

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida sobre parâmetros indicadores de resistência periférica à insulina, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA em ratos Wistar.

Mestranda: Débora Kurrle Rieger Venske

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Porto Alegre, 2010.

Débora Kurrle Rieger Venske

Efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida sobre parâmetros indicadores de resistência periférica à insulina, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA em ratos Wistar.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2010.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Pró-Reitoria de pesquisa desta Universidade (PROPESQ/UFRGS).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família: Meu pai Rubem Rieger, Minha mãe Sônia Kurrle Rieger, minhas irmãs Priscila e Dâmaris. Exemplos de dedicação, fé e perseverança. Apoio presente em todos os momentos. E também dedico este trabalho ao meu marido José Carlos Venske, com quem quero formar minha nova família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Perry, por me receber em seu laboratório, pela preocupação que sempre demonstrou, não apenas pela minha formação científica, mas também pela minha formação intelectual, sempre incentivando a boa leitura. Também pelos momentos de conversas e boas risadas, e pelos “puxões de orelha”, aprendi muito contigo! És um exemplo que sempre terei comigo de professor e pesquisador, obrigada!

Aos meus amigos e colegas do laboratório 27, Betina, Simone, Ana Lúcia, Fernanda Hansen, Fernanda Sordi, Júlia, pelas valiosas contribuições durante este trabalho, seja durante os experimentos, ou pelas horas de conversas ou ainda pela companhia nos almoços do RU. Em especial quero agradecer a Cris, que chegou quase no final, mas sua contribuição foi fundamental para os resultados finais deste trabalho, obrigada pela tua amizade.

Aos meus amigos Adriano e Aline, não tenho palavras para agradecer o apoio, a companhia, a parceria e disponibilidade constante de vocês em me ajudar e socorrer, grande parte deste trabalho eu dedico a vocês.

A Cíntia, parceira de muitos momentos, amiga de todas as horas, obrigada por encarar a rotina junto comigo e por seres quem tu és, te admiro muito.

A minha amiga Carol, que me “aguenta” desde a faculdade, obrigada pela tua paciência, por me animares sempre, tua amizade é muito importante para mim!

Aos meus amigos, Nica, Davi, Doug e Paula, simplesmente por existirem na minha vida, e discutirem bioquímica comigo, mesmo sem nunca terem estudado bioquímica!

A MÔ, pela paciência de ler este trabalho, valeu pela força prima!

A professora Liane pelo auxílio com as análises plasmáticas, ao professor Chico pela dosagem de insulina, professora Regina Pureur, doutoranda Luana e doutora Samantha, por me receberem em seu laboratório para realização da técnica de Western Blotting, aos Professores Carlos Alberto e Carmen, pelas análises de dano ao DNA.

Aos Funcionários do departamento e do biotério, Cléa, Claudia, Bebel, Patrícia, seu Waldemar, Sérgio, sem vocês a bioquímica da UFRGS não seria a mesma, vocês foram ótimos!

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, por possibilitarem a realização deste trabalho e proporcionarem um ambiente excelente de estudo e aprendizado.

A minha Família, meus pais Rubem e Sônia e minhas irmãs Priscila e Dâmaris. Pelo amor incondicional, pelo apoio constante, amo vocês mais hoje do que ontem.

Ao meu Marido Carlinhos, pela paciência, por me esperar sempre nos finais de semana e pela cumplicidade. Estamos começando a caminhar juntos agora, e que seja eterno. Obrigada pelo teu amor.

A Deus, grande responsável pela minha existência, e por guiar a minha vida.

"Mire veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto:
que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas [...]"

Grande Sertão Veredas,
de Guimarães Rosa

SUMÁRIO

PARTE I	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIACÕES	6
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Diabete Mellitus	7
1.2 Resistência à Insulina	9
1.3 Secreção de Insulina	10
1.4 Lipotoxicidade	12
1.5 Glicotoxicidade	14
1.6 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)	17
1.6.1 Formação endógena	18
1.6.1.1 Reação de Maillard	18
1.6.1.2 Processos oxidativos.....	20
1.6.2 Formação exógena.....	20
1.6.3 Danos causados pelos AGEs	21
1.6.4 Receptores de AGEs	22
1.6.5 Defesa antiglicação.....	23
1.6.5.1 Sistema Glioxalase	23
1.7 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	23
1.7.1 Danos provocados por EROs.....	25
1.7.2 Defesas antioxidantes	25
1.7.2.1 Superóxido dismutase (SOD)	26
1.7.2.2 Catalase (CAT).....	26
1.7.2.3 Sistema Glutaciona.....	27
1.7.3 Fontes de EROs no Diabete.....	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
PARTE II	32
3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	33
3.1 Capítulo 1	34
3.2 Capítulo 2	72
PARTE III	94
4 DISCUSSÃO	95
5 CONCLUSÕES	103
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

PARTE I

RESUMO

O estilo de vida baseado no sedentarismo e no consumo de dietas palatáveis com alto conteúdo de carboidratos (principalmente sacarose) e lipídeos tem sido associado com o aumento na incidência do diabetes e das suas complicações. As complicações do diabetes têm uma origem multifatorial, mas em particular, o processo bioquímico de formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs), acelerado no diabetes como resultado de uma hiperglicemia crônica, tem um papel importante nestas complicações. Glicação avançada envolve a geração de um grupo heterogêneo de moléculas químicas conhecidas como AGEs, esta formação é resultado da reação não enzimática da glicose com proteínas, lipídeo e ácidos nucléicos e envolve intermediários altamente reativos como o metilglioxal. AGEs são responsáveis pelas complicações do diabetes, por alterarem a estrutura e a função de moléculas nos sistemas biológicos e pelo aumento do estresse oxidativo. Exposição dos alimentos ao calor é um importante mecanismo gerador de AGEs. O consumo de alimentos termolizados aumenta a concentração de AGEs na circulação e isso é acompanhado pelo aumento no estresse oxidativo (EO). Estuda-se uma relação positiva entre estresse oxidativo e o aumento do dano ao DNA os quais podem estar associados com o diabetes melitus tipo 2 e suas complicações. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da ingestão de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida (com a finalidade de torná-la enriquecida em AGEs), sobre parâmetros de resistência à insulina e estresse oxidativo, bem como diminuição na defesa antiglicante e aumento no dano ao DNA. Ratos machos com 8 semanas de vida foram submetidos a uma dieta controle, uma dieta hiperpalatável, aquecida (130°C/30minutos) ou não, durante quatro meses. Parâmetros metabólicos, dano ao DNA, atividade da enzima Glioxalase I, parâmetros de estresse oxidativo e quantificação da proteína RAGE foram avaliados. Os resultados são apresentados sempre em relação ao grupo controle. O consumo das dietas hiperpalatável (HP) e hiperpalatável aquecida (HPTD) levou a um aumento no peso corporal e tecido adiposo e diminuiu a tolerância à glicose. O grupo HPTD reduziu a síntese de glicogênio no fígado e a oxidação de glicose e síntese de lipídeos no tecido adiposo. Os grupos HP e HPTD apresentam aumento significativo peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas no fígado, rim e plasma e a diminuição dos grupos tiol não protéicos no fígado e rim, bem como mudanças na atividade das enzimas Catalase (CAT), diminuída em ambos tecidos, fígado e rim, e Superóxido dismutase (SOD), diminuída no fígado e aumentada no rim. O consumo das dietas causou um aumento na atividade da Glioxalase I no rim e a sua diminuição no fígado. Observamos ainda um aumento na quantificação da proteína RAGE no grupo HPTD no fígado. Dano ao DNA no sangue foi significativamente maior nos animais submetidos a uma dieta hiperpalatável, mas o dano provocado pela dieta aquecida foi ainda maior. A partir destes dados concluímos que a ingestão de uma dieta hiperpalatável prejudica a tolerância à glicose, altera parâmetros de estresse oxidativo e a defesa antiglicação, e aumenta o dano ao DNA. O processo de aquecimento agrava esta condição possivelmente pela elevação dos níveis de AGEs, confirmando o papel importante dos AGEs na patogênese das complicações do diabetes pelo aumento do estresse oxidativo e redução da defesa antiglicação.

ABSTRACT

In modern societies the consumption of high fat and high sugar diets as well as a sedentary life style has been associated with the increased of the incidence of diabetes and its complications. Diabetic complications appear to be multifactorial in origin, but in particular, the biochemical process of advanced glycation, which is accelerated in diabetes as a result of chronic hyperglycemia, has been postulated to play a central role in these disorders. Advanced glycation involves the generation of a heterogenous group of chemical moieties known as advanced glycated end-products (AGEs), this process occurring as a result of a non-enzymatic reaction of glucose interacting with proteins, lipids and nucleic acids, and involves key intermediates such as methylglyoxal. Advanced glycation end products (AGEs) are implicated in the complications of diabetes by alter the structure and function of molecules in biological systems and increase oxidative stress. Heat exposure of animal and human food is an important generator of variable amounts of glycoxidants, or advanced glycation end products, which are absorbed (about 10%) and partly are retained in the body or eliminated in the urine. An ingestion of an advanced glycation end products (AGEs) rich diet is accompanied by increased oxidative stress (OS) and induced inflammation. Many studies have demonstrated a positive relationship of oxidative stress and an increased in DNA damage, this may be associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its complications. The aim of this study was to investigate the acute effects of dietary AGEs on parameters of insulin resistance and redox state, as well as impairment of antiglycation defense, increased in RAGE and in DNA damage. Male rats 8 week old was submitted to a high palatable diet, heated (130°C/30minut) or not, during 4 month. Metabolic parameters, DNA damage, Glyoxalase I activity and oxidative stress status were evaluated. The high palatable diet (HP) and high palatable thermolyzed diet (HPTD) showed increased body weight and adipose mass, and impaired glucose tolerance at the studied time-points in glucose tolerance test (GTT). We show which HPTD have the capacity to reduce glycogen synthesis in liver and reduced glucose oxidation and lipid syntesis in adipose tissue. HP and HFTD promoted lipid peroxidation and protein carbonylation in kidney, liver and plasma, and oxidation of non protein thiol groups in kidney and liver, as well as change in catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and Glyoxalase I activity in kidney and liver. HFTD promoted increased im RAGE concentration in liver. Blood DNA damage was significantly higher in animals subjected to High palatable diets, and the highest damage was observed in animals that received the high palatable termolized diet. Ingestion of a high palatable diet impairs the glucose tolerance, altered the redox homeostase and antiglycation defense and increased DNA damage. And the thermolyzation process aggravates such a condition because of the elevated levels of AGEs, in addition to playing a role in the pathogenesis of diabetic complications by the impairs of redox homeostasis and reduced antiglycation defense. This model of treatment simulate a nutritional condition that is very common in an important percentage of the population, observed concerning the consequences of its consumption must be carefully evaluated and considered.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Mecanismo de indução da secreção de insulina pela glicose nas células β do pâncreas (Marchetti, P. et.al. 2008).....11
- FIGURA 2** - Lipotoxicidade: Inflamação crônica do tecido adiposo e o acúmulo intramiocelular de AGL. (Guilherme, A. et.al. 2008).....14
- FIGURA 3** - Glicotoxicidade: Superprodução mitocondrial de superóxido ativa quatro rotas responsáveis pelos danos da Hiperglicemia através da diminuição de GAPDH (Brownlee, M. 2004).....17
- FIGURA 4** - Os três passos da reação de Maillard, formação de AGES. (Lapolla, A. e cols, 2004).....19

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA – Ácido desoxirribonucléico

AGL – Ácidos graxos livres

AGEs – Produtos Finais de Glicação Avançada

CAT – Catalase

DM – Diabetes Mellitus

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

MG - Metilglioxal

NO· – Óxido Nítrico

O₂⁻ - Anion Superóxido

OH· – Radical hidroxil

PI-3K – Fosfatidil Inositol 3 Cinase

PKC – Proteína Cinase C

RAGE – Receptor de AGEs

RI – Resistência à Insulina

SOD – Superóxido Dismutase

TTG – Teste de tolerância à Glicose

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETE MELLITUS

O aumento do Diabete Melitus (DM) nas últimas décadas pode ser atribuído ao excesso da ingesta de alimentos altamente palatáveis (Smyth and Heron, 2006). Outros fatores importantes são obesidade, sedentarismo e o envelhecimento da população (Smyth and Heron, 2006). O número de diabéticos estimado pela WHO para o ano de 2005 foi de 217 milhões e para o ano 2030 o número estimado é de 366 milhões.

