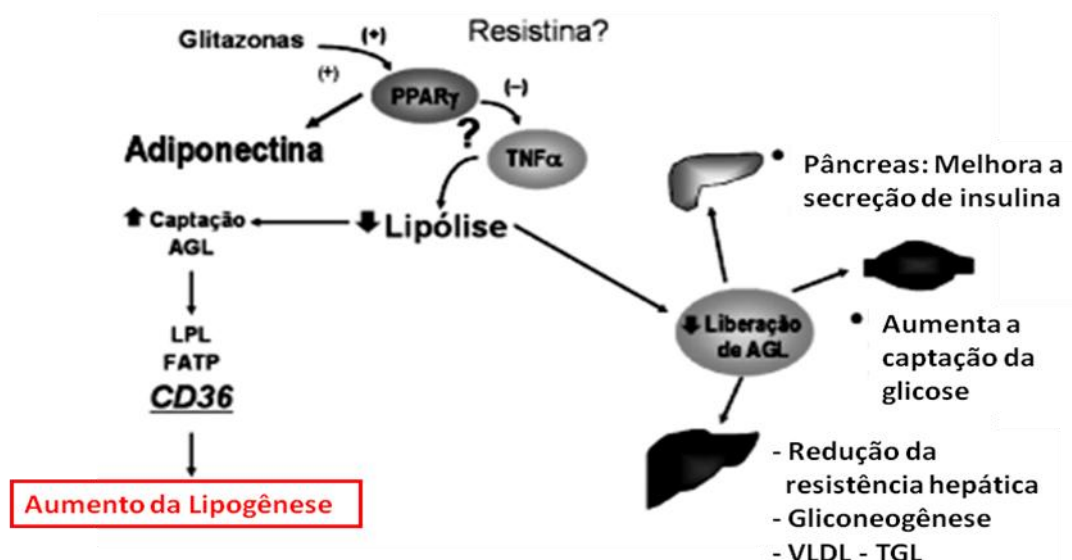


Figura 3- Figura demonstrando o mecanismo de ação das glitazonas e como elas interagem com as adipocitocinas. Adaptada de Gomes, 2006.

1.2. Complicações causadas pelo diabetes- cardiomiopatias

O DM é responsável por grandes alterações no sistema vascular, levando ao desenvolvimento de complicações como disfunção endotelial, inflamações e remodelamento vascular (Fisher, 2004) (Figura 4). As miocardiopatias diabéticas são resultantes de complexas relações entre as anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas consequências celulares, levando à alteração da estrutura e função miocárdica. (Poornima, Parikh *et al.*, 2006). Os três distúrbios metabólicos comuns ao diabetes são: hiperlipidemia (geralmente na forma de aumento de triglicérides e de ácidos graxos livres), hiperinsulinemia nas fases mais precoces e, após falência das células beta-pancreáticas, hiperglicemia. De forma geral o aumento sérico de lipídeos, insulina e glicose induzem alterações na ativação de fatores de transcrição celular dos miócitos cardíacos modificando a expressão gênica e interferindo na utilização miocárdica de substratos, disfunção endotelial e aumento da rigidez miocárdica (Hayat, Patel *et al.*, 2004)

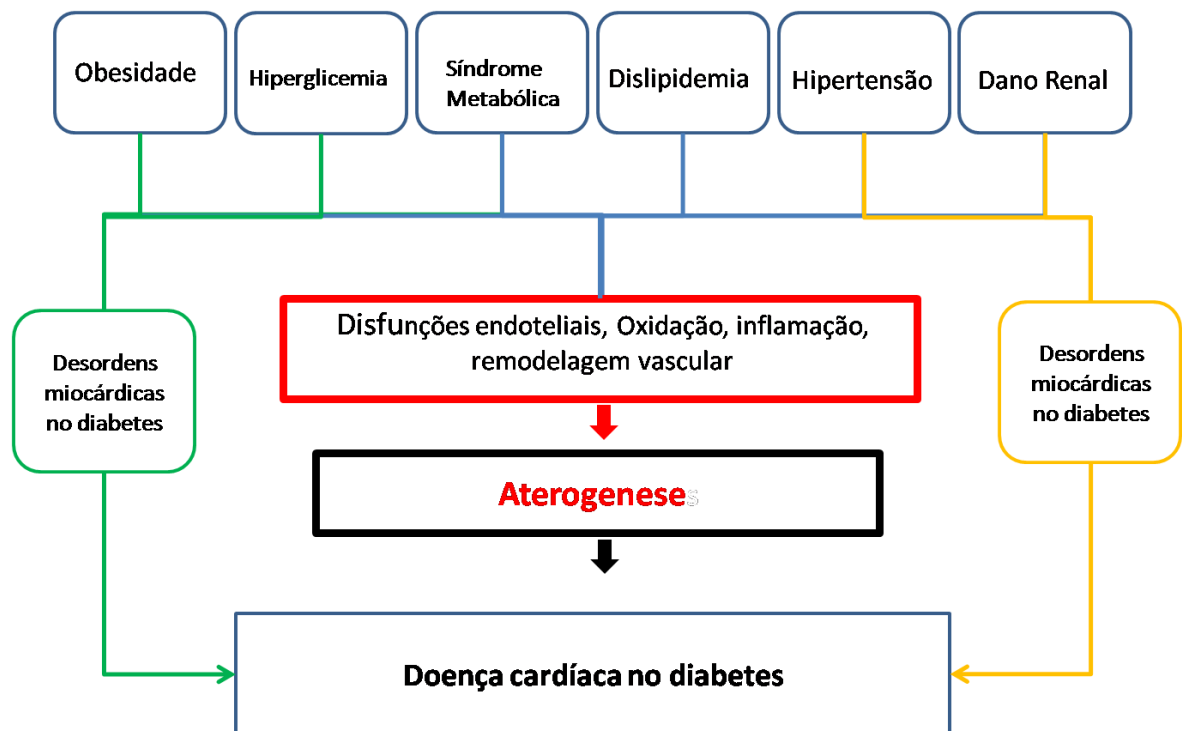


Figura 4- Causas e contribuições dos danos ao coração de diabéticos.
Adaptado de Marwick, 2008.

Durante várias décadas estudos apontaram a insuficiência cardíaca como intimamente associada ao DM (Coughlin, Pearle *et al.*, 1994). A hiperglicemia associada ao DM ativa a via do poliol, das hexosaminas, proteína quinase C (PKC) e aumenta os produtos finais de glicação avançada (PFGA). O excesso de glicose é direcionado para a via da hexosamina, cujo produto final, o UDP-N-acetil-glicosamina, atua como substrato para a glicosilação de proteínas intracelulares. A hiperativação desta via prejudica a atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Essig e Nosek, 1997). Outros mecanismos aterogênicos também parecem estar envolvidos na fisiopatologia da doença cardíaca associado ao diabétes, como a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), disfunção endotelial e estresse oxidativo, levando ao desencadeamento da cardiomiopatia (Chakravarti e Dhawan, 1991).

Em pacientes com DM, é bem comum a hipertrofia do ventrículo esquerdo, um fator de risco para a insuficiência cardíaca, e que pode ocorrer

independentemente de alterações na pressão arterial do paciente (Aneja, Tang *et al.*, 2008). Estas alterações são comprovadas pela hipótese que mudanças geométricas no miocárdio em pacientes diabéticos não são um dano inicial, mas sim uma consequência do diabetes que, a longo prazo, está associado a hiperglicemia e/ou obesidade (Eguchi, Boden-Albala *et al.*, 2008).

A obesidade associada ao DM2 está frequentemente ligada com a lipotoxicidade do miocárdio, podendo levar a morte celular, gerando uma disfunção cardíaca (Wende e Abel, 2010). Alguns estudos já demonstraram a presença de grânulos ou depósitos de lipofuscina em biopsias do ventrículo esquerdo, além de detectarem o aumento de triglicérides e colesterol em pacientes DM2 (Regan, Lyons *et al.*, 1977; Borradaile e Schaffer, 2005). A associação de fatores como o diabetes, obesidade e resistência a insulina estão coligados ao aumento intra-miocárdico de lipídeos, resultando na disfunção diastólica do coração (McGavock, Lingvay *et al.*, 2007). Mudanças estruturais também são identificadas no miocárdio de diabéticos, tais alterações incluem o aumento do espaço extracelular, fibrose, atrofia e apoptose (Fang, Prins *et al.*, 2004).

Anormalidades sistólicas, mesmo sendo de difícil investigação em humanos, têm sido utilizadas para evidenciar disfunções miocárdicas em modelos animais (Marwick, 2008). Contudo, processos inflamatórios intramiocárdicos aumentam a expressão do fator de necrose tumoral (TNF- α) e fibrose miocárdica. O TNF- α é conhecido por reduzir a contratilidade dos miócitos, e por aumentar a fibrose tecidual, o que pode levar a falência cardíaca. Pesquisas demonstram que o tratamento com inibidor da síntese de TNF- α diminui significativamente a inflamação intramiocárdica em modelos experimentais diabéticos (Westermann, Van Linthout *et al.*, 2007).

Um estudo sugere algumas hipóteses para explicar a relação entre o estresse oxidativo e o surgimento das disfunções vasculares (Yung, Leung *et al.*, 2006):

- 1 – Redução da biodisponibilidade nas concentrações de óxido nítrico (NO $\cdot$);
- 2- Alterações no mecanismo de vasodilatação endotélio-dependente podendo prejudicar o crescimento das células endoteliais;

- 3- Desencadeamento de mecanismos apoptóticos;
- 4- Estimulação das células endoteliais;
- 5-Ativação das moléculas de adesão e reação inflamatória, que levam à disfunção endotelial inicialmente desenvolvendo a hipertensão e aterosclerose.

A relação entre DM1 e doença cardiovascular é bastante conhecida e tem sido atribuída à associação entre hiperglicemia crônica, disfunção endotelial (DE) e inflamação crônica (Schram, Chaturvedi *et al.*, 2003). Alguns estudos já demonstraram que a hiperglicemia crônica é um importante preditor de complicações micro e macrovasculares (Nathan, Cleary *et al.*, 2005). A disfunção endotelial tem sido sugerida como um evento precoce na patogênese das complicações vasculares do DM1, refletindo na presença de um fenótipo propenso a aterogênese indicando altos riscos de desenvolvimento da aterosclerose. A aterosclerose é um processo intimamente relacionado com uma resposta inflamatória crônica da parede arterial, iniciada por uma lesão do endotélio, cuja progressão é mantida pela interação entre as lipoproteínas modificadas, macrófagos derivados de monócitos, linfócitos T e constituintes celulares normais da parede arterial. (Stocker e Keane, 2004). Algumas hipóteses são formuladas para explicar os processos envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose. A hipótese da resposta à injúria considera a lesão vascular o evento inicial da aterosclerose. Em contrapartida, a teoria da resposta à retenção afirma que a interação entre as lipoproteínas e a matriz é o ponto crítico da aterosclerose, enquanto que a hipótese da modificação oxidativa ressalta a importância da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) como o principal fator desencadeante da doença. (Rubbo, Batthyany *et al.*, 2000; Heinecke, 2003). Embora as diferentes teorias direcionem mecanismos diversos para explicar a aterosclerose, existem pontos comuns, como por exemplo, o envolvimento da inflamação e a LDL como partícula central no processo.

1.3. Diabetes experimental

O diabetes experimental pode ser induzido em animais, por vários mecanismos. E na grande maioria dos métodos, o agente utilizado como indutor não é capaz de desenvolver algumas particularidades da fisiopatologia do diabetes humano. Os principais mecanismos de produção de diabetes são: estresse, infecções, toxinas, ou manipulações, incluindo a pancreatectomia;

lesões do sistema nervoso central; uso de hormônios anti-insulínicos; exposição à hidrocortisona ou ACTH; indução por vírus e o uso de agentes químicos beta-citotóxicos. (Lerco, Spadella et al., 2003). A pancreatectomia total, utilizada para obtenção de diabetes experimental, se assemelha ao diabetes quimicamente induzido pela aloxana e estreptozotocina (Slezak e Andersen, 2001). A utilização desses métodos de ressecção, entretanto, tem sido restrita por depender necessariamente de um procedimento cirúrgico adicional.

Outro estudo demonstrou a capacidade de indução à hiperglicemia, por meio da exposição à hidrocortisona e hormônio adrenocorticotrófico. Os eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos do diabetes, assim induzido, são, contudo, muito variáveis (Kern e Logothetopoulos, 1970). No caso de utilização de modelos virais para o diabetes experimental, relacionados aos vírus RNA, além de se constituírem em risco potencial para o experimentador, tem ainda papel incerto na patogênese da doença.

No geral, os modelos animais utilizados no estudo do DM auxiliam no esclarecimento dos sintomas, causas, consequência e tratamento desta doença. Atualmente é amplamente utilizado e aceito o modelo experimental caracterizado pela destruição auto-imune das células beta do pâncreas utilizando Estreptozotocina (STZ) ou Aloxana. Outra abordagem mais recente utiliza animais transgênicos como ferramenta de pesquisa para a descoberta e o desenvolvimento de novos tratamentos para o diabetes, a fim de elucidar condições similares as que ocorrem em humanos (Pickup, 1997). A utilização do STZ em modelos experimentais conquistou as pesquisas com o diabetes, pois atua diretamente na indução da morte das células beta do pâncreas. Em ratos o STZ é citotóxico para as células beta pancreáticas em uma única dose (50 a 100 mg/Kg (Aughsteen, 2000). Por outro lado o tratamento com baixas doses de STZ (40 mg/Kg) demonstrou uma infiltração inflamatória, rica em linfócitos (Insulites) no parênquima das ilhotas pancreáticas, após seis dias da administração da droga. Além da ação citotóxica nas células betas, sugere-se que a STZ atue por uma mecanismo imune, através da estimulação de macrófagos.(Aughsteen, 2000).

O STZ é capaz de induzir diabetes, assim como a Aloxana, pois destroem as membranas celulares e induzem a quebra do DNA, levando a ativação da

enzima poli (ADP-ribose) sintase e uma depleção acentuada da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+). A poli-ADP-ribose sintase necessita de NAD^+ para realizar o reparo do DNA. Assim, o aumento na sua atividade pode levar à depleção do NAD^+ intracelular, o que impossibilita a produção de insulina. Os fatos citados podem ser prevenidos através da administração de nicotinamida e picolinamida, reestabelecem os níveis de NAD^+ intracelular e produção de insulina (Yamamoto, Uchigata *et al.*, 1981).