Mesmo com o aumento das estratégias terapêuticas, o custo do diabetes ainda é elevado. A mortalidade é cinco vezes maior em diabéticos do que em não diabéticos, e a hiperglicemia crônica, característica fisiopatológica do DM, é muito associada com danos em vários tecidos, especialmente coração, circulação sanguínea, retina, rins e nervos (American Diabetes Association, 2006 e 2001).

O número de casos do diabetes mellitus tipo 2 tem aumentado significativamente nos países ocidentais e está relacionado ao aumento da incidência da obesidade e sedentarismo (Zimmet, 2001).

Diabetes mellitus tipo 2 é caracterizado por hiperglicemia, acompanhada por resistência à insulina nos tecidos periféricos e deficiência na secreção de insulina pelas células β das ilhotas do pâncreas. Estes defeitos têm um componente genético reconhecido e também componentes adquiridos que incluem: idade, obesidade, sedentarismo, glicotoxicidade e lipotoxicidade (Kashayp & DeFronzo, 2007).

A primeira anormalidade observada é a diminuição na habilidade dos tecidos em responder à insulina (resistência à insulina) isso é contrabalanceado por um aumento compensatório da secreção de insulina pelas células β do pâncreas (hiperinsulinemia) para

manter a tolerância à glicose normal. A célula β responde a um aumento da glicose plasmática com um aumento da secreção de insulina, e esta resposta é modulada pela severidade da resistência à insulina. A hiperinsulinemia, desenvolvida em resposta a resistência à insulina, precede o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DeFronzo, 2004).

Enquanto as células β do pâncreas são hábeis em aumentar a secreção de insulina para compensar a resistência à insulina, a tolerância à glicose se mantém normal (Diamond, et.al 1995); contudo, com o tempo estas células começam a falhar. Inicialmente, os níveis pós-prandiais de glicose e subsequentemente as concentrações de glicose plasmáticas em jejum começam a aumentar, levando ao começo da manifestação do diabetes (Lillioja, et.al. 1988; Lyssenko, et.al. 2005).

Quando a concentração de glicose plasmática de jejum excede 140mg/dL (7.7mmol/L) a célula β não consegue manter por muito tempo a taxa de secreção de insulina e a sua concentração plasmática no jejum cai progressivamente, resultando em dano na tolerância à glicose e eventualmente diabetes do tipo 2. É importante notar que nestas concentrações de glicose, os níveis plasmáticos de insulina ainda se mantêm elevados, mas a hiperinsulinemia não é mais suficiente para compensar a severa resistência à insulina, levando ao estado de diabetes. Apenas, quando o estado de diabetes se deteriora ainda mais e as concentrações de glicose plasmática de jejum excedem valores de 180-200mg/dl (9.9-11.0 mmol/L) os níveis de insulina em resposta as quantidades de glicose tornam-se reduzidos em termos absolutos. Esta dinâmica entre a secreção de insulina e resistência à insulina já é bem estabelecida (Kashyap & DeFronzo, 2007).

1.2 RESISTÊNCIA À INSULINA

Encontra-se na literatura evidências quantitativas diretas que o desenvolvimento do DM está é associado com o desenvolvimento de resistência à insulina severa (DeFronzo, 2004).

No fígado, a resistência à insulina é manifestada pelo significativo aumento na glicogogênese que é responsável pela hiperglicemia (Gloop, et al., 1989).

Aproximadamente 80% do uso total de glicose pelo corpo ocorre no músculo esquelético em resposta ao aumento fisiológico de insulina no plasma. A resistência à insulina diminui a utilização da glicose mediante diminuição do transporte e redução da síntese de glicogênio (Kelley, et al., 2002).

Uma característica da resistência à insulina é o aumento de ácidos graxos livres (AGL) circulantes (Guilherme, et al., 2008). As células adiposas se tornam resistentes ao efeito antilipolítico da insulina. O aumento dos AGL estimula a produção hepática de glicose e prejudica o uso da glicose pelo músculo e fígado, além de inibir a secreção de insulina nas células β pancreáticas. Os ácidos graxos livres depositam-se em tecidos que não o adiposo, como no músculo esquelético, músculo cardíaco onde comprometem a sinalização da insulina (Hajer, et al., 2008).

Para que ocorra a ação da insulina é necessária primeiramente a sua ligação ao receptor de insulina através da fosforilação de resíduos de tirosina na cadeia β do receptor. Isso resultará na translocação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) para a membrana plasmática onde a sua interação com o receptor de insulina fará com que o IRS-1 também seja fosforilado em tirosinas, levando a ativação de enzimas como a PI 3K e Akt, resultando no transporte de glicose para dentro da célula, ativação da óxido nítrico sintase para vaso dilatação arterial e o estímulo de múltiplos processos metabólicos intracelulares. (Prada, et al.,

2005) A glicose livre que entra na célula é subsequentemente metabolizada por uma série de passos enzimáticos que também são regulados pela insulina. Destes os mais importantes são: fosforilação da glicose (catalisada pela hexoquinase), glicogênio sintase, (levando a síntese de glicogênio), fosfofrutocinase (PKF) e piruvato desidrogenase (PDH) que regulam a glicólise e a oxidação de glicose respectivamente (Saad, 1994). Ambos, defeito no receptor e na sinalização pós-receptor contribuem para a resistência à insulina em indivíduos com DM.

1.3 SECREÇÃO DE INSULINA

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pela célula β pancreática, sendo a glicose o secretagogo mais importante. A glicose é transportada para o interior da célula β pelo transportador Glut2. Após entrar na célula β , a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P). O destino preferencial da G-6-P é a glicólise. O metabolismo de glicose gera ATP, e a fração ATP/ADP aumenta no citoplasma. Essa relação ATP/ADP aumentada provoca o fechamento dos canais de potássio e a consequente despolarização da membrana celular que abre canais de cálcio, sensíveis à voltagem. O aumento do influxo de cálcio para a célula β resulta em despolarização da membrana plasmática desencadeando o processo exocitótico, onde as vesículas de insulina migram para a membrana plasmática para liberar insulina (Machetti, et al., 2008).

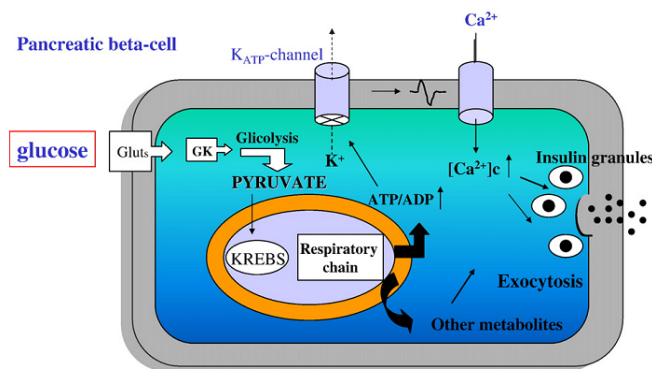


Figura 1: Mecanismo de indução da secreção de insulina pela glicose nas células β do pâncreas (Marchetti, P. et al., 2008)

Uma célula β funcional pode compensar a resistência à insulina por determinado tempo, mas a progressiva perda da sua função é crucial para o desenvolvimento da diabetes do tipo 2. Um conjunto de fatores genéticos e ambientais implica no progressivo prejuízo na secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Poitoutan & Robertson, 2008).

As células β pancreáticas estão em constante estado de mudança, com a contínua regeneração das ilhotas e simultânea apoptose celular. Muitas anormalidades interrompem o delicado balanço entre neogênese e apoptose das ilhotas. Pesquisas demonstram uma redução (50%) na massa das células β em pacientes com diabetes do tipo 2. Em modelos animais de diabetes, existem evidências de que a neogênese das ilhotas é reduzida e a apoptose das células β é acelerada (Wajchenberg, 2007; DeFronzo, 2009).

Os maiores fatores para progressiva perda do funcionamento das células β e a diminuição na sua massa são:

- O aumento na secreção de citocinas próinflamatórias responsáveis por causar apoptose, e a exposição crônica das ilhotas a leptina, também consideradas uma citocina próinflamatória (Otero, et al., 2005), levando a um aumento da liberação de IL-1 β que também gera apoptose;

- Diminuição na ação de hormônios incretinas, GIP e GLP-1. Estes hormônios são secretados das células endócrinas do duodeno e jejuno em resposta a ingestão de carboidratos, estimulando a secreção de insulina (Chang-Chen, et al., 2008);

- A hipersecreção do polipeptídeo amiloide das ilhotas (IAPP) e deposição amilóide nas células β , que é uma das características histopatológicas do diabetes tipo 2 e está correlacionado com a severidade e duração do DM2 (Butler, et al., 2003);

- E também a glicotoxicidade e lipotoxicidade (Marchetti, et al., 2008).

1.4 LIPOTOXIDADE

Através de vários estudos, pesquisadores demonstram uma forte relação entre o tecido adiposo subcutâneo e visceral com a resistência à insulina. O aumento do depósito de gordura nestes tecidos, principalmente no tecido visceral, é associado com diminuição da sensibilidade à insulina (Fontanal, et al., 2007; Canello, et al., 2006; Navasa, et al., 1998). Vários fatores presentes na obesidade (ácidos graxos livres elevados na circulação, diminuição de adiponectina e aumento da liberação de adipocitocinas) são responsáveis pela indução da resistência à insulina (Lazar, 2005).

A sensibilidade normal à insulina e a homeostase da glicose requerem um tecido adiposo funcional e em proporções adequadas ao tamanho corporal, para secreção apropriada de adipocitocinas que influenciam nos tecidos e no controle neuroendócrino, e para controle do armazenamento dos lipídeos como triglicérides. Alterações no tecido adiposo mudam a dinâmica entre liberação e utilização dos ácidos graxos por outros tecidos (Després & Lemieux, 2006).

O tecido adiposo é um importante órgão endócrino que secreta muitas substâncias biologicamente ativas como leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e

proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), denominadas adipocitocinas. Em indivíduos obesos há uma produção desregulada de adipocitocinas próinflamatórias e antiinflamatórias. Matsuzawa, et al., (1999) e Hotamisligil, et al., (1993) demonstraram que no tecido adiposo de indivíduos obesos há um aumento na secreção de TNF- α e MCP-1 e uma diminuição na secreção de adiponectina, e estas alterações inflamatórias podem contribuir para o desenvolvimento de diabetes e arterosclerose. Weisberg, et al., (2003) e Xu, et al., (2003) demonstraram um aumento da infiltração de macrófagos no tecido adiposo de obesos. Macrófagos são importantes fontes de inflamação no tecido adiposo, contribuindo para a elevação de marcadores inflamatórios na circulação, incluindo TNF- α e IL-6. A natureza inflamatória do tecido adiposo na obesidade é considerada um possível mecanismo para resistência à insulina (Suganami, et al., 2005).

Ácidos graxos livres aumentados na circulação levam ao acúmulo de triglicerídeos e ácidos graxos ativados na forma de AcilCOA de cadeia longa e diacilglicerol (DAG) no músculo, fígado e células β pancreáticas prejudicando o metabolismo normal nestes tecidos (Guilherme, et al., 2008).

No músculo esquelético ácidos graxos livres prejudicam o transporte de glicose e fosforilação, através de um mecanismo que envolve acúmulo intramiocelular de DAG, ácidos graxos AcilCOA de cadeia longa, ativação da PKC e diminuição da fosforilação em tirosina do substrato receptor de insulina IRS-1 e 2 (Chunli Yu, 2002).

No fígado, o mecanismo pelo qual os ácidos graxos livres causam resistência à insulina é via ativação da PKC- ξ . O aumento da concentração de insulina e glicose inibem a oxidação de ácidos graxos livres (via aumento da formação de Malonil-CoA) que leva a um aumento na viabilidade citosólica de AcilCoA de cadeia longa para esterificação e aumento na formação de DAG que ativa PKC- ξ .

Nas células β , o aumento da oxidação de ácidos graxos livres diminui a atividade da Piruvato Desidrogenase (PDH) causando diminuição da oxidação da glicose. Aumento de ácidos graxos livres diminui a produção de insulina pelas células β , inibem a expressão do RNA mensageiro da insulina, diminui o estímulo pela glicose para liberação de insulina e o conteúdo de insulina nas ilhotas (Carpentier, et al., 2000).

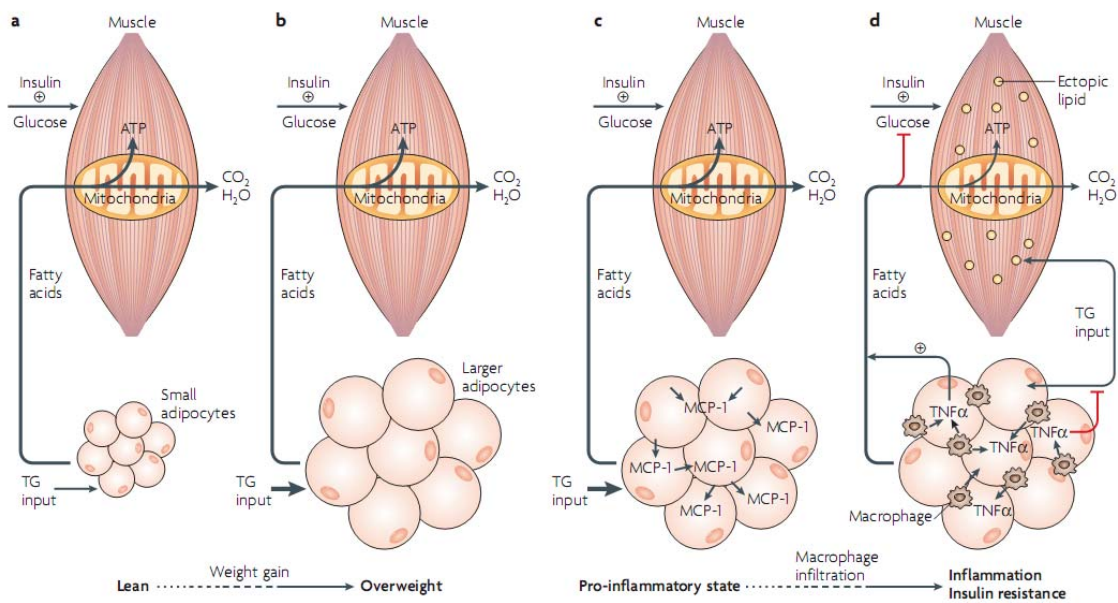


Figura 2: Lipotoxicidade: Inflamação crônica do tecido adiposo e o acúmulo intramiocelular de AGL (Guilherme, A. *et al.*, 2008).

1.5 GLICOTOXIDADE

A Glicotoxicidade consiste em danos estruturais e funcionais causados nas células β pancreáticas e em tecidos alvo da insulina, pela hiperglicemia crônica. Nas células β pancreáticas a concentração de glicose é o maior determinante para regulação da sua função. Células β pancreáticas expostas a altas concentrações de glicose *in vitro* têm a transcrição genética da insulina prejudicada, levando a uma diminuição da sua síntese e secreção (DeFronzo, 2004).

Glicotoxicidade causa disfunção e altera a massa das células β . Os mecanismos propostos incluem disfunção mitocondrial com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A geração de EROs ativa rotas como a do fator de transcrição NF- κ B, c-jun N-terminal cinase (JNK) e hexosaminas. A ativação de JNK inibe a sinalização da insulina via fosforilação de IRS-1 em serina 307. Outro mecanismo proposto é o aumento nos níveis intracelulares de cálcio que são considerados pró-apoptóticos. A produção de IL – 1 também é considerada uma rota apoptótica ativada pela glicose.

Em outros tecidos alvo, células sem habilidade de controlar o transporte de glicose, quando expostas a hiperglicemia, aumentam sua concentração intracelular e ativam vias alternativas.

Com o aumento da concentração de glicose no interior da célula, mais glicose é oxidada no Ciclo de Krebs, levando a um aumento na relação NADH/NAD⁺ e FADH₂/FAD que doarão seus elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Com isso o gradiente de voltagem pela membrana aumenta atingindo um limiar crítico. Neste ponto a transferência de elétrons no complexo III da cadeia é bloqueada, causando o retorno dos elétrons para coenzima Q que transfere os elétrons para oxigênio molecular, gerando superóxido (Brownlee, 2004).

Esta superprodução de superóxido pela mitocôndria diminui a atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) pela ativação da enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP). O aumento de EROs na mitocôndria induz dano ao DNA e assim ativando PARP. Através da diminuição da atividade da enzima GAPDH há um aumento da concentração de metabolitos glicolíticos anteriores a ela, como gliceraldeído-6-fosfato, frutose-6-fosfato e glicose.

Aumento da concentração de gliceraldeído-3-fosfato ativa a rota de formação de AGEs, isto porque o maior precursor intracelular de AGEs, metilglioxal, é formado a partir de

gliceraldeído-3-fosfato. Também ativa a enzima PKC, pelo aumento na formação de DAG a partir de gliceraldeído-3 fosfato. Quando PKC é ativada ela demonstra vários efeitos na expressão de genes, como por exemplo, diminuição da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e aumento de endotelina-1, além de ativação de Nf-KB e da NAD(P)H oxidase (Brownlee, 2004).

O aumento da concentração de Frutose-6-fosfato leva ao aumento do fluxo através da rota das hexosaminas onde Frutose-6-fosfato é convertida pela enzima Glutamina frutose-6-fosfato amidotransferase (GFAT) em UDP-N-acetilglicosamina resultando em mudanças patológicas na expressão genética (Sayeski, et AL., 1996).

Além disso, o aumento intracelular de glicose aumenta o fluxo pela via do poliól. A enzima Aldose redutase tem a função de reduzir aldeídos tóxicos na célula em alcoóis inativos. Quando a concentração de glicose na célula é muito alta, a Aldose redutase também reduz glicose a sorbitol, o qual é oxidado a frutose. Neste processo, a enzima consome NADPH, um cofator essencial para regenerar a glutatona reduzida, um potente antioxidante. Diminuindo a quantidade de glutatona reduzida, a via do poliól aumenta a susceptibilidade de desenvolvimento de estresse oxidativo intracelular (Lee, et al., 1999).

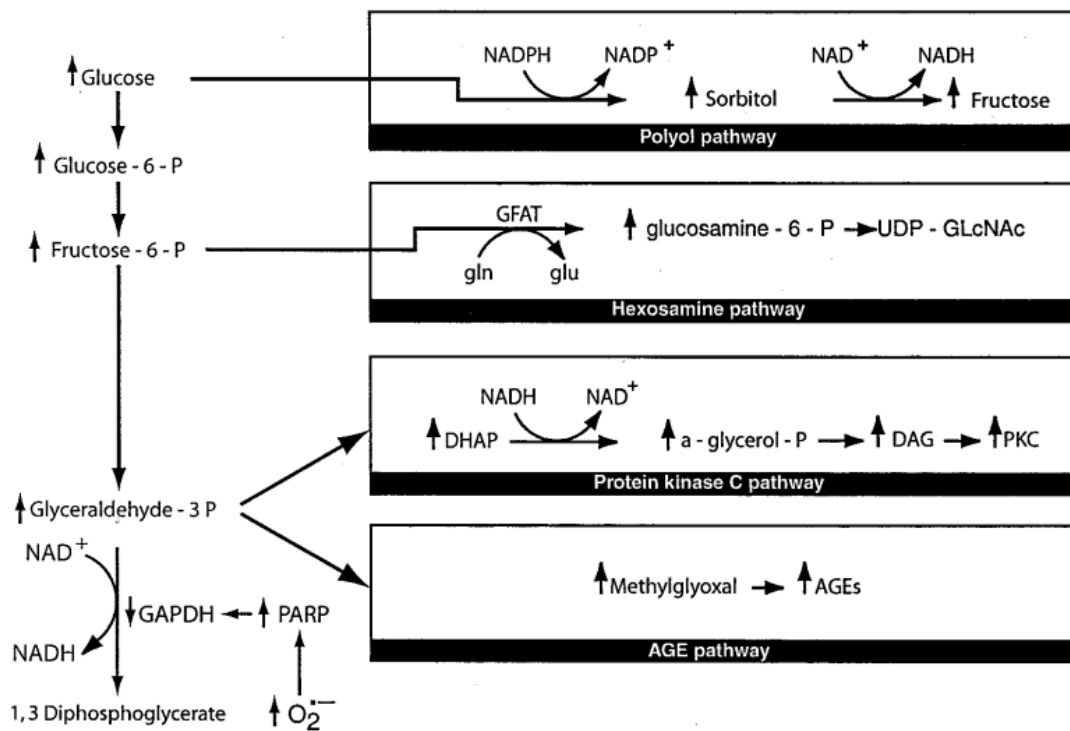


Figura 3: Glicotoxicidade: Superprodução mitocondrial de superóxido ativa quatro rotas responsáveis pelos danos da Hiperglicemia pela diminuição de GAPDH (Brownlee, M. 2004).

1.6 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGEs)

AGEs constituem um grupo de moléculas heterogêneas produzidas endogenamente pela glicação não enzimática de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Alguns fatores são cruciais para a formação de AGEs, a taxa de renovação das proteínas, o nível de hiperglicemia e o estresse oxidativo. Se uma destas condições está presente, ambas, proteínas intracelulares e extracelulares são passíveis de serem glicadas e oxidadas.

Existe um consenso geral de que muitas fontes e mecanismos de formação dos AGEs in vivo envolvem vias oxidativas e não oxidativas como, a reação de Maillard, bases de Schiff, aductos de Amadori, ácido ascórbico e intermediários metabólicos (Baynes & Thorpe, 1999). Os AGEs também podem ser formados a partir de intermediários α -dicarbonil

altamente reativos, conhecidos como Glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona (Yen Goh & Cooper, 2008).

1.6.1 Formação endógena

1.6.1.1 Reação de Maillard

A glicação não enzimática de proteínas, reação de Maillard, é um processo que relaciona a hiperglicemia crônica às alterações fisiopatológicas consideradas importantes no desenvolvimento das complicações do diabetes. A reação de Maillard é subdividida em três estágios: estágio inicial, intermediário e tardio.

No estágio inicial a glicose (ou outros açúcares redutores como frutose, pentose, galactose, manose, xilulose) reagem com o grupo amino livre de várias moléculas incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos formando um composto aldimina instável, a Base de Schiff. Através de um rearranjo esta base origina uma cetoamina estável, o Produto de Amadori. Esta reação não requer a participação enzimática e as variáveis que a regulam *in vivo* são as concentrações de glicose e proteínas, a meia vida das proteínas, a sua reatividade em termos de grupo amino livre e a permeabilidade celular por glicose (Lapolla, et al., 2004).