1.4. Radicais livres

1.4.1 Formação dos radicais livres

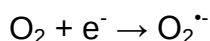
Os radicais livres são caracterizados por qualquer átomo ou molécula ou fragmento de molécula que possua um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (Halliwell e Gutteridge, 1999). A configuração química instável atribuí aos radicais livres uma vida curta e alta reatividade. Os radicais livres podem ser formados pela perda de um elétron ou pelo ganho de um elétron por um não-radical. Além disso, ainda podem se originar quando uma ligação covalente é quebrada, ou seja, se cada um dos átomos ficarem com um elétron, que é o que acontece no processo de fissão homolítica. A interação com outras moléculas acontece através de reações de oxi-redução estabilizando a molécula reativa e originando outros radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1999). Estes radicais livres e demais moléculas que surgem neste processo oxidativo são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs). Como exemplos de radicais livres temos: oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical peroxila ($\text{ROO}^\cdot$), radical alcoxila ($\text{RO}^\cdot$) e $\text{NO}^\cdot$ (Aruoma, 1994; Yu, 1994). Destes radicais livres, o $\text{OH}^\cdot$ e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ são os que têm maior importância biológica, pois são formados durante o processo normal ou exacerbado de redução do O_2 .

Nos organismos aeróbios, a maioria das EROs são produzidas na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, na qual 95 a 98% do oxigênio consumido pelo corpo é reduzido a água e cerca de 2 a 5% deste oxigênio pode sofrer redução univalente sequencial e formar ânions superóxidos $\text{O}_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e $\text{OH}^\cdot$ (Fridovich, 1979; Halliwell e Cross, 1994; Halliwell e

Gutteridge, 2006). Outras fontes são atribuídas ao surgimento de EROs, como o caso da produção pelos peroxissomos ou até mesmo pelo sistema xantina oxidase (XO) e NOS, a produção de EROs por estas estruturas e enzimas ainda não estão bem definidos (Yu, 1994).

1.4.2 Principais espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERONs)

Ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) – O ânion radical superóxido, é formado pela redução da molécula de oxigênio, O_2 , por um único elétron.



O $O_2^{\cdot-}$ ocorre em quase todas as células aeróbicas, além de ser produzido durante a ativação e estimulação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. O superóxido produzido pelos fagócitos através da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), é um bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, porém gera produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), H_2O_2 e peroxinitrito ($ONOO^-$) que são os principais responsáveis pelo combate a elementos estranhos ao organismo (Babior, 2004).

Na cadeia de transporte de elétrons o O_2 age como uma molécula aceitadora de elétrons e se reduz a H_2O . No entanto, sob determinadas condições, o O_2 aceita apenas um elétron, formando $O_2^{\cdot-}$. Esta redução anômala ocorre especialmente em nível das enzimas fumarato redutase (Imlay, 1995) e NADH desidrogenase e em flavoproteínas (Messner e Imlay, 1999). Além de interagirem com proteínas de armazenamento como as ferro-sulfoproteínas, o $O_2^{\cdot-}$ também reage com o radical $HO\cdot$ produzindo oxigênio singleto ($^1O_2$) e com o $NO\cdot$ produzindo o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Babior, 2000). O contrário acontece quando $O_2^{\cdot-}$ atua como molécula antioxidante, como a redução das semiquinonas que restabelecem atividades metabólicas celulares. Um exemplo clássico é a redução da ubiquinona para ubiquinol, no interior da mitocôndria (Babior, 2000).

Radical hidroxila ($OH\cdot$) – Considerada uma EROs muito reativa em sistemas biológicos, é formada no organismo principalmente pela homólise da água por exposição à radiação ionizante e reação de H_2O_2 com metais de transição, tais como o ferro e o cobre (reação de Fenton); interação de H_2O_2 com o $O_2^{\cdot-}$ (reação

de Haber-Weiss); e dissociação da forma protonada do ONOO^- resultante da reação de $\text{NO}^\bullet$ com o $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Beckman, J. S., Beckman, T. W. *et al.*, 1990; Yu, 1994). Esta variedade de radical livre combina-se rapidamente com metais e outros radicais confirmando sua alta reatividade, podendo exercer ações citotóxicas, dano celular por radiação ionizante e destruição de microorganismos por fagócitos ativados (Kleinveld, Swaak *et al.*, 1989). Quando o $\text{OH}^\bullet$ é produzido próximo ao DNA e este estiver fixado à um metal, poderá ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA (Ferreira, A. L. A. e Matsubara, L. S., 1997).



Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) – é forma mais deletéria do oxigênio, pois é a causa intermediária da toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos. O O_2 apresenta dois elétrons emparlhados que podem estar num mesmo orbital ou em orbitais diferentes. O O_2 pode ser gerado diretamente pela reação do H_2O_2 com hipoclorito de sódio (NaOCl) (Schweitzer e Schmidt, 2003) ou indiretamente pela transferência de energia de uma moléculas excitada por luz visível ou ultravioleta. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois choca-se com as moléculas de H_2O transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto. Porém, em meio orgânico, a meia-vida do O_2 é maior e pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do O_2 . Assim, esta espécie química pode transferir energia para moléculas vizinhas, resultando em danos às estruturas celulares (Karlsson, 1997).

Espécies reativas de nitrogênio (ERNs) – As espécies reativas formadas a partir do nitrogênio são: $\text{NO}^\bullet$, óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e ONOO^- . O $\text{NO}^\bullet$ é um gás inorgânico, eletricamente neutro, que apresenta um elétron não pareado em seu último orbital eletrônico, sendo por definição um radical livre (Karlsson, 1997). Ao contrário das EROs, o $\text{NO}^\bullet$ e ONOO^- não possuem uma enzima antioxidante específica, sendo suas concentrações reguladas pelos níveis de antioxidantes não enzimáticos (Rao, Padmanabhan *et al.*, 1992; Kooy, Royall *et al.*, 1997).

O NO[•] é consideravelmente menos reativo que o radical [•]OH, entretanto, a interação do NO[•] com o O₂^{•-} resulta na produção de ONOO⁻ que em pH celular pode ser protonado dando origem ao peroxinitroso (HOONO), (Beckman, J.S., Beckman, T.W. *et al.*, 1990; Radi, Beckman *et al.*, 1991). Além disso, o NO[•] é considerado um sinalizador intracelular com inúmeras funções biológicas, como é caso dos vasos sanguíneos, onde a formação contínua de NO pelas células endoteliais promove o relaxamento da musculatura lisa, produzindo vasodilatação (Bredt, 1999), e ativação de células satélites que respondem ao estímulo muscular em exercícios físicos, promovendo o aumento da musculatura (Wozniak e Anderson, 2007).

1.4.3 Formação de espécies reativas de oxigênio favorecidas por metais

O papel dos metais na formação *in vitro* das EROs é confirmado pelas reações de Fenton e de Haber – Weiss. Embora o cobre (Cu) possa catalisar a reação de Haber – Weiss, o ferro (Fe) é o metal pesado mais abundante no organismo e está biologicamente adequada para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas. As EROs podem ser geradas a partir das reações de Fenton e Haber – Weiss (Figura 5).

Reação de Fenton: (equações 2-4)
$\text{Fe}^{++} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Fe}^{+++} + \text{O}_2^{\cdot-}$ (Equação 2)
$2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Equação 3)
$\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{OH}^- + \text{OH}^{\cdot}$ (Equação 4)
Reação de Haber – Weiss: (equações 5-7)
$\text{Fe}^{+++} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightleftharpoons \text{Fe}^{++} + \text{O}_2$ (Equação 5)
$\text{Fe}^{++} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{OH}^- + \text{OH}^{\cdot}$ (Equação 6)
$\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^- + \text{OH}^{\cdot}$ (Equação 7)

Figura 5- Esquema representado as reações de Fenton e de Haber-Weiss catalizadas por metais, como geradores de EROs. Adaptado de Ferreira, A. L. e Matsubara, L. S., 1997).

1.4.4 Mecanismos de defesa antioxidantes

A definição de antioxidante é toda e qualquer molécula que quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato (Halliwell e Cross, 1994). Assim, as EROs e outras espécies reativas, são constantemente inativadas através de diferentes mecanismos, de forma a impedir reações de propagação.

Em organismos aeróbicos, a principal defesa contra as EROs, são os compostos e enzimas com capacidade antioxidante (Frei, Stocker *et al.*, 1988). Estas moléculas antioxidantes são capazes de competir com outros substratos pela oxidação sofrida pelos radicais livres e, assim, evitar ou diminuir os danos causados a proteínas, DNA e lipídeos (Droge, 2002). Esse sistema de defesa pode ser dividido em quatro grupos:

- I- Antioxidantes nutricionais como ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e o betacaroteno (vitamina A);
- II- Antioxidantes enzimáticos como o superóxido dismutase (SOD); as catalases (CAT); glutathione redutase (Kouoh, Gressier *et al.*) e a glutathione peroxidase (GSH-Px);
- III- Antioxidantes solúveis como glutathione, ácido úrico, albumina, haptoglobina e hemopexina;
- IV- Sequestradores de metais de transição como transferrina, lactoferrina, ferritina, albumina e ceruloplasmina.

Dentre todos esses, os antioxidantes solúveis são os de maior concentração no sangue circulante ou nos fluídos intersticiais, podendo agir neutralizando diretamente os radicais livres ou através da participação de sistemas enzimáticos (Kouoh, Gressier *et al.*, 1999).

Antioxidantes nutricionais

Entre os antioxidantes nutricionais, as vitaminas E e C possuem maior importância e destaque, pois a vitamina C tem ação removedora “scavengers” e também regeneradora de vitamina E. A vitamina C como é hidrossolúvel possui ação maior no plasma sanguíneo, enquanto que a vitamina E tem ação maior em

membranas celulares, por ser lipossolúvel (Wefers e Sies, 1988; Sies e Murphy, 1991). O alfa-tocoferol inativo reage com o O_2 e pode, portanto, proteger a membrana contra essa espécie. Durante sua ação antioxidante atua destruindo a cadeia de lipoperoxidação nas membranas, o alfa-tocoferol é consumido e convertido em forma de radical (Halliwell e Gutteridge, 1989).

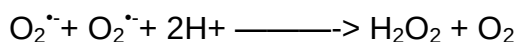
A vitamina E, localizada próxima do citocromo P-450 no fosfolípido da membrana, elimina os radicais livres formados no citocromo P-450 e a vitamina C reduz o radical tocoferil (forma oxidada da vitamina E), comprovando a poderosa ação imunoestimulante da vitamina C (Halliwell e Gutteridge, 1989).

A vitamina C pura é sólida, branca, cristalina e muito solúvel em água. Plantas e animais podem sintetizá-la, com exceção de humanos, primatas e cobaias, que necessitam obtê-la através da dieta. Esta é necessária *in vivo* como cofator de várias enzimas, sendo as mais conhecidas a prolina-hidroxilase e a lisina-hidroxilase, envolvidas na biossíntese do colágeno. A vitamina C também age como agente redutor (doador de elétrons) e participa da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (Halliwell e Gutteridge, 1989).

A vitamina A ajuda diminuir a formação do O_2 *in vivo* e remover aqueles já formados (Halliwell e Gutteridge, 1989). Esta vitamina possui pouca ação antioxidante, e, é incapaz de agir sobre o O_2 , mas seu precursor, o beta-caroteno, é o mais eficiente ligante desta forma reativa de oxigênio encontrada na natureza e pode agir como antioxidante. O beta-caroteno, um pigmento presente em todas as plantas, pode ser encontrado em membranas celulares, inclusive nos lipossomos (Machlin e Bendich, 1987).

Antioxidantes enzimáticos

A SOD, presente na quase totalidade dos organismos eucarióticos é específica na remoção do $O_2^{\cdot-}$, catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 através da seguinte reação:



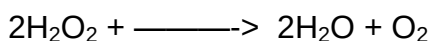
Em humanos, os membros da família destas enzimas ou são diméricas: SOD1 - 32 kDa (Mccord e Fridovich, 1969); ou tetraméricas: SOD2 - 89 kDa, (Mccord, 1976), SOD3 - 135 kDa (Marklund, 1984). Também são conhecidas

devido à ação vinculada á íons metálicos, ou seja, a classe Cu, Zn-SOD e Mn-SOD ou a classe Fe-SOD, presente em células procariotas e em algumas plantas. As superóxidos dismutase dependentes de cobre, zinco e manganês atuam como um dos principais agentes antiinflamatórios eliminando os $O_2^{\bullet-}$ (Hernandez-Saavedra, Zhou *et al.*, 2005). As SOD que contêm cobre e zinco (CuZn-SOD) está presente 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 (Halliwell, 1996).

A glutathione (L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) é uma molécula muito abundante em células de mamíferos e sua principal função é reverter a ação citotóxica causada pelos radicais livres, sendo sintetizada inicialmente no compartimento citoplasmático, além de ser utilizada fisiologicamente em outros tecidos ou pelas diferentes estruturas celulares, como o núcleo, matriz mitocondrial, e espaços extracelulares (Sies, 1999). A família das GSH-Px remove H_2O_2 acoplando sua redução à água com a oxidação da glutathione reduzida (GSH). Também as enzimas GSH-Px podem agir sobre outros peróxidos além do H_2O_2 . Elas contêm selênio (Se) no sítio ativo e são vastamente distribuídas nos tecidos animais (Halliwell e Gutteridge, 1999). A glutathione é um tripeptídeo de baixo peso molecular contendo um grupo tiol e é substrato para a GSH-Px. A glutathione oxidada (GSSG), resultante da reação catalisada pela GSH-Px, é reduzida pela GR que utiliza NADPH para catalisar a reação. Em portadores de DM, mesmo aqueles que não apresentam complicações decorrentes desta doença, os níveis de GSH nos eritrócitos é menor, possivelmente causado pelo estresse oxidativo e pela diminuição da atividade da glutathione reductase (Lu, 2009).

A CAT é dependente de ferro e remove duas moléculas de H_2O_2 formando duas moléculas de H_2O e uma de O_2 (Nordberg e Arner, 2001).

Reação catalisada pela CAT:



Experimentos têm sido realizados para avaliar a competição entre as enzimas CAT e GSH-Px em eritrócitos. Segundo alguns autores, quando o H_2O_2 está presente em baixas concentrações (condições fisiológicas normais), a GSH-Px é que se encarrega de transformá-la em água (Cohen e Hochstein, 1963; Sinet, Michelson *et al.*, 1975). Tentando estabelecer a importância da CAT eritrocitária, Scott e colaboradores, usaram células humanas normais e acatalassêmicas para verificar se realmente a enzima tem um papel secundário no metabolismo do H_2O_2 (Scott, Lubin *et al.*, 1991). O uso de células acatalassêmicas provou a grande importância da CAT que é a primeira linha de defesa contra o H_2O_2 , já que o aumento ou diminuição de GSH (o que permitiria elevação da atividade de GSH-Px), não alterou a atividade antioxidante geral nas células acatalassêmicas ou normais (Cohen e Hochstein, 1963; Sinet, Michelson *et al.*, 1975; Gutteridge e Halliwell, 1992).