No estágio intermediário, através de reações de oxidação e desidratação, os Produtos de Amadori são degradados em uma variedade de compostos dicarbonil (glioxal, metilglioxal, deoxiglicosonas) que são muito mais reativos do que os açúcares que lhes deram origem como propagadores da reação, reagindo novamente com grupos amino livres de proteínas.

Os compostos dicarbonil podem ser gerados endogenamente por rotas que estão relacionadas a várias patologias como autooxidação da glicose, oxidação do DNA, peroxidação lipídica e deficiência de tiamina. A hiperglicemia leva a um aumento no nível de glioxal e metilglioxal no sangue. Metilglioxal é formado a partir do intermediário da glicose gliceraldeído-3-fosfato, mas também da peroxidação lipídica e catabolismo da treonina. Estes

compostos reagem com constituintes celulares para formar AGEs diretamente. Os compostos dicarbonil tem uma meia-vida relativamente longa (minutos a horas) e atravessam facilmente a membrana plasmática, deste modo atuando longe do seu local de produção, e modificando moléculas alvo dentro e fora da célula. O acúmulo de compostos dicarbonil é chamado de estresse carbonil (Thornalley, et al.,1999).

No estágio final, os propagadores reagem com grupo amino livre e através de reações de oxidação, desidratação e ciclização, formam os compostos amarelo – marrom, insolúveis e irreversíveis, usualmente chamados de Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) (Basta et al., 2004; Lapolla et al., 2004; Weijing et al., 2002).

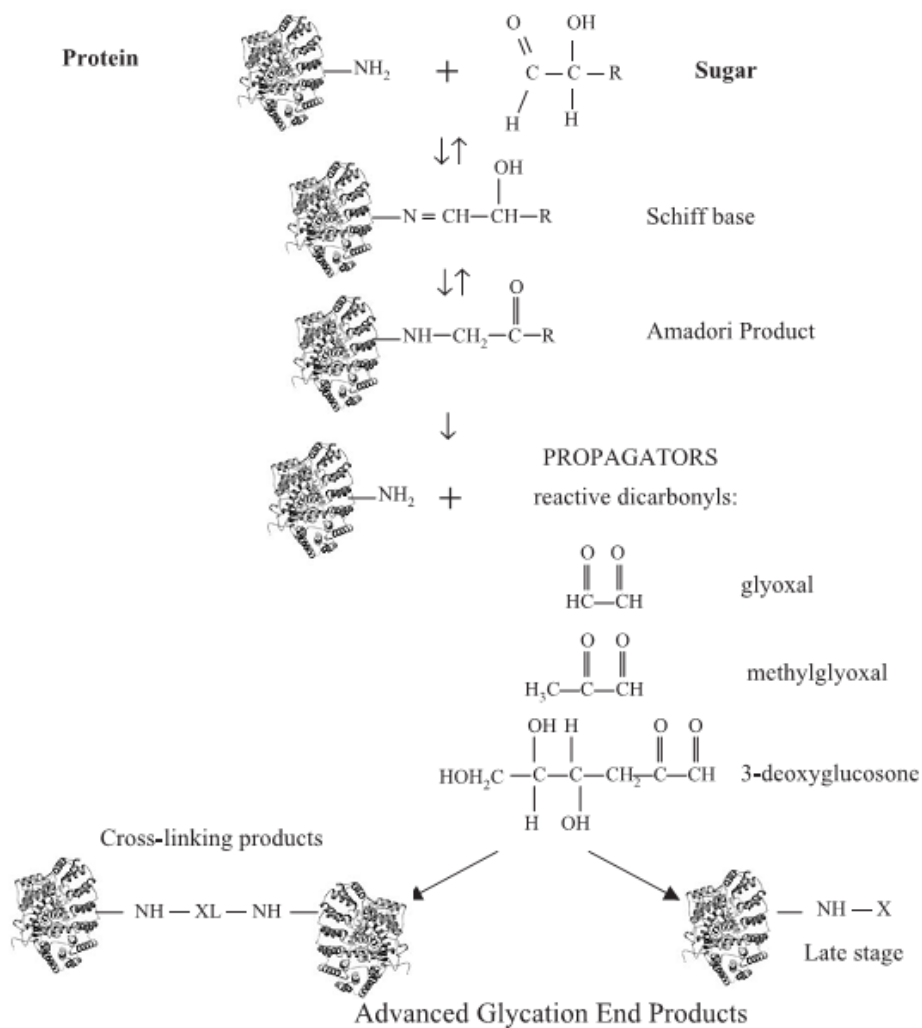


Figura 4: Os três passos da reação de Maillard, formação de AGEs (Lapolla, A. et AL., 2004).

1.6.1.2 Processos Oxidativos

Processos de oxidação também são importantes na formação dos AGEs. A hipótese de glicooxidação, introduzida em 1991, propõem um papel geral do estresse oxidativo nesta formação. Produtos da glicooxidação como pentosidina e Carboximetilisina (CML), são descritos como subclasses de AGEs formados por reações oxidativas. Desde 1987 os produtos de Amadori foram considerados intermediários essenciais na formação de AGEs e um precursor direto das espécies dicarbonil. Wolff e colegas (1987) argumentam, contudo, que autooxidação da glicose, descrita como glicosilação autooxidativa é a maior rota para formação dos AGEs nos tecidos, e também propuseram que ascorbato e outros carboidratos, incluindo a frutose e intermediários metabólicos, poderiam ser importantes fontes de AGEs (Barney & Thorpe,1999).

Existem dois mecanismos pelos quais estes processos ocorrem, ambos catalizados por metais como ferro ou cobre: o primeiro envolve a auto-oxidação de açúcares livres na presença de oxigênio e metais livres, levando a formação de compostos dicarbonil mais reativos, que reagem com proteínas para formar cetoaminas altamente reativas; o segundo mecanismo envolve os produtos da reação de Amadori que na presença de oxigênio e metal livre são oxidados e dão origem a enedíois e compostos dicarbonil altamente reativos que podem gerar AGEs. (Lapolla, et al., 2004).

1.6.2 Formação exógena

Além da sua formação endógena, os AGEs também podem ser originados de fontes exógenas como o tabaco e a fumaça da combustão dos combustíveis dos veículos automotores, e a partir da dieta. A alimentação é a principal fonte de AGEs exógenos,

principalmente alimentos ricos em lipídeos e proteínas que passam por processos de aquecimento prolongado (Negrean, et al., 2007).

Aproximadamente, 10% dos AGEs ingeridos são absorvidos e dois terços são depositados nos tecidos, onde eles permanecem biologicamente ativos e exercem seus efeitos patológicos (Koschinsky, et al., 1997).

Composição nutricional, temperatura, método e tempo da aplicação de calor afetam a geração de AGEs nos alimentos durante o cozimento. Alimentos com altas concentrações de lipídeos e proteínas contêm maiores quantidades de AGEs. Alimentos que apresentam na sua composição grandes quantidades de carboidratos como amido, frutas, vegetais e leite contêm baixas quantidades de AGEs. Contudo, dentro deste grupo, lanches preparados comercialmente, como biscoitos, waffles, demonstram conter quantidades maiores de AGEs (Goldberg, et al., 2004).

A temperatura e o método de cozimento parecem ser mais importantes para formação de AGEs do que o tempo de cozimento. Isto foi evidenciado pelos altos valores de AGEs encontrados em alimentos grelhados e fritos a 230°C durante um curto período quando comparado com alimentos cozidos em ambiente líquido por longos períodos. Os AGEs da dieta constituem um fator de risco ambiental crônico para o aumento de danos nos tecidos (Goldberg, et al., 2004).

1.6.3 Danos causados pelos AGEs

Os três mecanismos pelos quais os AGEs causam dano tecidual são a modificação de proteínas intracelulares, incluindo proteínas envolvidas na transcrição genética; a difusão dos precursores de AGEs para fora das células, modificando moléculas da matriz extracelular e causando mudanças na sinalização entre a matriz e a célula, o que pode levar a disfunções celulares; e por fim, os precursores de AGEs saem da célula e se ligam a proteínas no sangue

como por exemplo a albumina. Estas proteínas modificadas podem ligar-se ao receptor de AGES (RAGE), na superfície celular resultando na ativação da sinalização pós receptor, causando produção de radicais livres e ativação da expressão genética, tendo como consequência o aumento do estresse oxidativo e a resistência à insulina (Brownlee, 2004).

1.6.3 Receptores de AGEs

Vários receptores para AGEs já são bem conhecidos e caracterizados. O mais importante receptor, denominado receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) foi identificado pela primeira vez em células endoteliais como um receptor de superfície para os AGEs. RAGE é um membro da família de receptores das imunoglobulinas (Yan, et al., 2009).

Quando AGEs se ligam a este receptor ocorre a ativação de várias cascatas de sinalização intracelulares que podem prejudicar o funcionamento celular. Estes achados ligam RAGE a hiperglicemia e a consequências distintas relacionadas ao acúmulo e produção acelerada de AGEs, tais como envelhecimento, insuficiência renal e inflamação.

AGEs circulantes podem interagir com RAGE endoteliais, levando ao dano nas propriedades celulares pela ativação do fator de transcrição NF- κ B. Ativação de RAGE pelos AGEs dá início a transdução de múltiplos sinais tais como NAD(P)H oxidase, a via das MAP cinases, resultando na ativação e translocação de fatores de transcrição nucleares. Entre eles estão endotelina-1, molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e citocinas pró-inflamatórias incluindo IL-1, IL-6 e TNF- α (Goh & Cooper, 2008).

Outros receptores, como RAGE-R1 (oligossacaril transferase -48) RAGE -R2 (80K-fosfoproteína) e RAGE-R3 (Galectina - 3) e receptores classe A scavengers de macrófagos I e

II, também são capazes de reconhecer e ligar AGEs, mas não são responsáveis pela transdução de sinais, mas sim por causar endocitose e detoxificação de AGEs (Schmidt, et al., 2001).

1.6.5 Defesa celular contra glicação

1.6.5.1 Sistema Glioxalase

O sistema Glioxalase é composto de duas enzimas Glioxalase I e Glioxalase II. Glioxalase I age no hemetioacetato (formado pela reação não enzimática entre 2-oxaldeído e GSH) para formar derivados de hidroxilacilglutathiona que são convertidos pela glioxalase II em α -hidroxiácidos regenerando GSH, prevenindo assim o estresse carbonil e seus efeitos deletérios. É importante salientar que o aumento do estresse oxidativo é responsável pela ativação da glutathiona peroxidase, que depleta as concentrações de GSH através da redução de H_2O_2 em H_2O , conseqüentemente diminuindo a atividade da Glioxalase I, que é dependente das concentrações de GSH (Thornalley, 2003).

Outras rotas menores de detoxificação para compostos dicarbonil são catalisadas por redutases como aldeído redutase, aldose redutase e carbonil redutase. Todas estas enzimas têm ampla especificidade pelo seu substrato, estão localizadas no citosol e requerem NADPH ou NADH como co-fator (Thornalley, 2003).

1.7 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem superóxido ($\cdot O_2^-$), radical hidroxil ($\cdot OH$) e peroxil ($\cdot RO_2$), e espécies não radicalares como hidrogênio peróxido (H_2O_2) e ácido hidrócloro (HOCl). Também existem

espécies reativas de nitrogênio que são produzidas em rotas similares as dos EROs e incluem o radical óxido nítrico (NO_2^-) e os não radicais peróxido nitrito (ONOO^-), óxido nitroso (HNO_2) e peroxidonitrito alcalino (RONOO).