Enquanto a GSH-Px é mais eficiente (tem maior afinidade pelo substrato), multifuncional (reduz H_2O_2 livre e também outros peróxidos), lenta (limitada pela reciclagem do GSH), e metabolicamente dispendiosa, a CAT possui baixa afinidade pelo substrato, mas é extremamente rápida (Eaton, 1991). Assim, a CAT deve proteger as células de grandes quantidades de H_2O_2 , e os baixos níveis endógenos devem ficar por conta da GSH-Px, juntamente com o sistema enzimático dependente de GSH (Eaton, 1991). A GSH-Px, GR e a CAT são enzimas que controlam os níveis de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e dos hidroperóxidos formados durante os processos de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e da peroxidação lipídica através da sua formação em H_2O e O_2 respectivamente, neutralizando as ações deletérias causadas por eles (Yu, 1994). Alguns trabalhos que utilizam modelos experimentais de diabetes, relatam o aumento da atividade tanto da GSH-Px quanto da GSSG-R no coração após três semanas (Kakkar, Mantha *et al.*, 1996; Yadav, Sarkar *et al.*, 1997). Estas alterações confirmam a eficácia do sistema de defesa no coração contra o estresse oxidativo no estado hiperglicêmico (Gumieniczek, Hopkala *et al.*, 2002).

Antioxidantes solúveis

Estes compostos são encontrados no sangue ou até mesmo em fluidos intersticiais, participam da neutralização direta de radicais livres. Os principais são: glutathione (Atamna e Ginsburg, 1995), ácido úrico (Chan, Chow *et al.*, 1999), albumina, haptoglobina e hemopexina (Halliwell e Gutteridge, 1990; Sies, 1991; Roth, 1997).

A glutathione, além da sua função como cofator para a família da GSH-Px, está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ácido ascórbico, comunicação entre células e, prevenção da oxidação de grupamentos sulfidrílicos (-SH) de proteínas evitando pontes intercadeias. Além disso, a GSH pode quelar íons cobre e diminuir sua habilidade de gerar radicais livres. A maior parte da glutathione 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 (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A glutathione tem quatro papéis fundamentais (Chance, Sies *et al.*, 1979):

- I- Converte o H_2O_2 a H_2O e mantém a concentração celular do H_2O_2 muito baixa.
- II- Converte os ácidos graxos peroxidados em ácidos hidroxilados.
- III- Converte os ácidos graxos poliinsaturados que sofrem peroxidação lipídica em ácidos hidroxilados, que não destroem as membranas celulares.
- IV- Reverte o estado de oxidação das proteínas.

Seqüestradores de metais de transição

São aqueles que exercem ação antioxidante por meio do seqüestro de metais de transição como ferro e cobre que são elementos sabidamente pró-oxidantes. Os principais seqüestradores de metais são: transferrina, lactoferrina, ferritina, albumina e ceruloplasmina (Stocker, Glazer *et al.*, 1987). Além dos antioxidantes descritos acima, sugere-se que a síntese de proteínas de choque térmico poderia complementar as capacidades de defesa antioxidante do organismo numa situação em que as proteínas intracelulares são danificadas pelos EROS (Essig e Nosek, 1997). Devido à sua alta plasticidade, e por possuir

um complexo metabolismo energético, o músculo pode sintetizar proteínas de choque térmico que chegam a constituir cerca de 20% do total de proteínas celulares em condição de estresse (Khassaf, Child *et al.*, 2001; Liu e Steinacker, 2001). No entanto, os mecanismos moleculares que regulam a ação das proteínas de choque térmico não foram ainda completamente elucidados (Liu e Steinacker, 2001). Sabe-se que as proteínas de choque térmico da família 70 apresentam-se em quantidades pequenas nas células em condição de não estresse, porém em condição de estresse podem ser sintetizadas rapidamente (Khassaf, Child *et al.*, 2001).

Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de garantir a manutenção do estado redox celular, isto é, promover eficiente eliminação das EROs produzidas pelo metabolismo basal e, conseqüentemente, proteger contra as lesões oxidativas. Entretanto, os organismos podem presenciar situações onde esta proteção se torna insuficiente. Quando isso acontece, ocorre estresse oxidativo. Portanto, a manutenção das defesas antioxidantes em equilíbrio dinâmico com a formação de EROs no organismo é fundamental para a sua sobrevivência.

1.5. Estresse oxidativo

Ocorre quando existe um desequilíbrio entre taxa de produção EROs e a taxa de remoção desses radicais pelo sistema de defesa antioxidante, promovendo um desbalanço redox temporário. Por outro lado, se esse desbalanço for mais intenso e duradouro, concretiza-se um dano oxidativo crônico. O desbalanço redox, agudo ou crônico, pode ser devido a um aumento na produção de EROs e/ou a uma diminuição na capacidade de defesa antioxidante (Droge, 2002), o que resulta em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos ou danosos aos tecidos, como o caso da lesão causada pela lipoperoxidação (LPO) gerando danos às proteínas e ao DNA, além de provocar diversas alterações na função celular (Frei, Stocker *et al.*, 1988).

O estresse oxidativo pode ocorrer também como conseqüência de insultos agudos intensos, tais como exposição à radiação e a agentes químicos tóxicos (Halliwell, 1996). Além disso, diversos estados patológicos parecem estar

associados a um quadro de estresse oxidativo. No entanto, se este é causa ou consequência destas patologias ainda é objeto de intensa investigação. Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação. Neste estudo, utilizamos o modelo experimental de diabetes, para criar o desequilíbrio redox causado pela exposição prolongada ao estado hiperglicêmico.

1.5.1 Estresse oxidativo no diabetes

O aumento na produção e o ineficiente balanço entre a eliminação das EROs são fatores importantes que desencadeiam danos às proteínas e tecidos. Muitos trabalhos têm focado no estresse oxidativo e suas consequências para o diabético (Uzel, Sivas *et al.*, 1987; Jennings, 1994; Oranje, Rondas-Colbers *et al.*, 1999). Entretanto, ainda não há um consenso se o estresse oxidativo é fator primário na patogênese das complicações diabéticas, ou se este é meramente consequência dos danos teciduais, refletindo a presença dessas complicações. O estado hiperglicêmico é um fator de risco para o desenvolvimento de complicações que afetam os sistemas nervoso, endócrino e vascular (Baynes e Thorpe, 1999). Portanto, inúmeras hipóteses tentam explicar a origem das complicações oriundas da hiperglicemia, como:

- I- O aumento do fluxo pela via dos polióis, gerando estresse oxidativo (Lee e Chung, 1999);
 - II- O aumento dos PFGA gerando aumento de glicação de proteínas plasmáticas e da matriz extra-celular (Wautier, Wautier *et al.*, 1994);
 - III- A ativação da via da PKC, gerando aumento de citocinas, estresse oxidativo e fatores proliferativos (Ishii, Koya *et al.*, 1998);
 - IV- O aumento do fluxo pela via das hexosaminas (Sharma e Ziyadeh, 1997).
- Segundo Bayners e Thorpe, essas complicações geram várias hipóteses, pois cada uma destas pode ser um reflexo diferente de um mesmo mecanismo patogênico, ou ainda que diferentes tecidos sejam sensíveis a diferentes mecanismos (Baynes e Thorpe, 1999).

1.5.2 Atividade da via do poliol

A enzima restritiva aldose redutase, tem função de reduzir aldeídos tóxicos na célula, transformando-os em álcoois inativos. Em um estado hiperglicêmico, esta enzima reduz a glicose a sorbitol, que é posteriormente convertido à frutose, resultando em aumento da relação NADH/NAD^+ (Figura 6). Este fato, leva a uma condição denominada de “pseudohipoxia” (Wilson, Bohren *et al.*, 1992; Brownlee, 2005). Tais mudanças no estado redox e a perturbação metabólica podem originar estresse osmótico nas células microvasculares, devido ao aumento dos níveis de sorbitol intracelular (Wilson, Bohren *et al.*, 1992). A baixa concentração de NADPH atenua a atividade da GR, diminuindo o GSH, o que promove redução da atividade GSH-Px e o aumento dos níveis de H_2O_2 (Nishinaka, 2001; Nussey, 2001).

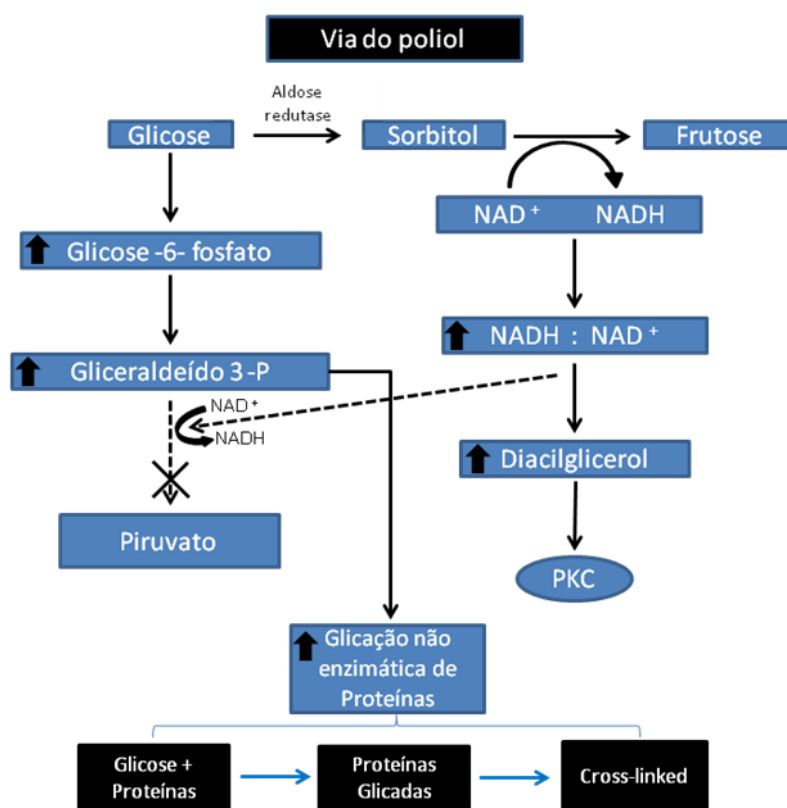


Figura 6- Efeito da hiperglicemia na via do poliol. Adaptado de Nussey, 2001.

1.5.3 Produtos finais de glicação avançada - PFGA.

Os PFGA são formados a partir de interações amino carbonil, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (Bierhaus, Hofmann *et al.*, 1998). A via de glicação, representada pela reação de Maillard, tem seu início com a formação da base de Schiff, que é instável. Esta base é gerada pela união de grupamentos carbonila de açúcar redutor, com a glicose (Figura 7). O próximo passo da glicação acontece quando a base de Schiff sofre um rearranjo conformacional, se torna mais estável e recebe o nome de produto de Amadori. Os produtos de Amadori, por sua vez, possuem grupos carbonilas reativos, que se ligam aos grupos aminas primários, originando os PFGA (Bierhaus, Hofmann *et al.*, 1998).

Nas células, os PFGA são responsáveis por uma série de alterações danosas, como a perda de função das proteínas alteradas (Degenhardt, Thorpe *et al.*, 1998), modificação de compostos da matriz extracelular (Tanaka, Avigad *et al.*, 1988), aumento da produção de EROs ou ativação de fatores de transcrição como NF- κ B devido à sua interação com receptores celulares (Yan, Schmidt *et al.*, 1994). Outro mecanismo alternativo de formação de PFGA é através da autooxidação da glicose, que produz metilglioxal e glioxal. Estes produtos, provenientes da autooxidação da glicose interagem com compostos dicarbonílicos mais reativos do que a glicose, dando origem a produtos finais de glicação avançada (Meade, Miller *et al.*, 2003; Huebschmann, Regensteiner *et al.*, 2006).

No diabetes, a interação de proteínas modificadas pelos PFGA com as células endoteliais normais, inicia uma ação deletéria na homeostase da parede vascular, resultando em aumento da permeabilidade vascular, redução da ação anticoagulante da trombomodulina, aumento da síntese de fator tecidual procoagulante e aumento da síntese de moléculas de adesão celular. Trabalhos em modelos aminais que utilizaram inibidores de PFGA, demonstraram uma inibição parcial de manifestações diabéticas como doenças microvasculares na retina, rins e nervos (Hammes, Martin *et al.*, 1991). Os PFGA são compostos estáveis, formados por uma reação irreversível, que predominantemente ocorre *in vivo* com as proteínas de carboximetilisina. Com o tempo, os PFGA ligam-se a proteínas constituintes das paredes vasculares e de forma acelerada no diabetes.

O grau de glicosilação não enzimática é determinado principalmente pela concentração de glicose e pelo tempo de exposição a elevados níveis glicêmicos. Outro fator crítico na formação dos PFGA é o potencial redox do microambiente tecidual. Situações predisponentes a um potencial oxidativo predominante também levam a formação aumentada dos PFGA (Baynes, 1991). Um estudo demonstra que, a interação entre proteínas modificadas por PFGA com receptores complexos de PFGA não servem apenas para degradar estas proteínas, mas também para ativar a via sinalizadora de transdução que induzam a síntese e liberação de citocinas e fatores de crescimento, contribuindo para reparação tecidual e *turnover* desta proteína, além de estimularem o desenvolvimento de doenças vasculares como aterosclerose e envelhecimento (Vlassara, 1995).

1.5.4 Metabolismo e ação do PFGA

O surgimento exacerbado de PFGA está intimamente associado ao balanço cinético de dois processos opostos: a formação endógena que ocorre vagarosamente sob condições fisiológicas e a absorção exógena representada pela degradação dos PFGA por sistemas antioxidantes. Entretanto, existe um aumento substancial de PFGA sob condições hiperglicêmicas (Jakus e Rietbrock, 2004) que afeta principalmente moléculas de meia-vida longa, como por exemplo, o colágeno (Forbes, Soldatos *et al.*, 2005) e a HbA1c que se encontra fortemente aumentados no diabetes (Rahbar, 2005).