O superóxido é formado pela univalente redução do oxigênio molecular. Este processo pode ser mediado por enzimas como NAD(P)H oxidase e xantina oxidase ou pode ocorrer não enzimaticamente por compostos redox reativos como o composto semi-ubiquinona da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. A enzima Superóxido dismutase converte superóxido em peróxido de hidrogênio. Na presença de metais de transição (ex.: ferro), o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxil reativo (OH^\cdot). Alternativamente peróxido de hidrogênio pode ser convertido em água pelas enzimas catalase ou glutathione peroxidase (Halliwell & Gutteridge 1990; Halliwell 2001).

As espécies reativas possuem um papel fisiológico importante, pois são fatores essenciais no metabolismo normal. Um grande número de funções celulares parecem ser reguladas por radicais livres, que também podem atuar como sinalizadores intracelulares e intercelulares. H_2O_2 é considerado um segundo mensageiro para a ativação do fator NF- κ B em alguns tipos celulares (Halliwell 2001; Bowie & O'Neill 2000) e o ON pode atuar como um neurotransmissor e neuromodulador (Esplugues 2002; Hobbs 1999).

Definido como o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante, resultando no acúmulo de produtos oxidativos, o estresse oxidativo é um processo bem conhecido que desempenha um papel importante em muitas condições patológicas. Várias doenças humanas têm sido relacionadas ao aumento do estresse oxidativo.

1.7.1 Danos provocados pelo aumento de EROs

Um dos maiores efeitos tóxicos do excesso de EROs é o dano a membrana celular pelo processo de peroxidação lipídica. Espécies reativas como HO \cdot , HO $_2^-$ e OONO $^-$ podem extrair um H do metileno (-CH $_2$) originando o carbono radical -CH \cdot o qual atrai outros -CH $_2$ - das moléculas de lipídeos, criando uma cadeia de reações que alteram a fluidez e a forma da membrana. Peroxidação lipídica também pode causar dano ao DNA e proteínas, uma vez que o ataque ao DNA por EROs resulta em quebra de suas cadeias. Além da ação direta do dano oxidativo, indiretamente o corte e a quebra do ADN podem levar a ativação de Poli-ADP-polimerase (PARP) que pode alterar a expressão genética, replicação do DNA e pode levar a apoptose. As proteínas também são alvo das EROs. Oxidação de proteínas leva a alteração em receptores, função enzimática e rotas de transdução de sinais (Negre-Salvayre, et al., 2009).

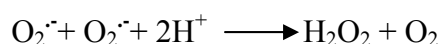
1.7.2 Defesas Antioxidantes

O organismo humano dispõe de um potente mecanismo celular de defesa contra as ERO. São as chamadas defesas antioxidantes primárias, que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e outras que não participam diretamente do processo, mas fornecem suporte à GPx, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a glutathione redutase (GR) (Halliwell & Gutteridge, 2000; Droge, 2002). Além das defesas enzimáticas existem ainda antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), flavonóides e outras moléculas como N-acetilcisteína e glutathione. Esses antioxidantes agem principalmente bloqueando a cadeia de peroxidação lipídica, eliminando oxigênio ou quelando íons metálicos (Sies, 1993). Também podemos citar as tioredoxinas, oxidoreduções

disulfetos que participam da manutenção da homeostase redox tiol (Koháryová & Kolárová, 2008).

1.7.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

Mecanismos protetores estão envolvidos na defesa antioxidante. Uma das enzimas fundamentais nesta defesa é a Superóxido Dismutase (SOD) que catalisa a reação de conversão do superóxido em H₂O₂ e oxigênio através da reação:



Existem quatro classes de SOD: SOD1 cobre/zinco, isoforma presente no citosol, SOD2 manganês, isoforma presente na mitocôndria, e SOD3 cobre/zinco e SOD-Ni presentes no espaço extracelular (Maté, et al., 1999).

1.7.2.2 Catalase (CAT)

O peróxido de hidrogênio por si só não é um radical, mas é considerado uma ERO. Uma vez que é mais instável do que o superóxido e pode cruzar a membrana. Além disso, na presença de ferro na forma ferrosa (Fe²⁺), o H₂O₂ pode ser reduzido em radical HO· altamente reativo. H₂O₂ é reduzido a água pela enzima Catalase.

A enzima catalase é uma ferrihemoenzima formada por quatro unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético de heme no centro catalítico e a ativação destes tetrâmeros é dependente de NADPH (Halliwell & Whitman, 2004; Halliwell, 2001). A principal fonte de NADPH é reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), a primeira reação da via das pentoses.

1.7.2.3 Sistema Glutaciona

O H_2O_2 também pode ser detoxificado por uma seleno-enzima a glutaciona peroxidase (GPx). A sua ação está baseada na oxidação de glutaciona (GSH) ao seu dissulfeto correspondente GSSG. A razão entre GSH e GSSG em células normais é alta, pois existe um mecanismo de redução da GSSG que é catalisado pela enzima glutaciona redutase (GR) (Chance et al 1979). A glutaciona desempenha também um importante papel na detoxificação de xenobióticos e vários compostos endógenos, como prostaglandinas, leucotrienos e hidroperóxidos orgânicos, através de reações mediadas pela glutaciona transferase (Halliwell, 2001).

1.7.3 Fontes de EROs no diabetes

Cadeia transportadora de Elétrons: O ultimo destino da maior parte da glicose que entra na célula é ser oxidada via ciclo de Krebs produzindo equivalentes de redução para produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons.

Mudanças excessivas na concentração intracelular de glicose quando expostas a hiperglicemia, levam a produção de superóxido pela cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Nas células diabéticas com a alta concentração de glicose, mais glicose é oxidada no ciclo de Krebs o que leva a um aumento de doadores de elétrons (NADH e FADH₂) para cadeia transportadora. Como resultado, o gradiente de voltagem pela membrana mitocondrial aumenta e níveis críticos são atingidos. Neste ponto a transferência de elétrons através do complexo III da cadeia é bloqueada causando o retorno dos elétrons para coenzima Q que doa estes elétrons para o oxigênio molecular gerando superóxido. A isoforma mitocondrial da superóxido dismutase degrada este superóxido em peróxido de hidrogênio,

que é convertido em água e O₂ por outras enzimas. A mitocôndria também utiliza ácidos graxos livres para gerar equivalentes de redução para fosforilação oxidativa e o excesso de ácidos graxos livres pode repetir o defeito induzido pela hiperglicemia na cadeia transportadora de elétrons (Brownlee, 2004).

Desacopladores da cadeia respiratória: O desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons diminui a síntese de ATP e aumenta o vazamento de elétrons para o oxigênio formando superóxido. Rudofsky et al., (2006) sugerem que em tecidos neurais e em células endoteliais da retina de indivíduos diabéticos tem sugerido que a expressão elevada de proteínas desacopladoras é responsável pelo retorno dos elétrons na cadeia respiratória e a formação de superóxido.

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH): G6PDH está envolvida no ciclo das pentoses. O ciclo das pentoses é responsável pela síntese de ribose, e é a principal fonte de NAD(P)H para célula. Zhang et al., (2000) demonstram que alterar a atividade da G6PDH resulta em estresse oxidativo, pela diminuição de antioxidantes como glutathiona.

Rota do sorbitol: A enzima citosólica aldose redutase converte a glicose em alta concentração em sorbitol usando NAD(P)H derivado do ciclo das pentoses como cofator. Durante a hiperglicemia, o consumo de NAD(P)H por esta reação diminui a concentração de glutathiona reduzida, que é requerida para manter a atividade da glutathiona peroxidase, diminuindo a atividade celular antioxidante. Sorbitol é oxidado a frutose via sorbitol desidrogenase, o que reduz NAD⁺ em NADH, provendo aumento em substrato para o complexo I da cadeia respiratória da mitocôndria e aumentando a formação de EROs através da mesma (Forbes, et al., 2008).

Produtos finais de Glicação Avançada (AGEs): Excesso de EROs é gerado durante a formação de AGEs em doenças como diabetes. AGEs podem se ligar ao seu receptor RAGE promovendo inflamação via ativação do fator nuclear NF-κB, produção de IL – 1β e TNF-α.

A geração citosólica de EROs acontece via ativação de RAGE e subsequente ativação da NAD(P)H oxidase. Os AGEs podem também se ligar e modificar proteínas como MnSOD alterando a atividade da enzima, contribuindo para o excesso de EROs.

NAD(P)H oxidase: NAD(P)H oxidase é um complexo enzimático citosólico descoberto em neutrófilos, onde ela atua de maneira vital na defesa contra patógenos visitantes através da produção de superóxido na ordem do milimolar. Ela existe também em outros tecidos que não células fagocíticas. A ligação de citocinas pró-inflamatórias e hormônios como TNF- α e angiotensina II, ativam a enzima aumentando a produção de EROs, contribuindo para o estresse oxidativo celular (Bashan, et al., 2009).

Xantina Oxidase: Xantina oxidase é a enzima que catalisa a oxidação de hipoxantina em ácido úrico usando oxigênio molecular como aceptor de elétrons, liberando um número considerável de EROs incluindo $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ e H_2O_2 . Em condições normais a atividade da enzima é imensurável em muitas células. Porém no diabetes ela é uma fonte importante de geração de superóxido vascular (Forbes, et al., 2008).

Óxido Nítrico Sintase: Existem três isoformas de NOS: a induzida (iNOS), a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS). Cada uma destas isoformas requer cinco cofatores prostéticos como Flavina mononucleotídeo (FMN), bihidropterina (BH_4) calmodulina e flavina adenina dinucleotídeo (FAD) para produzir óxido nítrico. No diabetes o desacoplamento de NOS juntamente com a restrição de substrato (L-arginina), e viabilidade ou falta de cofatores, leva a geração de superóxido em detrimento ao óxido nítrico (Bashan, et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Dados na literatura, incluindo trabalhos do nosso grupo, mostram que a ingestão de uma dieta hiperpalatável tem efeitos adversos na sobre a sensibilidade da insulina, aumentando a adiposidade e induzindo resistência à insulina (Souza, et al., 2007; Gang Hu, et al., 2004; Holemans, et al., 2004). Além disto, dietas hiperpalatáveis aquecidas, promovem a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). O consumo de uma dieta rica em AGEs é acompanhada pelo aumento concomitante de estresse oxidativo e marcadores de inflamação, considerados os maiores fatores de risco para o desenvolvimento das complicações do diabetes. Assim, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e uma dieta hiperpalatável aquecida (130°C/30minutos) sobre parâmetros de resistência à insulina periférica, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA.

2.2 Objetivos específicos

A) Analisar os efeitos das dietas sobre a resistência à insulina periférica:

- Determinar a massa corporal total dos ratos com 60 dias de vida e após os 4 meses de dieta e da massa adiposa após 4 meses de dieta;
- Determinar as concentrações hepáticas de triglicerídeos e glicogênio;
- Realizar teste de tolerância à glicose;
- Determinar as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e HDL, glicose e ácidos graxos livres circulantes; e as atividades das transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT);

- Determinar a síntese de glicogênio hepático a partir de glicose; e a oxidação da glicose a CO₂ e a síntese de lipídios a partir da mesma em adipócitos;

B) Verificar os efeitos das dietas sobre parâmetros de estresse oxidativo:

- Peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, grupamentos sulfidril protéicos e não protéicos em fígado, rim e plasma;

- Atividades das enzimas que modulam a atividade antioxidante Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT) em fígado e rim;

C) Verificar os efeitos das dietas sobre a defesa antiglicação:

- Atividade da enzima Glioxalase I em fígado e rim;

D) Verificar os efeitos das dietas sobre dano ao DNA através da técnica de ensaio Cometa em sangue.