Nosso organismo possui mecanismos de defesa, contra este acúmulo degenerativo causado pela PFGA, que pode ser de origem enzimática como a oxaldeído redutase e a aldose redutase que atuam na eliminação de intermediários dicarbonílicos reativos, interrompendo o processo de glicação (Thornalley, 2003). A remoção dos PFGA, formados nos tecidos é realizada pela proteólise extracelular e ou por células como os macrófagos, que endocitam os PFGA através da sinalização receptora, liberando após sua degradação na circulação alguns peptídeos solúveis de baixo peso molecular, que serão eliminados pela urina (Bierhaus, Hofmann *et al.*, 1998). Durante a liberação dos

peptídeos provenientes da degradação dos PFGA alguns intermediários reativos são lançados na circulação porem seus efeitos são limitado pela excreção renal. Este sistema de remoção dos PFGA é dependente da eficiência renal, que uma vez comprometida, contribui severamente para altas concentrações de PFGA séricos e teciduais (Gugliucci e Bendayan, 1996). Alguns estudos mostram uma alta afinidade da lisozima pelos PFGA, o que torna eficaz a capacidade de removê-los de alguns sistemas celulares e séricas (Zheng, Cai *et al.*, 2001; Huebschmann, Regensteiner *et al.*, 2006).

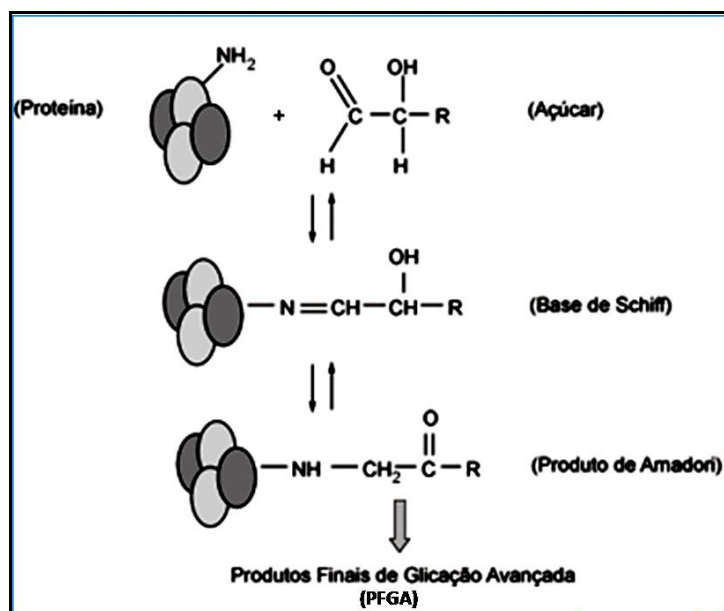


Figura 7- Formação dos produtos finais de glicação avançada. Adaptado de Ahmed, 2005.

Os pacientes diabéticos manifestam um aumento da rigidez arterial comparados com indivíduos não-diabéticos em uma idade relativamente jovem, além apresentar uma diminuição do ventrículo esquerdo (Airaksinen, Salmela *et al.*, 1993; Salomaa, Riley *et al.*, 1995). Embora a maioria destes casos sejam assintomáticos estas anormalidades indicam que o processo relacionado à perda vascular e infarto são acelerados na presença do diabetes. O mecanismo que

desenvolve a atrofia do miocárdio e as complicações arteriais em pacientes saudáveis é explicado pela reação não enzimática entre a glicose com algumas proteínas como e o caso do colágeno. Esta reação é conhecida como Maillard, que foi descoberta em 1912 ao incubar glicose e alguns aminoácidos obtendo pigmentos amarelados que eram resultantes da glicosilação não enzimática da glicose. Nesta reação reversível a glicose liga-se facilmente o grupamento amina das proteínas formando as bases de Schiff que podem variar dependendo da disponibilidade de glicose. Quando a glicose é removida ou reduzida, a base de Schiff torna-se mais estável recebendo o nome de produtos de Amadori (Cerami, 1985; Brownlee, Cerami *et al.*, 1988). A estabilidade dos produtos de Amadori garante o desenvolvimento de outras etapas que os transformam em PFGA interagindo facilmente com grupos aminos livres do colágeno (Koenig, Peterson *et al.*, 1976) (Figura 8)

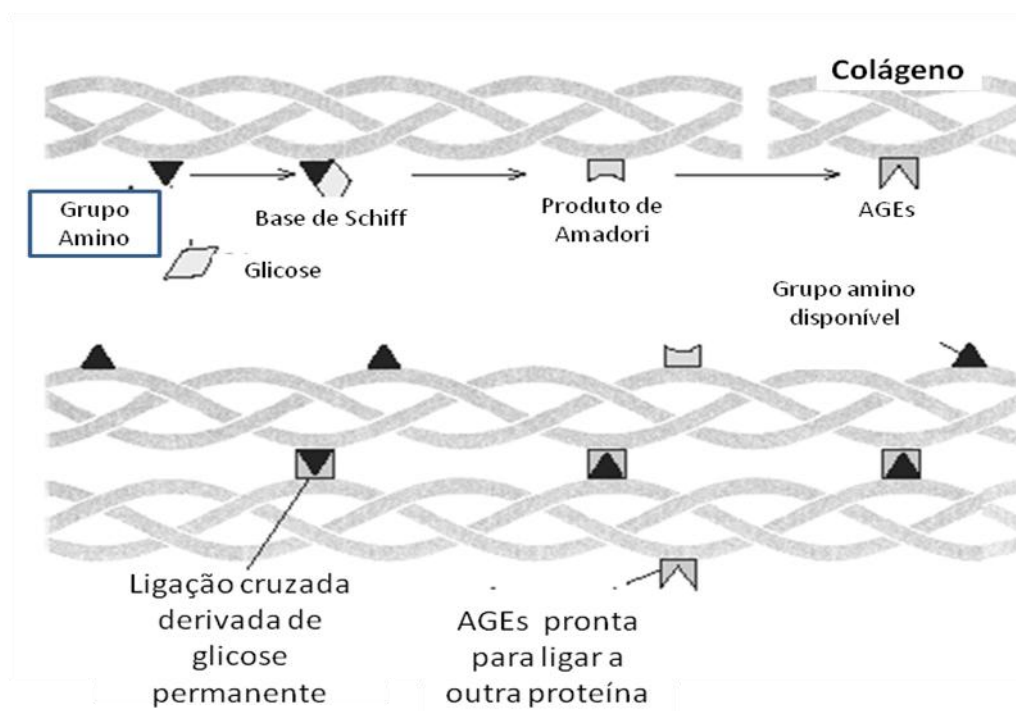


Figura 8- Descrição esquemática da formação de ligações cruzadas de colágeno, adaptado de Cerami, Vlassara *et al.*, 1987.

A formação não-enzimática de ligações cruzadas é acelerada no meio hiperglicêmico. Algumas pesquisas mostram que o diabetes é responsável pela

progressiva ligação cruzada do colágeno em ritmo acelerado. Entretanto, apenas recentemente, a importância do colágeno, glicação e suas ligações cruzadas têm sido abordadas em um contexto experimental para o desenvolvimento de substâncias inibidoras de PFGA como o caso da aminoguanidina (Uribarri, Woodruff *et al.*) .

1.5.5 Ativação da via da proteína quinase C (PKC)

A hiperglicemia aumenta a síntese do diacilglicerol (DAG), que é um co-fator crítico para ativar as isoformas β , α e δ da PKC (Koya, Jirousek *et al.*, 1997; Kelly, Edgley *et al.*, 2009). Vários trabalhos mostraram que a hiperglicemia no diabetes estimula o aumento da produção de EROs pela NADPH-oxidase, por intermédio da PKC (Koya e King, 1998; Bachschmid, Van Der Loo *et al.*, 2004). Essa quinase, por sua vez, é de grande importância na sinalização intracelular e é responsável pela fosforilação das subunidades citoplasmáticas da NADPH oxidase e com isso leva a ativação desse complexo enzimático (Kitada, Koya *et al.*, 2003) que passa a produzir EROs. Giugliano e colaboradores mostraram em seus trabalhos a existência da associação entre a produção aumentada de EROs, por meio da PKC, com o desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares como aterosclerose, retinopatia e hipertensão no diabetes (Giugliano, Ceriello *et al.*, 1996).

Além disso, a ativação da PKC desencadeia uma variedade de efeitos sobre a expressão gênica levando a vários efeitos danosos, como: diminuição na produção de óxido nítrico (NO) e atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), aumento na produção do vasoconstritor endotelina-1 (ET-1), do inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) e do fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF), NFkB e NADPH-oxidase (Koya, Jirousek *et al.*, 1997; Kuboki, Jiang *et al.*, 2000; Hadi e Suwaidi, 2007) (Figura 8).

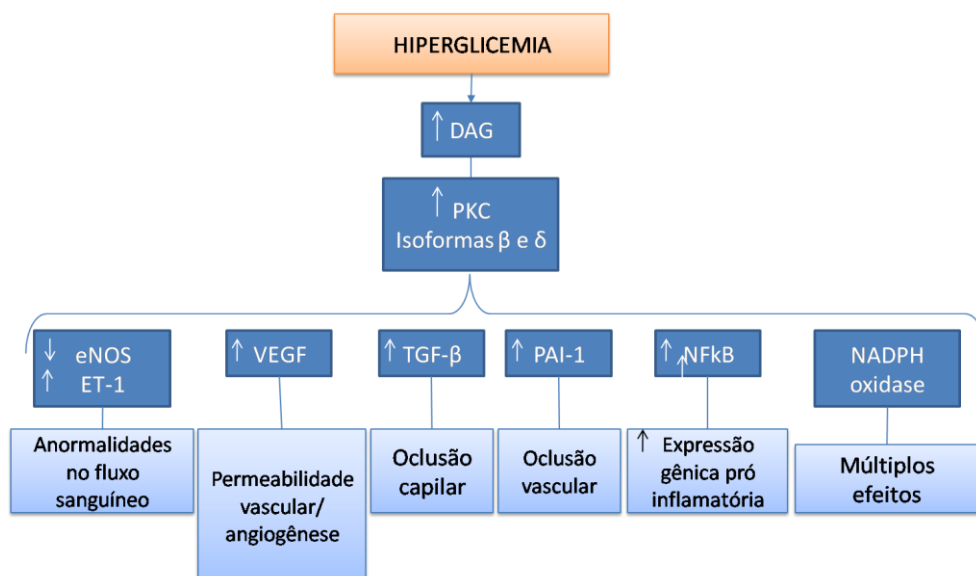


Figura 9 - Representação esquemática das anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia-induzida. Adaptado de Hadi e Suwaidi, 2007)

1.5.6 Aumento do fluxo pela via das hexosaminas

Quando os níveis de glicose estão altos dentro da célula, a maioria da glicose é metabolizada através da glicólise. Entretanto, parte da frutose-6-fosfato produzida é desviada para uma via de sinalização na qual a enzima GFAT (glutamina-frutose-6-fosfato amidotransferase) converte a frutose-6-fosfato em glucosamina-6-fosfato e finalmente a UDP (uridina difosfato) N-acetil glucosamina. Posteriormente N-acetil glucosamina liga-se a resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição, cuja modificação por glucosamina resulta em mudanças patológicas na expressão gênica (Kolm-Litty, Sauer et al., 1998; Wells e Hart, 2003) como a maior produção de PAI-1 e fator de crescimento de transformação beta (Du, Edelstein et al., 2000). Ainda que esta via tenha sido recentemente reconhecida, existem evidências que esta desempenhe papel significativo nas anormalidades induzidas por hiperglicemia na expressão gênica de células glomerulares disfunção dos cardiomiócitos (Clark, McDonough et al., 2003) e modificações nas proteínas das células endoteliais da carótida de DM2 (Federici, Menghini et al., 2002).

1.6 Referencias¹

AIRAKSINEN, K. E. *et al.* Diminished arterial elasticity in diabetes: association with fluorescent advanced glycosylation end products in collagen. *Cardiovasc Res* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 942-5, Jun 1993.

ALBUQUERQUE, R.; NETTO, A. P. *Diabetes na prática clínica*. Sociedade Brasileira de Diabetes, 2010. Disponível em:<<http://www.diabetesebook.org.br/novo/>>.

ANEJA, A. *et al.* Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options. *Am J Med* [S.I.], v. 121, n. 9, p. 748-57, Sep 2008.

ARUOMA, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem Toxicol* [S.I.], v. 32, n. 7, p. 671-83, Jul 1994.

ATAMNA, H.; GINSBURG, H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *J Biol Chem* [S.I.], v. 270, n. 42, p. 24876-83, Oct 20 1995.

AUGHSTEEN, A. A. An ultrastructural study on the effect of streptozotocin on the islets of Langerhans in mice. *J Electron Microsc (Tokyo)* [S.I.], v. 49, n. 5, p. 681-90, 2000.

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* [S.I.], v. 109, n. 1, p. 33-44, Jul 2000.

¹ As referências do capítulo I foram formatadas conforme as normas da ABNT.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* [S.I.], v. 16, n. 1, p. 42-7, Feb 2004.

BACHSCHMID, M. *et al.* Oxidative stress-associated vascular aging is independent of the protein kinase C/NAD(P)H oxidase pathway. *Arch Gerontol Geriatr* [S.I.], v. 38, n. 2, p. 181-90, Mar-Apr 2004.

BAILEY, C. J. Insulin resistance and antidiabetic drugs. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 58, n. 10, p. 1511-20, Nov 15 1999.

BAILEY, C. J. *et al.* Rosiglitazone/metformin fixed-dose combination compared with uptitrated metformin alone in type 2 diabetes mellitus: a 24-week, multicenter, randomized, double-blind, parallel-group study. *Clin Ther* [S.I.], v. 27, n. 10, p. 1548-61, Oct 2005.

BAJAJ, M. *et al.* Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* [S.I.], v. 28, n. 6, p. 783-9, Jun 2004.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* [S.I.], v. 40, n. 4, p. 405-12, Apr 1991.

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* [S.I.], v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 1999.

BECKMAN, J. S. *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* [S.I.], v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BECKMAN, J. S. *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 87, n. 4, p. 1620-4, Feb 1990

BIERHAUS, A. *et al.* AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* [S.I.], v. 37, n. 3, p. 586-600, Mar 1998.

BORRADAILE, N. M.; SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity in the heart. *Curr Hypertens Rep* [S.I.], v. 7, n. 6, p. 412-7, Dec 2005.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* [S.I.], v. 31, n. 6, p. 577-96, Dec 1999.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* [S.I.], v. 54, n. 6, p. 1615-25, Jun 2005.

BROWNLEE, M. *et al.* Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* [S.I.], v. 318, n. 20, p. 1315-21, May 19 1988.

CALLE-PASCUAL, A. L. *et al.* Comparison between acarbose, metformin, and insulin treatment in type 2 diabetic patients with secondary failure to sulfonylurea treatment. *Diabete Metab* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 256-60, Oct 1995.

CERAMI, A. Hypothesis. Glucose as a mediator of aging. *J Am Geriatr Soc* [S.I.], v. 33, n. 9, p. 626-34, Sep 1985.

CERAMI, A. *et al.* Glucose and aging. *Sci Am* [S.I.], v. 256, n. 5, p. 90-6, May 1987.

CHAKRAVARTI, R. N.; DHAWAN, V. Experimental atherosclerosis. *Indian Heart J* [S.I.], v. 43, n. 5, p. 351-5, Sep-Oct 1991.

CHAN, A. C. *et al.* Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med* [S.I.], v. 222, n. 3, p. 274-82, Dec 1999.

CHANCE, B. *et al.* Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CHIU, H. C. *et al.* A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest* [S.I.], v. 107, n. 7, p. 813-22, Apr 2001.

CLARK, R. J. *et al.* Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem* [S.I.], v. 278, n. 45, p. 44230-7, Nov 7 2003.

CLISSOLD, S. P.; EDWARDS, C. Acarbose. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 214-43, Mar 1988.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* [S.I.], v. 2, p. 1420-8, Nov-Dec 1963.

COUGHLIN, S. S. *et al.* Diabetes mellitus and risk of idiopathic dilated cardiomyopathy. The Washington, DC Dilated Cardiomyopathy Study. *Ann Epidemiol* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 67-74, Jan 1994.

DEGENHARDT, T. P. *et al.* Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* [S.I.], v. 44, n. 7, p. 1139-45, Nov 1998.

DIABETES, S. B. D. *Consenso brasileiro sobre diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes mellitus do tipo 2*. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2002.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* [S.I.], v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DU, X. L. *et al.* Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 97, n. 22, p. 12222-6, Oct 24 2000.

EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *J Lab Clin Med* [S.I.], v. 118, n. 1, p. 3-4, Jul 1991.

EGUCHI, K. *et al.* Association between diabetes mellitus and left ventricular hypertrophy in a multiethnic population. *Am J Cardiol* [S.I.], v. 101, n. 12, p. 1787-91, Jun 15 2008.

ESSIG, D. A.; NOSEK, T. M. Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* [S.I.], v. 22, n. 5, p. 409-28, Oct 1997.

FANG, Z. Y. *et al.* Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* [S.I.], v. 25, n. 4, p. 543-67, Aug 2004.

FAURE, E. *et al.* HbA(1c) and glycemic profile, basal- and post-treatment with Miglitol, in an area with a Mediterranean diet. *Diabetes Care* [S.I.], v. 25, n. 10, p. 1896-8, Oct 2002.

FEDERICI, M. *et al.* Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* [S.I.], v. 106, n. 4, p. 466-72, Jul 23 2002.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. [Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress]. *Rev Assoc Med Bras* [S.I.], v. 43, n. 1, p. 61-8, Jan-Mar 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira* [S.I.], v. 43, p. 61-68, 1997.

FISHER, M. Diabetes and atherogenesis. *Heart* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 336-40, Mar 2004.

FISMAN, E. Z. *et al.* Antihyperglycemic treatment in diabetics with coronary disease: increased metformin-associated mortality over a 5-year follow-up. *Cardiology* [S.I.], v. 91, n. 3, p. 195-202, 1999.

FISMAN, E. Z. *et al.* Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease. A cardiologic standpoint. *Herz* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 290-8, May 2004.

FORBES, J. M. *et al.* Below the radar: advanced glycation end products that detour "around the side". Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? *Clin Biochem Rev* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 123-34, Nov 2005.

FREI, B. *et al.* Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 85, n. 24, p. 9748-52, Dec 1988.

FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxygen toxicity. *Adv Neurol* [S.I.], v. 26, p. 255-9, 1979.

GAETANI, G. F. *et al.* Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* [S.I.], v. 73, n. 1, p. 334-9, Jan 1989.

GALDERISI, M. *et al.* Echocardiographic evidence for the existence of a distinct diabetic cardiomyopathy (the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* [S.l.], v. 68, n. 1, p. 85-9, Jul 1 1991.

GIUGLIANO, D. *et al.* Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* [S.l.], v. 19, n. 3, p. 257-67, Mar 1996.

GOMES, M. D. B. Glitazonas e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* [S.l.], v. 50, p. 271-280, 2006.

GUGLIUCCI, A.; BENDAYAN, M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* [S.l.], v. 39, n. 2, p. 149-60, Feb 1996.

GUMIENICZEK, A. *et al.* Changes in antioxidant status of heart muscle tissue in experimental diabetes in rabbits. *Acta Biochim Pol* [S.l.], v. 49, n. 2, p. 529-35, 2002.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med* [S.l.], v. 12, n. 1, p. 93-5, 1992.

HADI, H. A.; SUWAIDI, J. A. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag* [S.l.], v. 3, n. 6, p. 853-76, 2007.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* [S.l.], v. 25, n. 1, p. 57-74, Jul 1996.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* [S.I.], v. 102 Suppl 10, p. 5-12, Dec 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 246, n. 2, p. 501-14, May 1 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* [S.I.], v. 280, n. 1, p. 1-8, Jul 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine* New York: Oxford, 1999. .

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine* Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAMMES, H. P. *et al.* Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 88, n. 24, p. 11555-8, Dec 15 1991.

HAYAT, S. A. *et al.* Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 107, n. 6, p. 539-57, Dec 2004.

HERNANDEZ-SAAVEDRA, D. *et al.* Anti-inflammatory properties of a chimeric recombinant superoxide dismutase: SOD2/3. *Biomed Pharmacother* [S.I.], v. 59, n. 4, p. 204-8, May 2005.

HUEBSCHMANN, A. G. *et al.* Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* [S.I.], v. 29, n. 6, p. 1420-32, Jun 2006.

IMLAY, J. A. A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* [S.I.], v. 270, n. 34, p. 19767-77, Aug 25 1995.

ISHII, H. *et al.* Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* [S.I.], v. 76, n. 1, p. 21-31, Jan 1998.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 131-42, 2004.

JENNINGS, P. E. The potential of gliclazide, a sulphonylurea to influence the oxidative processes within the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 366, p. 313-24, 1994.

KAKKAR, R. *et al.* Time course study of oxidative stress in aorta and heart of diabetic rat. *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 91, n. 4, p. 441-8, Oct 1996.

KARLSSON, J. *Antioxidants and exercise*. Champaign: Human Kinetics, 1997.

KELLY, D. J. *et al.* Protein kinase C-beta inhibition attenuates the progression of nephropathy in non-diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* [S.I.], v. 24, n. 6, p. 1782-90, Jun 2009.

KHASSAF, M. *et al.* Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by nondamaging exercise. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 1031-5, Mar 2001.

KITADA, M. *et al.* Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes* [S.I.], v. 52, n. 10, p. 2603-14, Oct 2003.

KLEINVELD, H. A. *et al.* Interactions between oxygen free radicals and proteins. Implications for rheumatoid arthritis. An overview. *Scand J Rheumatol* [S.I.], v. 18, n. 6, p. 341-52, 1989.

KOENIG, R. J. *et al.* Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* [S.I.], v. 295, n. 8, p. 417-20, Aug 19 1976.

KOLM-LITTY, V. *et al.* High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* [S.I.], v. 101, n. 1, p. 160-9, Jan 1 1998.

KOOY, N. W. *et al.* Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. *Free Radic Res* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 245-54, Sep 1997.

KOUOH, F. *et al.* Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Farmaco* [S.I.], v. 54, n. 10, p. 695-9, Oct 30 1999.

KOYA, D. *et al.* Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 115-26, Jul 1 1997.

KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 859-66, Jun 1998.

KUBOKI, K. *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* [S.I.], v. 101, n. 6, p. 676-81, Feb 15 2000.

LEE, A. Y.; CHUNG, S. S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 23-30, Jan 1999.

LIU, Y.; STEINACKER, J. M. Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci* [S.I.], v. 6, p. D12-25, Jan 1 2001.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* [S.I.], v. 30, n. 1-2, p. 42-59, Feb-Apr 2009.

MACHLIN, L. J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* [S.I.], v. 1, n. 6, p. 441-5, Dec 1987.

MARKLUND, S. L. Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem J* [S.I.], v. 220, n. 1, p. 269-72, May 15 1984.

MARTENS, F. M. *et al.* Metabolic and additional vascular effects of thiazolidinediones. *Drugs* [S.I.], v. 62, n. 10, p. 1463-80, 2002.

MARWICK, T. H. Diabetic heart disease. *Postgrad Med J* [S.I.], v. 84, n. 990, p. 188-92, Apr 2008.

MCCORD, J. M. Iron- and manganese-containing superoxide dismutases: structure, distribution, and evolutionary relationships. *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 74, p. 540-50, 1976.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* [S.I.], v. 244, n. 22, p. 6049-55, Nov 25 1969.

MCGAVOCK, J. M. *et al.* Cardiac steatosis in diabetes mellitus: a ¹H-magnetic resonance spectroscopy study. *Circulation* [S.I.], v. 116, n. 10, p. 1170-5, Sep 4 2007.

MEADE, S. J. *et al.* The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. *Bioorg Med Chem* [S.I.], v. 11, n. 6, p. 853-62, Mar 20 2003.

MESSNER, K. R.; IMLAY, J. A. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* [S.I.], v. 274, n. 15, p. 10119-28, Apr 9 1999.

NISHINAKA, T.; YABE-NISHIMURA, C. EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 31, n. 2, p. 205-16, Jul 15 2001.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 31, n. 11, p. 1287-312, Dec 1 2001.

NUSSEY, S.; WHITEHEAD, S. *Endocrinology An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001.

ORANJE, W. A. *et al.* Lack of effect on LDL oxidation and antioxidant status after improvement of metabolic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* [S.I.], v. 22, n. 12, p. 2083-4, Dec 1999.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* [S.I.], v. 106, n. 2, p. 165-9, Jul 2000.

POORNIMA, I. G. *et al.* Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res* [S.I.], v. 98, n. 5, p. 596-605, Mar 17 2006.

RADI, R. J. *et al.* Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. *J Biol Chem* [S.I.], v. 226, p. 4244-4250, 1991.

RAHBAR, S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 1043, p. 9-19, Jun 2005.

RAO, K. M. *et al.* Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. *J Leukoc Biol* [S.I.], v. 51, n. 5, p. 496-500, May 1992.

REGAN, T. J. *et al.* Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* [S.I.], v. 60, n. 4, p. 884-99, Oct 1977.

Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* [S.I.], v. 26 Suppl 1, p. S5-20, Jan 2003.

ROTH, E. Oxygen free radicals and their clinical implications. *Acta Chir Hung* [S.I.], v. 36, n. 1-4, p. 302-5, 1997.

SALOMAA, V. *et al.* Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* [S.I.], v. 91, n. 5, p. 1432-43, Mar 1 1995.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* [S.I.], v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 13 2001.

SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem Rev* [S.I.], v. 103, n. 5, p. 1685-757, May 2003.

SCOTT, M. D. *et al.* Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* [S.I.], v. 118, n. 1, p. 7-16, Jul 1991.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F. N. Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 80-92, Mar 1997.

SHEN, L. *et al.* Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus. *Lancet* [S.I.], v. 374, n. 9688, p. 448-9, Aug 8 2009.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* [S.I.], v. 91, n. 3C, p. 31S-38S, Sep 30 1991.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* [S.I.], v. 27, n. 9-10, p. 916-21, Nov 1999.

SIES, H.; MURPHY, M. E. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 211-8, Jan 1991.

SINET, P. M. *et al.* Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 67, n. 3, p. 910-5, Dec 1 1975.

STOCKER, R. *et al.* Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 84, n. 16, p. 5918-22, Aug 1987.

TANAKA, S. *et al.* Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* [S.I.], v. 203, n. 2, p. 495-505, Sep 20 1988.

THORNALLEY, P. J. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem Soc Trans* [S.I.], v. 31, n. Pt 6, p. 1341-2, Dec 2003.

UZEL, N. *et al.* Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metab Res* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 89-90, Feb 1987.

VAN DE LAAR, F. A. *et al.* Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev* [S.I.], n. 2, p. CD003639, 2005.

VLASSARA, H. Advanced glycation in diabetic renal and vascular disease. *Kidney Int Suppl* [S.I.], v. 51, p. S43-4, Sep 1995.

WAUTIER, J. L. *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 91, n. 16, p. 7742-6, Aug 2 1994.

WEFERS, H.; SIES, H. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* [S.I.], v. 174, n. 2, p. 353-7, Jun 1 1988.

WELLS, L.; HART, G. W. O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett* [S.I.], v. 546, n. 1, p. 154-8, Jul 3 2003.

WENDE, A. R.; ABEL, E. D. Lipotoxicity in the heart. *Biochim Biophys Acta* [S.I.], v. 1801, n. 3, p. 311-9, Mar 2010.

WESTERMANN, D. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* [S.I.], v. 102, n. 6, p. 500-7, Nov 2007.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* [S.I.], v. 182, n. 1-2, p. 3-11, May 1998.

WILSON, D. K. *et al.* An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* [S.I.], v. 257, n. 5066, p. 81-4, Jul 3 1992.

WOZNIAK, A. C.; ANDERSON, J. E. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Dev Dyn* [S.I.], v. 236, n. 1, p. 240-50, Jan 2007.

YADAV, P. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes and tissues in aged diabetic rats. *Indian J Exp Biol* [S.I.], v. 35, n. 4, p. 389-92, Apr 1997.

YAMAMOTO, H. *et al.* Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* [S.I.], v. 294, n. 5838, p. 284-6, Nov 19 1981.

YAN, S. D. *et al.* Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* [S.I.], v. 269, n. 13, p. 9889-97, Apr 1 1994.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* [S.I.], v. 74, n. 1, p. 139-62, Jan 1994.

YUNG, L. M. *et al.* Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* [S.I.], v. 6, n. 1, p. 1-19, Mar 2006.

ZHENG, F. *et al.* Lysozyme enhances renal excretion of advanced glycation endproducts in vivo and suppresses adverse age-mediated cellular effects in vitro: a potential AGE sequestration therapy for diabetic nephropathy? *Mol Med* [S.l.], v. 7, n. 11, p. 737-47, Nov 2001.