PARTE II

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Nesta parte do trabalho apresentarei os resultados na forma de artigos científicos. Serão submetidos para publicação dois artigos, apresentados a seguir. Todos os dados foram coletados de modelo experimental onde animais com 60 dias de vida foram submetidos, durante um período de quatro meses, a um modelo de dieta hiperpalatável e hiperpalatável aquecida a 130°C/30min, com a finalidade de torná-la enriquecida em AGEs. Verificamos parâmetros de estresse oxidativo em plasma, fígado e rim. Dano ao DNA em sangue. Também foram avaliados parâmetros de resistência à insulina periférica: Teste de tolerância a glicose, parâmetros bioquímicos em soro (AGL, glicose, Colesterol, HDL, AST e ALT, triglicerídeos) e fígado (concentração de glicogênio e triglicerídeos), síntese de glicogênio a partir de glicose no fígado, síntese de lipídeos e oxidação de glicose em tecido adiposo. Defesa antiglicação foi avaliada pela atividade da enzima Glioxalase I e quantificação do conteúdo imunoprotéico de RAGE.

CAPÍTULO I

“Ingestion of a highly palatable thermolyzed diet promotes insulin resistance and alters redox environment and glycation defense in rat liver”

Débora Kurrle Rieger¹, Adriano Martimbianco Assis¹, Aline Longoni dos Santos¹, Cíntia E. Battú², Cristiane Denardin¹, Fernanda Hansen¹, Liane N Rotta^{3,4}, Regina P. Pureur¹, Diogo Onofre de Souza¹, Carlos Alberto S Gonçalves^{1,2}, Marcos Luiz S. Perry^{1,2}

Ingestion of a highly palatable thermolyzed diet promotes insulin resistance and alters redox environment and glycation defense in rat liver

Débora K. Rieger¹, Adriano M. Assis¹, Aline L. dos Santos¹, Cíntia E. Battú², Cristiane Denardin¹, Fernanda Hansen¹, Liane N Rotta^{3,4}, Regina P. Pureur¹, Diogo O. Souza¹, Carlos A. Gonçalves¹, Marcos L. S. Perry¹

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

² Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul Brazil.;

³ Programa de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil;

⁴ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Rio grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Marcos Luiz Santos Perry

Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5551

Fax: +55 51 3308 5540

E-mail: marcos.perry@gmail.com

Abstract

Ingestion of an advanced glycation end products (AGEs)-rich diet is accompanied by increased oxidative stress (OS) and induced inflammation. The aim of this study was to investigate the acute effects of dietary AGEs on peripheral insulin sensitivity, antiglycation defense and its relation to the redox state of the liver. Rats (male, 60 days old) were submitted to a highly palatable diet, heated (130°C/30 min) or unheated, over a 4-month period. Metabolic parameters and oxidative stress status were evaluated. The animals that received a highly palatable diet (HP) and highly palatable thermolyzed diet (HPTD) showed increased body weight and impaired glucose tolerance at the studied time-points in glucose tolerance test (GTT). We showed that the HPTD has the capacity to reduce glycogen synthesis in liver and that it reduced glucose oxidation and lipid synthesis in adipose tissue. HP and HFTD promote lipid peroxidation, protein carbonylation and oxidation of protein thiol groups as well as change in catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glyoxalase I activity in liver. These results show an important correlation between a highly palatable termolized diet, antiglycation defense and oxidative stress.

Keywords: Diabetes, AGEs, oxidative stress, antiglycation defense.

Introduction

In rodents and humans, dietary intake of high amounts of fat has been shown to have adverse effects on insulin sensitivity. Indeed, a more palatable cafeteria diet closer to the Western diet (WD) has been associated with increased adiposity and insulin resistance in humans (1). It has been widely established that insulin resistance precedes the development of overt hyperglycemia. Diverse variables are involved in the metabolic effects of hyperglycemia. Hyperglycemia fosters the endogenous nonenzymatic glycoxidation of proteins, lipids, and nucleic acids and results in the accumulation of heterogeneous molecules known as advanced glycation end products (2).

Advanced glycoxidation end products (AGEs) constitute a group of heterogeneous compounds produced endogenously from the nonenzymatic glycation of proteins, lipids, and nucleic acids (Maillard reaction). In addition, AGEs can also form from lipid peroxidation. Compounds resulting from this reaction are termed advanced lipoxidation end products (ALEs) (3).

Production of intracellular AGEs precursors damages target cells by three general mechanisms. First, intracellular proteins modified by AGEs have altered functions. Second, extracellular matrix components modified by AGEs precursors interact abnormally with other matrix components and with the receptors for matrix proteins (integrins) on cells. Third, plasma proteins modified by AGEs precursors bind to AGEs receptors on endothelial cells, mesangial cells and macrophages (4), inducing receptor-mediated production of reactive oxygen species. This AGEs receptor ligation activates the pleiotropic transcription factor NF- κ B, causing pathological changes in gene expression (5, 6).

AGEs are spontaneously produced in human tissues and the circulation as a part of normal metabolism, but are especially elevated in diabetic patients (7). This normal metabolism is

maintained by an antiglycation defense through detoxification pathways. Glyoxalase I (EC 4.4.1.5) is part of the glyoxalase system present in the cytosol of all cells. The glyoxalase system catalyses the conversion of reactive, acyclic α -oxoaldehydes into the corresponding α -hydroxyacids. (7) Glyoxalase I activity prevents the accumulation of reactive α -oxoaldehydes and thereby suppresses α -oxoaldehyde-mediated glycation reactions (8). It is, therefore, a key enzyme of the antiglycation defense.

It should be emphasized, however, that a large portion of AGEs can be exogenous. Tobacco smoke has already been recognized as an important exogenous source of AGEs. Recently, it has been found that diet, especially the modern Western diet, provides a relatively large portion of preformed AGEs and AGE-precursors. The methods used in food processing for safety, conservation and improvement of taste, flavor and appearance lead to the generation of diverse unstable dicarbonyl derivatives of glyco- and lipoxidation reactions (9).

Excessive production of reactive oxygen species (ROS) and resulting elevated oxidative stress has been associated with several metabolic factors including hyperglycemia, hyperlipidemia, and high levels of advanced glycation end products (AGEs). AGEs are major contributors to increased oxidative stress in conditions like diabetes (10). Defined as an impaired balance between free radical production and antioxidant capacity resulting in an accumulation of oxidative products, oxidative stress is a well-recognized mechanism playing important roles in many pathological conditions. Several human diseases have been closely related to oxidative stress (10). AGEs such as N-carboxymethyl-lysine (CML) and methylglyoxal (MG) derivatives are prime examples of dietary oxidants.

Based on these findings and taking into account the interrelationships among advanced glycation end products, oxidative stress and type 2 diabetes, we investigated the influence of dietary AGEs on peripheral insulin sensitivity and its relation to the redox state of the liver.

We used a experimental system of a highly palatable diet heated to 130°C for 30 minutes (11,12).

Research design and methods

Chemicals

D-[U-14C] glucose (297 mCi/mmol) was purchased from Amersham International (Little Chalfont, Bucks, UK). Bovine albumin (essentially fatty acid free) (J. T. Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ, USA) was analytical grade. Optiphase Hi Safe 3 was purchased from PerkinElmer (RJ, Brazil). Tris, ethylenediaminetrichloroacetic acid (EDTA), glycerol, Tween-20, acrylamide and bis-acrylamide were from Sigma (São Paulo, Brazil). The monoclonal antibody: anti-RAGE was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Nitrocellulose, radiographic films, the ECL kit and the secondary antibodies were purchased from GE healthcare (São Paulo, Brazil). The following chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): 2-thiobarbituric acid (TBA); 1,1,3,3 – tetramethoxypropane (MDA); L- cysteine; 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH); glycine; Epinephrine and Catalase from bovine liver. 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Folin-Ciocalteu reagent, trichloroacetic acid (TCA) and hydrogen peroxide were purchased from Merck, Germany.

Animals and diet

Thirty adult Wistar rats (male, 60-day-old) weighting 200-220 g were obtained from the Central Animal House of Department of Biochemistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. They were maintained under a standard dark–light cycle (lights on

between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.), at a room temperature of 22 °C. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Rats were divided into three groups: The control group (C, n=10), which received standard laboratory rat chow (50% carbohydrate, from starch, 22% protein and 4% fat); the highly palatable diet group (HP, n=10), which received a enriched sucrose diet (65% carbohydrates: 34% from condensed milk, 8% from sucrose and 23% from starch, 25% protein and 10% fat) (13) and the highly palatable thermolyzed diet (HPTD, n=10), which received the same enriched sucrose diet of HP group subjected to heating for 30 minutes at 130 degrees order to enrich for advanced end glycation products (AGEs) (11,12). A vitamin mixture was added after heating. All animals had free access to food and water.

Glucose tolerance test

A glucose tolerance test was performed five days before the animals were sacrificed. A 50% glucose solution was injected into the animals (i.p., 2 mg/g) after 6 h of starvation. Blood was collected by a small puncture on the tail immediately before and 30, 60, and 120 min after the injection. At each time, glucose was measured by a glucosimeter (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA).

Tissue preparation

Five days after the glucose tolerance test, the rats were killed by decapitation. Visceral and epididymal fat pads were dissected and weighed. Livers were dissected out and immediately stored at -70 °C for posterior biochemical measurements. For analysis of oxidative stress,

liver tissue was homogenized in ice-cold 150 mM saline. Blood was collected immediately after decapitation, and was centrifuged at 2500 g for 10 min to yield the serum fraction, which was stored at -70 °C for posterior biochemical analysis.

Glucose oxidation and incorporation of lipids in adipose tissue

For the measurement of lipid or protein synthesis and CO₂ production, epididymal fat was weighed, and pieces (between 15-25 mg) were incubated in 1.0 mL Krebs Ringer bicarbonate (KRb) buffer, pH 7.4, containing 1.0% of albumin free fatty acids + 5.0 mM of glucose + 0.2 µCi D[U-¹⁴C]glucose. Before incubation, the reaction medium was gassed with a 95% O₂:5% CO₂ mixture for 1 minute. Flasks were sealed with rubber caps, and the slices were incubated at 35 °C for 1 hour in a Dubnoff metabolic shaker (60 cycles/min) according to the method of Dunlop et al., 1975 (14). Incubations were stopped by adding 0.25 mL 50% TCA through the rubber cap, and 0.20 mL of 1 M hyamine hydroxide was then injected into the central wells. The flasks were shaken for an additional 30 minutes at 35°C to trap CO₂. Afterwards, the contents of the central well were transferred to vials and assayed for CO₂ radioactivity in a liquid scintillation counter. Adipose tissue was washed with saline and placed in shaking tubes containing 1 ml of chloroform-methane (2:1) overnight. The extraction of lipids was performed according to the method of Folch et al. (15). The samples were assessed in a liquid scintillation counter.

Hepatic Glycogen Synthesis

For the measurement of hepatic glycogen synthesis, the liver was dissected and cut into 300 µm slices using a McIlwain tissue chopper (100–120 mg). Slices were incubated in a beaker

with a medium containing Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4), 5 mM glucose and 0.2 μ Ci D-[U-14C]glucose. Incubations were carried out in ambient content that was gassed with a 95% O₂:5% CO₂ mixture for 1 h. Liver slices were incubated at 37°C for 1 h in a metabolic shaker (60 cycles/min), according to the method of Dolnikoff et al. (16) Incubation was stopped by placing the bottles in ice. Afterward, 1 ml of 60% KOH was added to each beaker. After 20 min in a boiling water bath, the tubes were removed and cooled to 30 °C - 35 °C. After cooling, 3 mL of 96% ethanol was added and the tubes were placed on ice for 15 min to precipitate glycogen. The tubes were centrifuged at 2000 g/10 min, the precipitate was suspended in 0.2 ml of water, and the scintillation liquid (Opti-Phase HiSafe3 from PerkinElmer-USA) was added. The samples were assessed in a liquid scintillation counter.