Capítulo 2- Artigo Científico

RESUMO

As complicações cardiovasculares no diabetes mellitus estão associadas ao estresse oxidativo, resultado do embalance entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes. No estado hiperglicêmico a produção exacerbada de EROs pode contribuir para o aumento do conteúdo de colágeno cardíaco, formar produtos finais de glicação avançada (PFGA) e promover a glicação de algumas proteínas. Estes mecanismos são propostos para explicar o aumento de ligações cruzada e rigidez do miocárdio em pacientes diabéticos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor da faseolamina sobre os danos oxidativos e a deposição de colágeno no coração de ratos diabéticos induzidos por streptozotocina. Os ratos diabéticos foram tratados durante 20 dias, com faseolamina (100, 500, 1500 mg/kg) e acarbose (25 mg/kg). A atividade antioxidante total dos animais diabéticos não tratados foi menor quando comparados com animais não-diabéticos, o tratamento com faseolamina causou um aumento desta atividade. O sistema de defesa enzimático representado pelo enzima catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD) aumentou a sua atividade em ratos diabéticos não tratados. A atividade de ambas as enzimas diminuíram após o tratamento com faseolamina. O dano tecidual causado avaliado pela peroxidação lipídica foi maior nos ratos diabéticos que não receberam tratamento e reduzido nos animais tratados com faseolamina (D1500). Nosso estudo mostrou um aumento significativo da deposição de colágeno em animais diabéticos e redução após o tratamento. A faseolamina reduziu a glicemia e atenua a formação de EROs, evitando a sobrecarga do sistema antioxidante enzimático, contribuindo de forma eficiente na redução do colágeno do coração.

Palavras-chave: diabetes, estresse oxidativo, inibidor da alfa-amilase, colágeno tipo I, Faseolamina.

2.0. Oxidative stress evaluation and collagen type I deposition in heart of STZ-induced diabetic rats treated with Phaseolamin.

Renato José da Silva Oliveira ¹, Vanessa Neves de Oliveira ¹, Simone Ramos Deconte ¹, Neire Moura de Gouveia ¹, Luciana Karen Calábria ¹, Alberto da Silva Moraes ², Foued Salmen Espindola ¹

¹Institute of Genetics and Biochemistry, ²Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Av. Pará, Bloco 2E, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brazil.

Corresponding author:

Foued Salmen Espindola

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Campus Umuarama, Bloco 2E, sala 39A

CEP: 38400-902

Uberlândia, MG, Brazil

fsepindola@gmail.com or foued@ufu.br

Phone: (55-34) 3218-2477 and Fax: (55-34)3218-2203

2.1. Abstract

Cardiovascular complications of diabetes mellitus are associated with oxidative stress that occurs as a result of the disarrangement between the production of reactive oxygen species (ROS) and their neutralization by antioxidant systems under hyperglycemia. The exacerbated production of ROS may contribute to increased cardiac collagen content, collagen glycation in consequence of the formation of advanced glycation end products (AGEs). These mechanisms are proposed to explain the increase in cross-linking and increased stiffness of the myocardium in patients with diabetes. Phaseolamin inhibits pancreatic alpha-amylase, which leads to a reduction on hyperglycemia. The aim of this study was to evaluate the protective effects of Phaseolamin in the cardiac tissue against damage of streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats under oxidative stress levels and collagen type I deposition *in vivo*. Animals were distributed in six groups: non-diabetic (ND); non-treated diabetic (NTD); groups treated with commercial Phaseolamin at 100, 500 and 1500 mg/kg (D100, D500 and D1500 respectively); group treated with acarbose at 25 mg/kg (DACA). Treatments were given once daily by gavage during 20 days. The total antioxidant activity measured in NTD group was lower ($p < 0.001$) when compared with ND animals and greater in diabetic patients who received treatment with acarbose and Phaseolamin ($p < 0.001$). The enzymatic defense system represented by catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) increased its activity in NTD group ($p < 0.001$). The activity of SOD and CAT decreased after treatment with Phaseolamin (D100, D500, D1500 and DACA). The tissue damage caused by lipid peroxidation was reduced in D1500 ($p < 0.05$), although it was increased to other groups ($p < 0.001$). Phaseolamin treatment reduced the hyperglycemic state (16-42%) and decreases the formation of ROS, preventing the exacerbation of the antioxidant system in this tissue. Our study showed significantly increased deposition of collagen in all diabetic groups compared to ND rats. Groups D1500 and DACA showed reduced values of type I collagen compared to NTD group ($p < 0.001$). In our experimental model, treatment with Phaseolamin prevents the

development of ROS and myocardial collagen changes in diabetic rats. We suggest that Phaseolamin can be a complementary treatment for diabetes reducing the appearance of heart complications.

Keywords: Diabetes, oxidative stress, alpha-amylase inhibitor, collagen type I, Phaseolamin.

2.2. Introduction

According to *World Health Organization* (WHO) around 220 million people worldwide have diabetes. In 2005, approximately 1.1 million people died of diabetes, where low-income countries stand out getting 80% of deaths. The projection is that in the interval between 2005 - 2030 this number of deaths will be doubled. The diabetes is a major risk factor for the development of cardiovascular complications now accounts for 80% of all mortality (WHO 2006)

Evidence from experimental models have reported that the elevated extra- and intracellular glucose concentrations observed in diabetes increases the imbalance between pro-oxidants and antioxidants, oxidative stress (West, 2000), that is responsible for complications such as cardiomyopathy, is associated with oxidative stress markedly (Kaul, Siveski-Iliskovic et al. 1996). The formation of advanced glycation end products (AGEs) on extracellular matrix components leads to accelerated increases in collagen cross linking that contributes to myocardial stiffness in diabetes (Candido, Forbes et al. 2003) (Kita, Shimizu et al. 1991; Monnier, Glomb et al. 1996; Norton, Candy et al. 1996). Some studies in animal models show an increase of antioxidant enzymes in hyperglycemic state in consequence of the increased production of reactive oxygen species (ROS) in some tissues (Yildirim, et al., 2003).

The drugs classically used for the treatment of diabetes are insulin, sulphonylureas, biguanides and thiazolidinediones. Otherwise, others alternatives treatments are used to control the diabetes complications such as the supplementation of antioxidants are reported to minimize the appearance of cardiac complications reducing the functional and morphological damage to the heart of diabetic (Kaul, Siveski-Iliskovic et al. 1996). The *Phaseolus vulgaris*, has a constituent protein with an inhibitory effect on amylase which is called Phaseolamin. The Phaseolamin is the focus of studies on its ability antihyperglycemic (Obiro, Zhang et al. 2008). A study demonstrated through a purification of Phaseolamin an inhibitory action on the activity of the enzyme alpha amylase in a non-competitive (Mosca, Boniglia et al. 2008)

(MARSHALL, 1975). Studies portray the inhibitory mechanism is related to high degree of amino acid sequence similar inhibitors α -amylase (Moreno et al., 1989). Thus reducing the metabolism of starch and hyperglycemic condition in diabetes (Tomo et al., 2004). Phaseolamin is available on the market with various degrees of specific activity, depending on the commercial source, and is present in various diet supplements and dietetic products (Tormo, Gil-Exojo et al. 2006).

Although the clinical features of diabetic heart disease have been identified, its pathogenesis and, in particular, the mechanisms underlying the collagen abnormalities in the diabetic heart have not been fully elucidated. The collagen type I represent the key phenotype expressed in the heart (Eghbali, Blumenfeld et al. 1989). The increase in interstitial collagen causes cardiac fibrosis and leads to increased stiffness of the left ventricle, causing diastolic dysfunction and heart failure (Weber, Sun et al. 1994).

The aim of the present study was to evaluate the antihyperglycemic effect of Phaseolamin associated with alterations of oxidative parameters and with the deposition of collagen type I in the heart of STZ-induced diabetic rats.

2.3. Material and Methods

2.3.1. Animal

Male Wistar rats weighing approximately 160-210 g were acclimatized to the laboratory conditions for a period of two weeks and maintained in a temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and light (12/12 h of light/dark cycle) controlled. Animals were given standard commercial rat chow and water and housed under standard environmental conditions until treatment or sacrifice. All animal procedures followed the guidelines outlined by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL 2009) and was approved by the Ethics Committee in Animal Research of the Federal University of Uberlandia, Brazil (protocol number 051/08)

2.3.2. Induction of diabetes

Diabetes was induced by intravenous injection of STZ, into the dorsal vein of penis, (single dose, 40 mg/kg in 0.1 M sodium citrate, pH 4.5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ten days after the diabetes induction fasting blood glucose (FBG) level was monitored and blood glucose concentration was measured by reactive strips (Biocheck Glucose Test Strip) (Bioeasy, Minas Gerais, Brazil). Rats with blood glucose higher than 200 mg/dL were considered as diabetics. After twenty days, control and hyperglycemic rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (1:1; v/v), and tissues were dissected.

2.3.3. Group distribution

The rats were distributed randomly in six groups (n=8, each): Non-diabetic (ND); non-treated diabetic (NTD); groups treated with commercial Phaseolamin (Nanjing wellchem, China) at 100, 500 and 1500 mg/kg (D100, D500 and D1500 respectively); group treated with acarbose at 25 mg/kg (DACA). Treatments were given once daily by gavage during 20 days.

2.3.4. Collection of sample

After the experimental period rats were sacrificed by euthanasia with intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (1:1; v/v). At the time of sacrifice, blood samples were collected from the portal vein to measurement of metabolic control parameters on serum. After blood collection, the heart was rapidly excised, washed with chilled normal saline, weighed and immersed in liquid nitrogen. The ratio of heart weight (in mg) to the body weight (in g) was calculated.

2.3.5. Metabolic control parameters

The serum biochemistry parameters of fasting plasma glucose, total cholesterol, plasma triglycerides, total protein, creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (gamma GT) and alkaline phosphatase were determined using commercial kits.

2.3.6. Heart homogenization procedures

The heart was homogenized in buffer containing 40 mM Hepes, 100 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM benzamidine and 0.5 mM PMSF. The tissue homogenates were centrifuged at 10,000 *xg* for 10 min in Centra-MP4R refrigerated centrifuge (Cheney, O'Shea et al. 1993). Supernatants were collected and stored at 4°C. Total protein dosage was carried out using the Bradford method (Bradford 1976). The supernatant was assayed for the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), total antioxidant status (TAS), malondialdehyde (MDA) concentration and protein-bound sulfhydryl groups.

2.3.7. Histology and measurement of collagen

Heart tissue was fixed with 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline, pH 7.4 for 24 h, dehydrated in ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Five micrometer sections were cut and mounted on gelatin-chrome aluminum-coated microscope slides. For analysis and determination of percentage of conjunctive tissue, sections were stained by Picrosirius red method (Junqueira, Bignolas et al. 1979; Whittaker, Kloner et al. 1994) and morphometric analysis was carried out using a light microscope (Olympus Ltd. Watford, Hertfordshire, UK) with 40x objective equipped with a capture-and-image-analysis system (HL-Image 97, Western Vision Software, Layton, Utah, USA). Thirty random fields were selected. Percentage of collagen type I pixels per area was measured in each field analyzed. Data were expressed as the mean $\pm$ S.E.M. The statistical analyses were performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the least significant difference (LSD) test for the multiple comparisons among the groups. A P value of less than 0.05 denoted the presence of a statistically significant difference.

2.3.8. Assessment of oxidative stress markers

Determination of lipid peroxidation product and protein-bound sulfhydryl groups: Lipid peroxidation in plasma was measured by determining the TBARS levels with a commercially available kit (Cayman, Chemical, Ann Arbor, MI, USA) and its concentrations were expressed in terms of MDA concentration (μ M). The

levels of homogenate protein-bound sulfhydryl were determined using 5, 5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as previously described by (Faure and Lafond 1995).

Tissue homogenates assays of antioxidant enzymes activities and plasmatic total antioxidant status: CAT activity was assayed spectrophotometrically monitoring hydrogen peroxide decomposition at 240 nm (Aebi, Suter et al. 1968) and the substrate (H₂O₂) concentration was 20mM for cardiac tissue measurements. SOD and TAS were assessed using a commercial kit (Randox NX2332 Crumlin, UK).

2.3.9. Statistical analysis

The data were analyzed using the SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., IL, USA). Means and standard deviations were calculated. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the values among groups. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

2.4. Results

The table 1 summarizes the mean changes in body and cardiac weights and biochemistry parameters such as glycemia, cholesterol, creatinine, alkaline phosphatase, gamma-GT, AST, ALT, triglycerides, urea. After 20 days, NTD group presented lower body weight (p<0.05) than ND group and increased glycemia (p<0.05), alkaline phosphatase (p<0.001), ALT (p<0.001) and urea levels (p<0.001). Treatment with Phaseolamin decreased 26-42% (p<0.05) blood glucose of diabetic animals (D100 and D500 groups, respectively) and administration of acarbose (DACA group) caused the glycemic reduction of 30% (p<0.05). The serum activity of alkaline phosphatase was five times higher (p<0.001) in the NTD group compared with the ND group. Groups of diabetic animals treated with Phaseolamin reduced the enzyme activity in 44-54%, p<0.05, (group D100 and D1500, respectively) when compared with NTD group. Otherwise, the DACA group reduced 36% (p<0.05). The concentrations of urea were two times higher in the NTD group when compared with ND group (p<0.05). The groups treated with Phaseolamin D500 (p<0.05) and D1500 (p<0.001)

reduced the concentration of serum urea compared with the NTD group. No change in cholesterol, creatine and AST and ALT between groups ND and NTD was found.

The oxidative parameters (Figure 1) show that the system non-enzymatic antioxidant defense is impaired in hyperglycemic state, with total antioxidant activity reduction of NTD group compared with animals in ND group. However, treatment with acarbose and Phaseolamin caused the increase in TAS levels in cardiac tissue ($p < 0.001$) compared with NTD group (Figure 1A). Besides, non-enzymatic defense system evaluated by TAS, showed a negative correlation to MDA concentration ($r = -0.7485$, $p < 0.05$) CAT activity ($r = -0.6545$, $p < 0.05$), sulfhydryl group linked to protein ($r = -0.6371$, $p < 0.05$) and collagen content ($r = -0.6322$, $p < 0.05$).

Under hyperglycemic condition, SOD activity were higher in NTD compared to ND group ($p < 0.001$, Figure 1B). Groups treated with acarbose and Phaseolamin (D100, D500 and DACA) respectively decreased SOD activity compared with the NTD group ($p < 0.05$). We observed an increase of CAT activity to NTD group compared to ND group and other diabetic groups treated ($p < 0.001$, Figure 1D). There was no difference between diabetic animals treated (D100, D500, D1500 and DACA) compared to ND group ($p > 0.05$). However, the correlation analysis showed that hyperglycemia is positively correlated to CAT activity ($r = 0.67$, $p < 0.05$). After diabetes induction the MDA concentration (marker product of the process of lipid peroxidation) increased in NTD group, D100, D500 and DACA as compared to the ND group ($p < 0.001$). MDA concentration of D1500 group were similar to ND group ($p > 0.05$, Figure 1C).

The total content of collagen type I was examined morphometrically from rat heart tissue staining method of Picrosirius red (Figure 2). We observed that the deposition of collagen type I in the hearts of rats were greater in the NTD group compared to ND group ($p < 0.001$). Groups D100 and D500 did not decrease collagen content and kept their concentrations higher than ND group ($p < 0.001$) and similar to the NTD group ($p > 0.05$). Groups D1500 and DACA showed reduced values of collagen type I compared to NTD group ($p < 0.001$) and no difference was observed to ND group ($p > 0.05$, Figure 2A). Groups treated with Phaseolamin

(D500, D1500, DACA) attenuated the weight loss caused by diabetes, showing a strong negative correlation between weight and collagen type I deposition in the cardiac tissue ($r = -0.80$, $p < 0.05$).

2.5. Discussion

The oxidative stress was increased in diabetes due to ROS overproduction, and may be linked to the development of diastolic stiffness that was also related with an increased collagen deposition (Miric, Dallemagne et al. 2001) (Martin-Gallan, Carrascosa et al. 2003). The Phaseolamin, an inhibitor of the enzyme alpha-amylase extracted from white beans, is increasingly being used in the weight management industry and has been linked to reduced risk of diabetes, obesity (Geil and Anderson 1994; Venkateswaran, Pari et al. 2002), coronary heart disease (Anderson, Story et al. 1984; Bazzano, He et al. 2001), colon cancer (Hughes, Ganthavorn et al. 1997; Hangen and Bennink 2002) and gastrointestinal disorders (Bourdon, Olson et al. 2001). Then, the present study investigated the oxidative stress profile and deposition of collagen type I in STZ-induced diabetic rat hearts and treatment with Phaseolamin.

Results of this study revealed a marked weight decrease in diabetic animals, but no changes of heart/body weight was found in these animals. Blood glucose of diabetic animals reached high levels, however Phaseolamin treatment was able to reduce glycemia after 20 days, which has a mechanism similar to acarbose, based on delay and/or not digestion of carbohydrates due to competitive inhibition of glucosidases (Huebschmann, Regensteiner et al. 2006). The serum activity of alkaline phosphatase increased in the diabetic group and no reduction was found in the treated group (D1500). The liver enzymes ALT and AST reveal a possible liver damage, which ALT is a more specific indicator of liver inflammation. The groups treated with Phaseolamin reduced (21-36%) ALT levels compared with the NTD group. A date shows that high levels of AST-711, contributes to the cleavage of protein cross-links between collagen reduce the stiffness of arteries and heart (Doggrell 2001). We suggest that the increase in ALT found in the NTD group is related to the greater stiffness heart caused by

cross-linking between collagen on hyperglycemic conditions. Creatinine and urea were used as markers of renal injuries. Creatinine remained stable in all experimental groups, indicating a preserved renal function. However plasma concentrations of urea were increased in NTD group compared to ND, which may indicate the initial damage caused by hyperglycemia in the renal system.

Our study shows a reduction in total antioxidant activity during the hyperglycemic state and a compensatory mechanism of antioxidant enzyme (SOD and CAT) elevation. The MDA concentration was higher in non-treated diabetic group than in non-diabetic group, otherwise Phaseolamin treatment decreased MDA concentration in STZ-induced diabetes.

The STZ-diabetic rats showed significant weight loss after 20 days of STZ induction, except to diabetic rats treated with Phaseolamin 500 and 1500 mg/kg. Other studies verified a decrease of weight at 3 days (Akbarzadeh, Norouzian et al. 2007), 21 days (Cameron-Smith, Habito et al. 1997) and 60 days (Ueno, Kizaki et al. 2002) of STZ induction.

The CAT activity was found elevated in some tissues and organs of diabetic rats, such as heart (Kaul, Siveski-Iliskovic et al. 1995; Kaul, Siveski-Iliskovic et al. 1996; Rauscher, Sanders et al. 2000; Ozansoy, Akin et al. 2001; Rauscher, Sanders et al. 2001; Sanders, Rauscher et al. 2001), aorta (Kocak, Aktan et al. 2000; Ozansoy, Akin et al. 2001), liver (Aragno, Tamagno et al. 1999; Caballero, Gerez et al. 2000), kidney (Aragno, Tamagno et al. 1999), and brain (Aragno, Tamagno et al. 1999). We found significantly higher CAT activity in NTD group compared to ND group rats. There are reports that these alterations of CAT activity are due to diabetes are normalized by some treatments as captopril, aminoguanidine (Kedziora-Kornatowska, Luciak et al. 1998), acetylsalicylic acid (Caballero, Gerez et al. 2000) and dehydroepiandrosterone (DHEA) (Aragno, Tamagno et al. 1999). Furthermore, we observed that the Phaseolamin and acarbose was able to reduce the cardiac CAT activity after 20 days of treatment. We suggest that CAT activity downregulation is a response to Phaseolamin and acarbose treatments and generate an antihyperglycemic effect that minimizes the ROS levels in the rat hearts. A recent study shows that overexpression of catalase prevented the development of dilated cardiomyopathy in genetically modified mice,

this study provides the protective role of catalase prevented the development of diseases such as myocyte hypertrophy, apoptosis and interstitial fibrosis (Qin, Lennon-Edwards et al.).

A study conducted by Kaul et al. (Kaul, Siveski-Iliskovic et al. 1995) found that cardiac SOD activity decreased after 4 and 8 weeks of diabetes, and another study showed high SOD activity at 32 weeks. The increase of SOD activity is possibly due to increase dismutation of superoxide anion to molecular oxygen and hydrogen peroxide as an adaptive response to increased oxidative stress (Blum and Fridovich 1985). Our study showed that SOD activity remained high in diabetic animals compared to non-diabetic groups. The reduction of blood glucose can reduce ROS formation, requiring less direct free-radical scavenger, which was shown in all groups supplemented with Phaseolamin and acarbose.

The STZ-induced diabetes regularly results an increase in thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Bassotti 1991; Jung, Zhou et al. 2006) indicating the action of free radicals and indirect damage caused by them. After 20 days of diabetes induction, we found high levels of MDA in the diabetic rat hearts compared to non-diabetic animals. Otherwise, the diabetic rats treated D1500 decreased cardiac MDA concentration at similar levels to non-diabetic animals. The increase in MDA concentration was also observed in several studies (Krishnakumar, Augusti et al. 1999; Ozansoy, Akin et al. 2001; Huang, Shan et al. 2006). A study with methanolic fractions of beans demonstrated the antioxidant activity with 10-46% inhibition of lipid peroxidation attributing this capability to its phenolic compounds, alone or in combination with other components of beans with antioxidant action (Cardador-Martinez, Loarca-Pina et al. 2002). High levels of MDA are associated with the onset myocardial fibrosis in patients with aldosteronism. These changes are mainly caused by increased oxidative stress (Stehr, Mellado et al.). Thus, we suggest that Phaseolamin has antioxidant responsible for reduction of lipid peroxidation verified by a decrease content of MDA and increase SOD and CAT activity in heart tissue of diabetic rats.

The histopathological examination showed marked and significantly increased deposition of collagen type I in diabetic animals and reduction with Phaseolamin treatment. In our study, acarbose caused a reduction of collagen

deposition, confirming cardioprotective action from medicine. Recent investigations have demonstrated the protective action of acarbose, showing beneficial effects on endothelial function (Asakura, Kim et al. 2010), antihyperglycemic action (Halimi 2010), cardioprotective (Vanuzzo, Pilotto et al. 2008).

The hyperglycemic state is the main responsible for the process of advanced glycation end products (AGEs) (Liu et al. 2003) and has a key role in the development of complications caused by diabetes (Candido, Forbes et al. 2003) that affects the structure and function of the heart muscle, generally attributed to increased collagen deposition in this tissue (Avendano, Agarwal et al. 1999). Researchs has shown that glucose has an important role in the accumulation of collagen in tissues, increasing the synthesis in the transcriptional level (Reiser 1991; Turk, Misur et al. 1999). Moreover, the glycation process of collagen inhibits its degradation by interference in the metalloproteinases (MMP) action (Kuzuya, Asai et al. 2001). A study demonstrated that hyperglycemia accelerates the synthesis of collagen type I and III, by a process involving protein kinases (MAPKs) activated by mitogen and promoting myocardial interstitial fibrosis (Liu, Masurekar et al. 2003). AGEs formation modifies proteins forming links between the amino groups and other proteins, which alters the structure of the extracellular matrix leading to myocardial stiffness (Kuzuya, Asai et al. 2001).

Catalase overexpression preserves cardiac morphology, preventing changes in contractile function, reducing the concentrations of MDA, and AGEs (Ye, Metreveli et al. 2004). The present study shows an increased activity of antioxidant enzymes (SOD and CAT) and lipid peroxidation to NTD group. We suggest that only the increase of these enzymes is not sufficient to reduce oxidative stress and collagen deposition in NTD rat heart. Treatment with Phaseolamin attenuated the action of ROS contributing efficiently to decrease in AGEs, consequently reducing the collagen content of heart.

In conclusion, this study showed increased oxidative stress in diabetic rats chemically induced by STZ, probably due an increase of CAT and SOD activity, and a compensatory response to MDA concentration increase and decrease of TAS which is due to reduction of antioxidant capacities of heart. Furthermore, the

results of this study also suggested that the anti-hyperglycemic effects of Phaseolamin (1500 mg/kg) protects heart against oxidative stress and improves myocardial collagen changes in diabetic rats.

Cardiac remodeling of collagen and the result of variations in molecular, cellular and interstitial. In the diabetic animals such events cause changes in size, mass, geometry and function of the heart in response to a determined assault. Treatment with Phaseolamin prevented the initial changes caused by deposition of collagen in the hearts of diabetic rats. We suggest that Phaseolamin can be a complementary treatment for diabetes and reducing the appearance of heart complications.

2.6. Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPEMIG to FSE, by CAPES fellowship to RJSO, SRD and LKC and by CNPq fellowship to NMG. The authors thank the School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim and Felipe Cesar Gonçalves for their help in processing the biochemical analyses.

2.7. Figures legends

Figure 1- Oxidative parameters evaluated from the heart muscle homogenate. Non-diabetic (ND); non-treated diabetic (NTD); diabetic animals supplemented with phaseolamin 100, 500 and 1500 (mg/kg) (D100, D500 and D1500). Bar represent mean $\pm$ S.E.M **A-** Total antioxidant activity. a- $p < 0.001$ vs. other groups; b- $p < 0.001$ vs. other groups; **B-** Superoxide dismutase activity. a- $p < 0.001$ vs. ND, D100, D500, DACA **C-** Malondialdehyde (MDA) concentration. a- $p < 0.001$ vs. NTD, D100, D500, DACA; b- $p < 0.001$ vs. NTD, D100, DACA. **D-** Catalase activity. a- $p < 0.001$ vs. other groups. ($p < 0.05$).

Figure 2- Analysis of total collagen content of rats stained with picosirius red. Non-diabetic (ND); non-treated diabetic (NTD); diabetic animals supplemented with Phaseolamin 100, 500 and 1500 (mg/kg) (D100, D500 and D1500). **A-** Bar represent mean $\pm$ S.E.M. Collagen. a- $p < 0.001$ vs. ND; b- $p < 0.05$ vs. NTD; c- $p < 0.001$ vs NTD. **B-** Histological sections of rat heart stained with picosirius red. Non-diabetic (ND); non-treated diabetic (NTD); diabetic animals supplemented with Phaseolamin 100, 500 and 1500 mg/kg (D100, D500 and D1500).

Figure 1

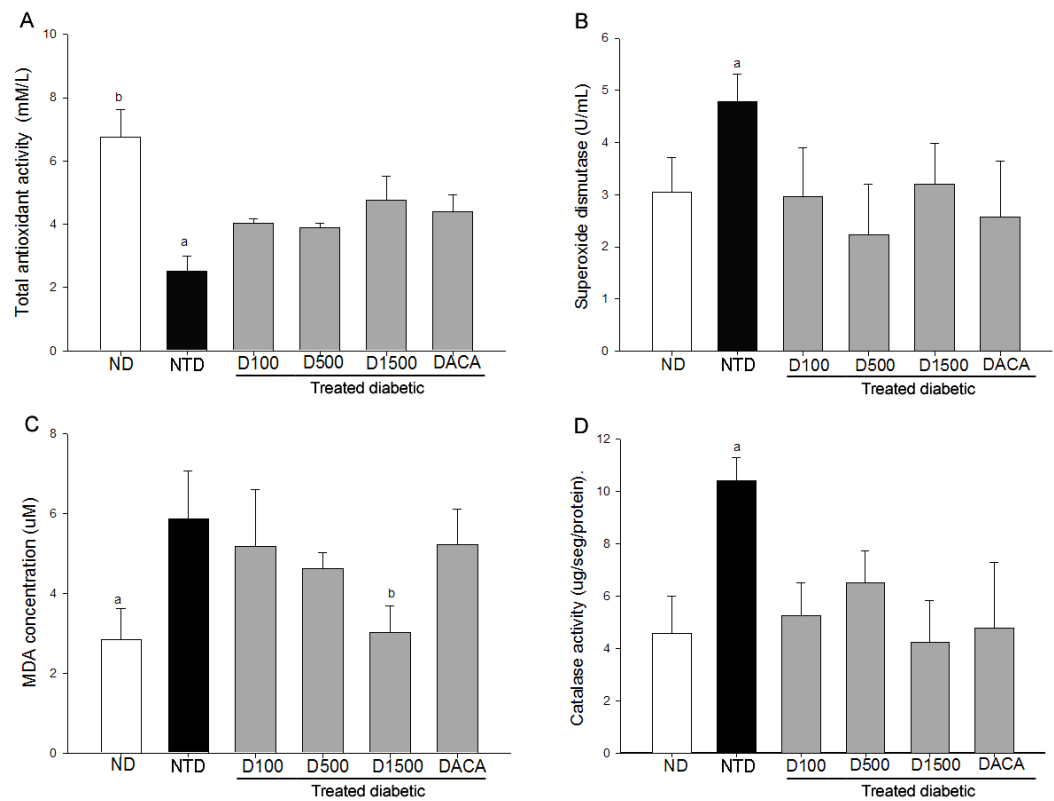
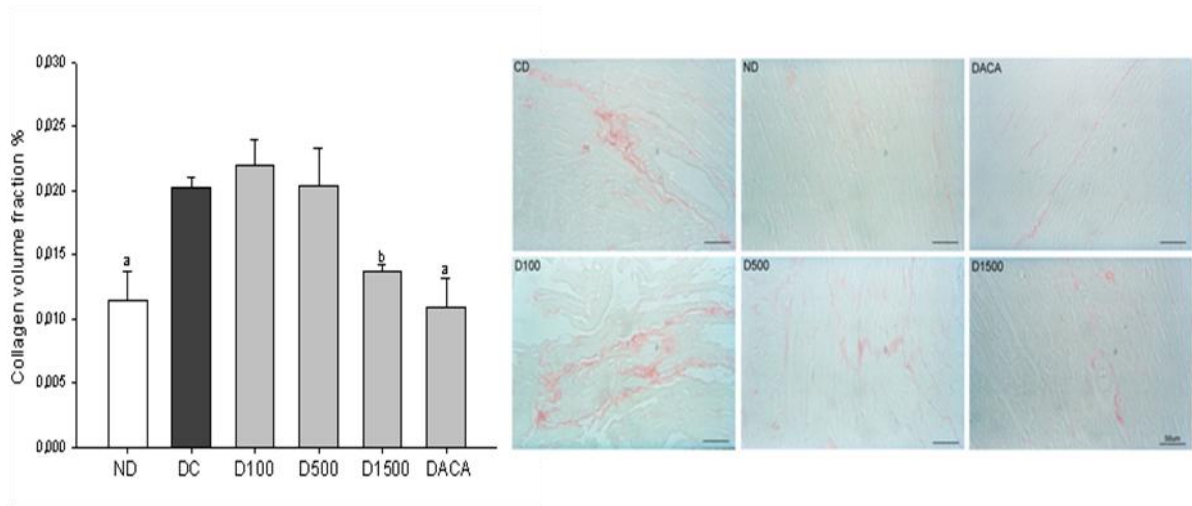