Blood Biochemical Parameters

Blood was collected and centrifuged at 2500 g/10 min. Serum was stored at -20 °C until assays were performed. The serum glucose, triacylglycerol (TAG), total cholesterol, HDL cholesterol, AST, ALT were measured using commercial kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil). The reactions were performed using Labmax equipment (Labtest, Minas Gerais, Brazil). Plasma-free fatty acids were measured using commercial kits (Roche Diagnostics, Germany).

Liver Biochemical Parameters

To determine the concentration of liver glycogen, a color reaction was conducted with the iodine second method of Krisman (1962) (17), and the reaction was read in a spectrophotometer at 460 nm. The results are shown as mg%. Hepatic triglyceride

concentration was determined by an enzymatic Trinder reaction (18). The results are shown as mg%.

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

As an index of lipid peroxidation, we measured the formation of TBARS during an acid-heating reaction, a widely used method for measurement of lipid redox state that has been previously described (19). Briefly, the samples were mixed with 0.8 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 mL of 0.8% thiobarbituric acid, and then heated in a boiling water bath for 30 min. TBARS were determined by the absorbance in a spectrophotometer at 532 nm using a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane. Results are expressed as nmol MDA/mg protein.

Measurement of protein carbonyls

Oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described (20). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% TCA and redissolved in DNPH and the absorbance read in a spectrophotometer at 370 nm. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein.

Non-protein thiol groups

One volume of the low-speed supernatant fraction was mixed with 1 volume of 10% trichloroacetic acid, followed by centrifugation and neutralization of the supernatant (to pH

7.5) with 1 M Tris as described by Jacques-Silva et al. (21). Non-protein thiol groups were immediately determined as described by Ellman (22) at 412 nm after reaction with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of non-protein thiol groups in tissue samples.

Antioxidant enzyme activity estimations

Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance in a spectrophotometer at 240 nm. (23) The results of CAT activity are expressed as U CAT/mg protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm, as previously described. (24) The results of SOD are expressed as U SOD/mg protein.

Measurement of glyoxalase I activity

Glyoxalase I activity was assayed according to Mannervik et al. (1981) (25). The assay was carried out in 96-well microplates using a microplate spectrophotometer (UV Star - Greiner). The 200 µl/well reaction mixture contained 50 mM sodium-phosphate buffer pH 7.2, 2 mM methylglyoxal (MG) and 1 mM glutathione (GSH; pre-incubated for 30 min at room temp). To the buffer, 10–20 µg protein from the sample was added per well. The formation of S-(D)-lactoylglutathione was monitored at 240 nm for 15 min at 25°C. A unit of glyoxalase I activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 µmol of S-(D)-lactoylglutathione per minute. Specific activity is expressed in units per milligram of protein.

Western blot analysis

Dissected liver tissue was homogenized in lysis solution containing 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, and 4% (w/v) SDS. For electrophoresis, the samples were dissolved in a 1:4 dilution of a solution containing 40% glycerol, 5% mercaptoethanol, and 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and boiled for 4 min. Equal protein concentrations were loaded (100 µg/well) onto a polyacrylamide gel for electrophoresis (10% SDS-PAGE) and resolved using the discontinuous system of Laemmli (26). After the samples had been resolved using SDS-PAGE, the protein bands were transferred to nitrocellulose membranes (using the Trans-blot SD semi-dry transfer cell, BioRad) for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol and 0.25% SDS). The nitrocellulose membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 0.5 M NaCl, 20 mM Trizma, pH 7.5) and blocked for 2 h in TBS containing 5% non-fat dried milk (M-TBS). After blocking, the blots were washed with TBS plus 0.05% Tween-20 (T-TBS) twice, for 5 minutes each time. The membranes were then incubated overnight at 4°C in blocking solutions containing, the polyclonal antibody (1:1000 dilution) anti-RAGE. The blots were then washed twice (5 min each time) with T-TBS and incubated for 2 h in M-TBS containing anti-rabbit IgG (1:2000 dilution) conjugated with peroxidase. Then blots were washed twice again (5 min each time) with T-TBS and twice (5 min each time) with TBS. The immunoreactive bands were then developed using the ECL system. The immunoblots were quantified by scanning the films using a Hewlett-Packard Scanjet 6100C scanner, and the optical densities were measured using an Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company).

Protein determination

Protein concentration was determined using the Lowry's method (27), with bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. All analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 15.0) software, differences between groups were determined by one-way ANOVA followed by a Duncan post-hoc test. *P* values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Body parameters

The average initial body weights did not differ between groups. However, the average final body weight of the animals treated with HP diet or HPTD was approximately 10% larger than the control group ($p < 0.05$) (Table 1). The fat mass was assessed at the end of the 4 month treatment period. The fat mass was higher in the HP diet and HPTD than in the control group ($p < 0.001$) indicating that the both the thermolyzed and non-thermolyzed HP diet increase the gain of fat mass (Table 1).

Biochemical parameters

Table 2 shows the biochemical parameters. The levels of serum glucose were raised in both the supplemented groups with highly palatable diets in relation to the control. Fasting plasma values for triglycerides and free fatty acids (FFA) were significantly increased in only the HPTD ($p<0.05$). Measurement of these factors can be used as an indirect parameter to demonstrate overall insulin resistance (28). The values for cholesterol and HDL were unaltered in the experimental groups. The concentration of hepatic glycogen was significantly reduced in the HPTD group ($p<0.05$), with no differences in hepatic triglyceride concentration.

Glucose tolerance test (GTT)

Additionally, after four months of a thermolyzed or non-thermolyzed HP diet, changes were triggered in glucose homeostasis. These changes in glucose homeostasis are demonstrated by an impaired glucose tolerance in these animals (Fig. 1 A). The animals subjected to the highly palatable thermolyzed diet showed, at 30, 60 and 120 min after the injection of glucose, a higher glycemia ($p<0.05$) compared with the control group. The HP diet increased the glycemia at 30, 60 and 120 minutes, but only the 120 min time point was statistically different from the control group. The total integrated area under the curve for glucose (AUC) (Figure 1 B) was increased compared with the control group in the HP (60%) and HPTD (75%) groups ($p<0.05$).

Glucose oxidation and lipid synthesis from glucose in adipose tissue and hepatic glycogen synthesis

In Figure 2, we verified the oxidation of glucose through epididymal adipose tissue after 1 h of incubation. We noticed that both groups fed with highly palatable diets oxidated less glucose in relation to the control group. In addition, the synthesis of lipids from glucose was reduced in the HP diet and HPTD. We observed that the hepatic glycogen synthesis from glucose was decreased in the HPTD group relative to the control group ($p < 0.05$; Fig. 3).

Oxidative stress parameters and glyoxalase I activity

Lipid peroxidation increased from 0.033 ± 0.006 nmol MDA/mg prot (control group $n=10$) to 0.046 ± 0.01 (HP group; $n=10$; $p < 0.05$) and 0.051 ± 0.007 (HPTD group; $n=10$; $p < 0.05$) nmol MDA/mg prot in livers of rats that received treatment for four months (Fig. 4 A). Protein carbonylation increased from 0.84 ± 0.45 nmol carbonyl/mg prot (control group $n=10$) to 2.0 ± 0.53 (HP group; $n=10$; $p < 0.005$) and 2.81 ± 0.67 (HPTD group; $n=10$; $p < 0.001$) nmol carbonyl/mg prot in livers of rats that received treatment for four months (Fig. 4 B).

As depicted in Figure 5 A, we determined that non-protein thiol content was decreased from 0.012 ± 0.002 nmol/mg prot (control group; $n=10$) to 0.011 ± 0.002 (HP group; $n=10$; $p < 0.05$) and 0.009 ± 0.001 (HPTD group; $n=10$; $p < 0.05$) nmol/mg prot in liver of rats that received treatment for four months. In addition, the activity of glyoxalase I was reduced in the HPTD group to 0.23 ± 0.05 U/mg prot and in the HP diet group to 0.25 ± 0.03 U/mg prot, compared with the control group value of 0.32 ± 0.07 U/mg prot ($p < 0.01$; Fig. 5 B).

As shown in Figure 6, HPTD induced a decrease in the activities of antioxidant enzymes. SOD activity was reduced from 96.6 ± 26.87 U SOD/mg prot (control group; $n=10$) to

86.82±16.86 U SOD/mg prot (HP group; n=10; no statistically significant change) and 76.99±11.94 U SOD/mg prot (HPTD group; n=10. p<0.05). CAT activity was reduced from 45.98±7.54 U CAT/mg prot (control group; n=10) to 33.25±6.84 U CAT/mg prot (HPTD group; n=10; p<0.05). No significant differences were observed in the HP group (51.14±3.86 U CAT/mg prot; n=10) versus the control group.

Western Blotting

The levels of RAGE were measured as percentages relative to the control group (the rats that were fed with a normal diet). The HP and HPTD diets increased the content of RAGE (28 and 41% respectively) (Fig. 7).

Discussion

The results presented here show that animals subjected to a highly palatable diet (HP) had glucose intolerance and increases in plasmatic free fatty acids, body weight and tissue adipose weight. The thermolyzed diet appears to be more harmful than the HP diet, possibly due to the formation of advanced glycation end products (AGEs).

Our results showed a decrease in glycogen synthesis in the HPTD group. Insulin promotes glycogen accumulation through activation of glycogen synthesis by stimulation of glycogen synthase and reduction of glycogen breakdown via inhibition of glycogen phosphorylase. Any of the above-mentioned effectors of insulin in the liver appear to be deregulated either at the phosphorylation activity level or at the level of gene transcription in type 2 diabetes (29). These effects were related to high dietary levels of advanced glycation/lipoxidation end products (AGEs/ALEs), which possess pro-oxidant and pro-inflammatory properties (30).

AGEs affect the properties of the proteins and thus alter intracellular events. AGEs induce changes in insulin action because AGEs stimulate the production of pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor α , which may promote insulin resistance.

Treatment with a highly palatable diet, thermolyzed or non-thermolyzed, altered the liver redox environment and increased the level of lipid peroxidation (TBARS level) and protein carbonylation in the liver. The HPTD group showed a greater increase in these effects compared with the other control or HP diet groups. Chronic elevation of glucose levels is one metabolic alteration triggered by consumption of this diet. Elevated glucose levels are associated with increased production of ROS by several different mechanisms. One mechanism is that in diabetic cells with high glucose content, there is more glucose being oxidized in the TCA cycle, and this in effect pushes more electron donors (NADH and FADH₂) into the electron transport chain. As a result, the voltage gradient across the mitochondrial membrane increases until a critical threshold is reached. Once the threshold is reached, electron transfer inside complex III is blocked, causing the electrons to back up to coenzyme Q. Coenzyme Q donates electrons one at a time to molecular oxygen, thereby generating superoxide (4). Other mechanisms through which increased glucose levels result in increased production of ROS are glucose auto-oxidation, abnormal arachidonic acid metabolism and its coupling to cyclooxygenase catalysis, protein kinase C activation, increase in the activity of nitric oxide (NO) synthase, activation of the aldose reductase pathway and advanced glycation end products (AGEs) formation (9).

Increased cellular ROS in animals that received a thermolyzed diet could also arise from AGEs; e.g., from myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, via activation of AGE-sensitive cell surface receptors, such as receptor for advanced glycation end products (RAGE). We found an increase in the level of RAGE in both

experimental diets. RAGE promotes the formation of reactive oxygen species, inflammation, stress-responses, and apoptotic events (31).