Figure 2



Table

Table 1- Body, cardiac weights and biochemistry parameters

	ND	NTD	Diabetic rats treated			
			D100	D500	D1500	DACA
Body weight (g)	319.75 ± 6.90	255.00 ± 16.29 ^a	233.00 ± 12.34 ^a	270.75 ± 16.54	301.00 ± 12.83	284.00 ± 17.59
Heart weight (mg)	1305.00 ± 130.41	987.50 ± 20.15	877.50 ± 47.67 ^b	930.00 ± 25.49 ^a	967.50 ± 35.67 ^a	1047.50 ± 103.30
Heart/body weight	4.10 ± 0.46	3.97 ± 0.30	3.79 ± 0.26	3.47 ± 0.25	3.22 ± 0.13	3.66 ± 0.13
Glycemia (mg/dL)	104.12 ± 5.32	568.57 ± 38.04 ^a	330.00 ± 85.68 ^{b,c}	415.40 ± 53.48 ^{b,c}	333.57 ± 43.88 ^{b,c}	397.66 ± 39.33 ^b
Cholesterol (mg/dL)	65.33 ± 4.99	70.45 ± 4.72	65.90 ± 2.09	65.60 ± 5.91	71.41 ± 3.46	82.68 ± 4.91
Creatinine (mg/dL)	0.62 ± 0.03	0.87 ± 0.05	0.66 ± 0.07	0.68 ± 0.66	0.57 ± 0.09	0.68 ± 0.07
Alkaline Phosphatase (U/L)	92.41 ± 7.45	559.32 ± 62.14 ^b	318.16 ± 19.77	319.18 ± 77.68	261.65 ± 55.52 ^c	359.08 ± 82.25 ^a
Gamma-GT (U/L)	5.38 ± 1.42	19.80 ± 9.35	10.11 ± 5.86	9.08 ± 3.42	6.20 ± 2.85	17.21 ± 10.73
AST (U/L)	74.62 ± 3.52	116.71 ± 11.38	93.33 ± 10.84	120.80 ± 22.96	100.57 ± 8.94	92.00 ± 6.76
ALT (U/L)	36.37 ± 2.30	97.71 ± 6.19 ^b	76.50 ± 10.59 ^a	64.40 ± 15.66	62.28 ± 6.25	78.00 ± 10.94 ^a
Triglycerides	59.96 ± 9.57	98.93 ± 40.60	114.53 ± 18.45	125.40 ± 13.42	99.72 ± 17.66	117.13 ± 55.54 ^a
Urea (mg/dL)	37.26 ± 1.68	77.68 ± 5.59 ^b	57.03 ± 5.22	54.54 ± 4.41 ^c	48.88 ± 6.21 ^c	61.13 ± 6.11 ^a

Non-diabetic (ND); Non-treated diabetic (NTD); Diabetic rats treated with Phaseolamin at 100, 500 and 1500 mg/kg (D100, D500 and D1500 respectively); Diabetic rats treated with acarbose (DACA); Gamma-glutamyltransferase (gamma-GT); Glutamic oxalacetic transaminase(TGO); Glutamic pyruvic transaminase (TGP). a- p<0.05 vs. ND; b- p< 0.001 vs. ND; c- p<0.05 vs. NTD.

References²

- Aebi, H., H. Suter, et al. (1968). "Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice." Biochem Genet **2**(3): 245-51.
- Akbarzadeh, A., D. Norouzian, et al. (2007). "Induction of diabetes by streptozotocin in rats " Indian Journal of Clinical Biochemistry **22**(2): 60-64.
- Anderson, J. W., L. Story, et al. (1984). "Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men." Am J Clin Nutr **40**(6): 1146-55.
- Aragno, M., E. Tamagno, et al. (1999). "Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress." Free Radic Biol Med **26**(11-12): 1467-74.
- Asakura, M., J. Kim, et al. (2010). "[Anti-diabetic drugs for secondary prevention of cardiovascular disease in mild diabetic and IGT patients: ABC study and PPAR study]." Nippon Rinsho **68**(5): 887-91.
- Avendano, G. F., R. K. Agarwal, et al. (1999). "Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation." Diabetes **48**(7): 1443-7.
- Bassotti, G. (1991). "Diabetes and gastrointestinal motor activity." Recenti Prog Med **82**(6): 334-7.
- Bazzano, L. A., J. He, et al. (2001). "Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women: NHANES I Epidemiologic Follow-up Study." Arch Intern Med **161**(21): 2573-8.
- Blum, J. and I. Fridovich (1985). "Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical." Arch Biochem Biophys **240**(2): 500-8.
- Bourdon, I., B. Olson, et al. (2001). "Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein b48 response to test meals in men." J Nutr **131**(5): 1485-90.

² As referências do capítulo II foram formatadas conforme as normas da revista escolhida.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Caballero, F., E. Gerez, et al. (2000). "Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition." Chem Biol Interact **126**(3): 215-25.
- Cameron-Smith, D., R. Habito, et al. (1997). "Dietary guar gum improves insulin sensitivity in streptozotocin-induced diabetic rats." J Nutr **127**(2): 359-64.
- Candido, R., J. M. Forbes, et al. (2003). "A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes." Circ Res **92**(7): 785-92.
- Cardador-Martinez, A., G. Loarca-Pina, et al. (2002). "Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.)." J Agric Food Chem **50**(24): 6975-80.
- Cheney, R. E., M. K. O'Shea, et al. (1993). "Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity." Cell **75**(1): 13-23.
- Doggrell, S. A. (2001). "ALT-711 decreases cardiovascular stiffness and has potential in diabetes, hypertension and heart failure." Expert Opin Investig Drugs **10**(5): 981-3.
- Eghbali, M., O. O. Blumenfeld, et al. (1989). "Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization." J Mol Cell Cardiol **21**(1): 103-13.
- Faure, P. and J. L. Lafond (1995). Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. Analysis of free radicals in biology systems. E. Favier A, J. Cadet, B. Kalyanaraman, M. Fontecave and J. L. Pierre. Basel, Birkhäuser: 237-249.
- Geil, P. B. and J. W. Anderson (1994). "Nutrition and health implications of dry beans: a review." J Am Coll Nutr **13**(6): 549-58.
- Halimi, S. (2010). "[Towards new recommendations for the treatment of type 2 diabetes? An expert's point of view]." Rev Prat **60**(4): 504-9.

- Hangen, L. and M. R. Bennink (2002). "Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats." Nutr Cancer **44**(1): 60-5.
- Huang, H., J. Shan, et al. (2006). "Carvedilol protected diabetic rat hearts via reducing oxidative stress." J Zhejiang Univ Sci B **7**(9): 725-31.
- Huebschmann, A. G., J. G. Regensteiner, et al. (2006). "Diabetes and advanced glycoxidation end products." Diabetes Care **29**(6): 1420-32.
- Hughes, J. S., C. Ganthavorn, et al. (1997). "Dry beans inhibit azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats." J Nutr **127**(12): 2328-33.
- Jung, C. H., S. Zhou, et al. (2006). "Antihyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats." Biosci Biotechnol Biochem **70**(10): 2556-9.
- Junqueira, L. C., G. Bignolas, et al. (1979). "Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections." Histochem J **11**(4): 447-55.
- Kaul, N., N. Siveski-Iliskovic, et al. (1996). "Probucol treatment reverses antioxidant and functional deficit in diabetic cardiomyopathy." Mol Cell Biochem **160-161**: 283-8.
- Kaul, N., N. Siveski-Iliskovic, et al. (1995). "Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy." Nutrition **11**(5 Suppl): 551-4.
- Kedziora-Kornatowska, K. Z., M. Luciak, et al. (1998). "Effect of aminoguanidine on erythrocyte lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in experimental diabetes." Clin Chem Lab Med **36**(10): 771-5.
- Kita, Y., M. Shimizu, et al. (1991). "Correlation between histopathological changes and mechanical dysfunction in diabetic rat hearts." Diabetes Res Clin Pract **11**(3): 177-88.
- Kocak, G., F. Aktan, et al. (2000). "Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes." Diabetes Nutr Metab **13**(6): 308-18.

- Krishnakumar, K., K. T. Augusti, et al. (1999). "Hypoglycaemic and anti-oxidant activity of *Salacia oblonga* Wall. extract in streptozotocin-induced diabetic rats." Indian J Physiol Pharmacol **43**(4): 510-4.
- Kuzuya, M., T. Asai, et al. (2001). "Glycation cross-links inhibit matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells cultured on collagen lattice." Diabetologia **44**(4): 433-6.
- Liu, J., M. R. Masurekar, et al. (2003). "Glycation end-product cross-link breaker reduces collagen and improves cardiac function in aging diabetic heart." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(6): H2587-91.
- Martin-Gallan, P., A. Carrascosa, et al. (2003). "Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications." Free Radic Biol Med **34**(12): 1563-74.
- Miric, G., C. Dallemagne, et al. (2001). "Reversal of cardiac and renal fibrosis by pirfenidone and spironolactone in streptozotocin-diabetic rats." Br J Pharmacol **133**(5): 687-94.
- Monnier, V. M., M. Glomb, et al. (1996). "The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution." Diabetes **45 Suppl 3**: S67-72.
- Mosca, M., C. Boniglia, et al. (2008). "Determination of alpha-amylase inhibitor activity of phaseolamin from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) in dietary supplements by HPAEC-PAD." Anal Chim Acta **617**(1-2): 192-5.
- Norton, G. R., G. Candy, et al. (1996). "Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats." Circulation **93**(10): 1905-12.
- Obiro, W. C., T. Zhang, et al. (2008). "The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor." Br J Nutr **100**(1): 1-12.
- Ozansoy, G., B. Akin, et al. (2001). "Short-term gemfibrozil treatment reverses lipid profile and peroxidation but does not alter blood glucose and tissue antioxidant enzymes in chronically diabetic rats." Mol Cell Biochem **216**(1-2): 59-63.
- Qin, F., S. Lennon-Edwards, et al. "Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of

- myocardial remodeling and prevents the progression to overt heart failure in G(alpha)q-overexpressing transgenic mice." Circ Heart Fail **3**(2): 306-13.
- Rauscher, F. M., R. A. Sanders, et al. (2000). "Effects of piperine on antioxidant pathways in tissues from normal and streptozotocin-induced diabetic rats." J Biochem Mol Toxicol **14**(6): 329-34.
- Rauscher, F. M., R. A. Sanders, et al. (2001). "Effects of isoeugenol on oxidative stress pathways in normal and streptozotocin-induced diabetic rats." J Biochem Mol Toxicol **15**(3): 159-64.
- Reiser, K. M. (1991). "Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes." Proc Soc Exp Biol Med **196**(1): 17-29.
- Sanders, R. A., F. M. Rauscher, et al. (2001). "Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats." J Biochem Mol Toxicol **15**(3): 143-9.
- Stehr, C. B., R. Mellado, et al. "Increased levels of oxidative stress, subclinical inflammation, and myocardial fibrosis markers in primary aldosteronism patients." J Hypertens.
- Tormo, M. A., I. Gil-Exojo, et al. (2006). "White bean amylase inhibitor administered orally reduces glycaemia in type 2 diabetic rats." Br J Nutr **96**(3): 539-44.
- Turk, Z., I. Misur, et al. (1999). "Rat tissue collagen modified by advanced glycation: correlation with duration of diabetes and glycemic control." Clin Chem Lab Med **37**(8): 813-20.
- Ueno, Y., M. Kizaki, et al. (2002). "Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy." J Nutr **132**(5): 897-900.
- Vanuzzo, D., L. Pilotto, et al. (2008). "[Cardiovascular risk and cardiometabolic risk: an epidemiological evaluation]." G Ital Cardiol (Rome) **9**(4 Suppl 1): 6S-17S.
- Venkateswaran, S., L. Pari, et al. (2002). "Effect of Phaseolus vulgaris on circulatory antioxidants and lipids in rats with streptozotocin-induced diabetes." J Med Food **5**(2): 97-103.

- Weber, K. T., Y. Sun, et al. (1994). "Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms." J Mol Cell Cardiol **26**(3): 279-92.
- Whittaker, P., R. A. Kloner, et al. (1994). "Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light." Basic Res Cardiol **89**(5): 397-410.
- WHO, W. H. O.-. (2006). Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. W. H. Organization. Geneva.
- Ye, G., N. S. Metreveli, et al. (2004). "Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes." Diabetes **53**(5): 1336-43.