Generation of ROS is intertwined with the metabolism of AGEs. Methylglyoxal (MG), a reactive α -oxoaldehyde intermediate in the process of formation of AGEs, can generate ROS. Production of MG from acetone and aminoacetone yields hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide radicals (O₂⁻) as byproducts, and degradation of MG by glyoxal oxidase or photolysis produces H₂O₂ and other radical species. MG also hinders antioxidant defenses by reacting with functional thiol groups of glutathione (GSH) and plasma albumin to reduce their activity. MG inhibits the antioxidant enzyme superoxide dismutase by altering its structure. MG also impedes glyoxalase and GSH peroxidase function (32).

Although many reports have shown that endogenous AGEs are involved in the pathogenesis of many diseases, the major damage associated with oxidative stress caused by the thermolyzed diet can be explained by increased intake of exogenous AGEs by the animals. Recently, human studies confirmed that about 10% of diet-derived AGEs are absorbed and these absorbed AGEs correlate with circulating and tissue AGEs levels (33). Studies using orally-administered radiolabeled AGEs have confirmed significant intestinal absorption of dietary AGEs and covalent deposition of AGEs in the liver and kidney (34). Dietary AGEs restriction resulted in significant reduction of circulating AGEs levels and reduction in disease progression in animal models of atherosclerosis and diabetes, as well as in diabetic patients with normal renal function and in non-diabetic patients with renal failure (34). These findings suggest that dietary AGEs may constitute a chronic environmental risk factor for tissue injury. Increased oxidative stress upon intake of dietary AGEs may be one explanation for this tissue injury.

The treatment with a highly palatable thermolyzed diet caused a decrease in non-protein thiol content, mainly represented by the reduced form of glutathione (GSH). Both hyperglycemia and oxidative stress are associated with GSH depletion. In addition, the activity of glyoxalase I was decreased after treatment with the highly palatable thermolyzed diet. Glyoxalase I has a critical role in suppressing the formation of protein AGEs. With the decrease in the activity of glyoxalase I, the concentrations of AGEs precursors are able to rise. Optimal activity of the glyoxalase system is dependent on the adequate level of reduced glutathione (GSH) (35). Experimental depletion of GSH by oxidative or non-oxidative mechanisms induced marked accumulation of precursors of AGEs and induced cytotoxicity (7).

The HPTD induced a decrease in both SOD and CAT activity. This decrease in SOD activity might increase superoxide availability. The increased superoxide may allosterically inactivate the CAT enzyme, decreasing its activity (36). The highly palatable diet most likely increased superoxide production through the chronic elevation of glucose levels (4). The decrease in the activity of both antioxidant enzymes might result in oxidative stress.

The increased production of reactive oxygen species and the decrease in antioxidant enzyme activity caused by the diets to which the animals were subjected may result in a situation of oxidative stress.

To understand the increase of FFA in the circulation of these animals, we studied oxidation and lipid synthesis through the glucose in adipose tissue. The results showed a decrease in both oxidation and lipid synthesis in adipose tissue. Based on studies by many laboratories on rodents and humans with high caloric intakes, alterations in adipose tissue change the dynamics between fatty acid release and use (37). Adipocyte function during prolonged caloric overload causes an inflammatory response, which in turn causes adipocyte dysfunction through the actions of cytokines such as TNF α on adipocyte metabolism. The action of such

cytokines has two dramatic effects on adipocyte function — an increase in lipolysis and a decrease in triglyceride synthesis (37). These actions in turn result in increased levels of circulating FFAs, and this increased flux results in increased FFA oxidation by the mitochondria. Since both β -oxidation of fatty acids and oxidation of FFA-derived acetyl CoA by the TCA cycle generate the same electron donors (NADH and FADH₂) as those generated by glucose oxidation, increased FFA oxidation causes mitochondrial overproduction of ROS by exactly the same mechanism described above for hyperglycemia (4).

In summary, we have established that the consumption of a highly palatable diet leads to raised of the serum glucose, increased triglycerides and free fatty acids (FFA) in serum, reduced concentration of hepatic glycogen, increased in adiposity and impaired glucose tolerance. The thermolization process of the highly palatable diet aggravates such a condition because of the elevated levels of AGEs. These elevated AGEs also play a role in the pathogenesis of diabetic complications through the impeding of redox homeostasis and a reduced antiglycation defense. This model of treatment simulates a nutritional condition that is very common in an important percentage of the population. Therefore, the consequences of the consumption of such a diet must be carefully evaluated and considered.

Acknowledgments

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Pró-Reitoria de Pesquisa – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-Rede Instituto Brasileiro Neurociências - IBN-Net # 01.06.0842-00).

List of Abbreviations

AGEs – Advanced glycation end products

OS – Oxidative stress

GTT – Glucose tolerance test

HP – Highly palatable diet

HPTD – Highly palatable termolized diet

CAT – Catalase

SOD – Superoxide dismutase

ROS – Reactive oxygen species

MG – Methylglyoxal

RAGE – Receptor for AGEs

TBARS – Thiobarbituric acid reactive species

GSH – Reduced glutathione

HDL – High density lipoprotein

FFA - free fatty acids

Bibliography:

- [1] Prada, P. O.; Zecchin, H. G.; Gasparetti, A. L.; Torsoni, M. A.; Ueno, M.; Hirata, A. E.; Corezola do Amaral, M. E.; Höer, N. F.; Boschero, A. C.; Saad, M. J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. **146(3)**: 1576-1587; 2005.
- [2] Vlassara, H.; Palace, M. R. Diabetes and advanced glycation end products. *J. Int. Med.* **251**: 87-101; 2002.
- [3] Goldberg, T.; Cai, W.; Peppia, M.; Dardaine, V.; Baliga, B. S.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **104**: 1287-1291; 2004.
- [4] Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying Mechanism. *Diabetes*. **54**: 1615-1625; 2004.
- [5] Baynes J. W.; Thorpe, S. R. Perspectives in Diabetes Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications. A New Perspective on an Old Paradigm. *Diabetes*. **48**: 1–9; 2002.
- [6] Cai, W.; Gao, Q.; Zhu, L.; Peppia, M.; He, C.; Vlassara, H. Oxidative Stress-Inducing Carbonyl Compounds From Common Foods: Novel Mediators of Cellular Dysfunction. *Mol. Med.* **8(7)**: 337–346; 2002.
- [7] Thornalley P. J. Glyoxalase I – structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 1343-1348; 2002.
- [8] Shinohara, M.; Thornalley, P. J.; Giardino, I.; Beisswenger, P. J.; Thorpe, S. R.; Onorato, J.; Brownlee, M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits

intracellular advanced glycation end product formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J. Clin. Invest.* **101**: 1142-1147; 1998.

[9] Peppas, M.; Vlassara, H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens)*. **4(1)**: 28-37; 2005.

[10] Grattagliano, I.; Palmieri, V. O.; Portincasa, P.; Moschetta, A.; Palasciano, G. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *J. Nutr. Biochem.* **19**: 491–504; 2008.

[11] Sandu, O.; Song, K.; Weijing, C.; Zheng, F.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotxin intake. *Diabetes*. **54**: 2314 – 2319; 2005.

[12] Diamanti-Kandarakis, E.; Piperi, C.; Korkolopoulou, P.; Kandaraki, E.; Levidou, G.; Papalois, A.; Patsouris, E.; Papavassiliou, A. G. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J. Mol. Med.* **85**: 1413–1420; 2007.

[13] Souza, C. G.; Moreira, J. D.; Siqueira, I. R.; Pereira, A. G.; Rieger, D. K.; Souza, D. O.; Souza, T. M.; Portela, L. V.; Perry, M. L. S. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Lif. Sci.* **81**: 198–203; 2007.

[14] Dunlop, D. S.; Van Elden, W.; Lajtha, A. Optimal conditions for protein synthesis in incubated slices of brain rat. *Brain. Res.* **99**: 303–318; 1975.

[15] Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. *The J. Biol. Chem.* **226**: 497 - 509; 1956;

- [16] Dolnikoff, M.; Martin-Hidalgo, A.; Machado, U. F.; Lima, F. B.; Herrera, E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int. J. Obes. Rel. Metab. Dis.* **25**: 426–433; 2001.
- [17] Krisman, C. R. A method for calorimetric estimation of glycogen with iodine. *Analyt. Biochem.* **4**: 17-23; 1962.
- [18] Akazawa, T.; Conn. R. E. The oxidation of reduced pyridine nucleotides by peroxidase. *J. Biol. Chem.* **232**: 403-415; 1958.
- [19] Draper, H. H.; Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods. Enzymol.* **186**: 421–431; 1990.
- [20] Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.* **186**: 464–478; 1990.
- [21] Jacques-Silva, M. C.; Nogueira, C. W.; Broch, L. C.; Flores, E. M. M.; Rocha, J. B. T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.* **88**: 119–25; 2001.
- [22] Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70–7; 1959.
- [23] Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods. Enzymol.* **105**: 121–126; 1984.
- [24] Misra, H. P.; Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**: 3170–3175; 1972.

- [25] Mannervik, B.; Aronsson, A. C.; Marmstål, E.; Tibbelin, G. Glyoxalase I (rat liver) *Methods. Enzymol.* **77**: 297-301; 1981.
- [26] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685; 1970.
- [27] Lowry, D. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. F. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**: 265–75; 1951.
- [28] Burgert, T. S.; Taksali, S. E.; Dziura, J.; Goodman, T. R.; Yeckel, C. W.; Papademetris, X.; Constable, R. T.; Weiss, R.; Tamborlane, W. V.; Savoye, M.; Seyal, A. A.; Caprio, S. Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat. *The J. of Clin. End. and Met.* **91(11)**: 4287–4294; 2006.
- [29] Velho, G.; Petersen, K. F.; Perseghin, G.; Hwang, J. H.; Rothman, D. L.; Pueyo, M. E.; Cline, G. W.; Froguel, P.; Shulman, G. I. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J. Clin. Invest.* **98**: 1755–1761; 1996.
- [30] Hofmann, S. M.; Dong, H. J.; Li, Z.; Cai, W.; Altomonte, J.; Thung, S. N.; Zheng, F.; Fisher, E.; Vlassara, H. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes.* **51**: 2082-2089; 2002.
- [31] Alison Goldin, B. A.; Joshua, A.; Beckman, M. D.; Ann Marie Schmidt, MD; Mark A. Creager, MD. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury, *Circulation*; 114: 597-605, 2006.
- [32] Kalapos, M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem. Biol. Int.* **171**: 251–271; 2008.

- [33] Negrean, M.; Stirban, A.; Stratmann, B.; Gawlowski, T.; Horstmann, T.; Götting, C.; Kleesiek, K.; Mueller-Roesel, M.; Koschinsky, T.; Uribarri, J.; Vlassara, H.; Tschoepe, D. Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**: 1236–43; 2007.
- [34] Koschinsky, T.; He, C. J.; Mitsuhashi, T.; Bucala, R.; Liu, C.; Buenting, C.; Heitmann, K.; Vlassara, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 6474 –6479; 1997.
- [35] Shangari, N.; Bruce, W. R.; Poon, R.; O'Brien, P. J. Toxicity of glyoxals – role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 1390-1393; 2003.
- [36] de Oliveira, M. R.; de Bittencourt Pasquali, M. A.; Silvestrin, R. B.; Mello, E.; Souza T.; Moreira, J. C. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain. Res.* **1169**: 112-9; 2007.
- [37] Guilherme, A.; Virbasius, J. V.; Puri, V.; Czech, M. P. Adipocyte disfunctions linking obesity to insulin resistance and tipe 2 diabetes. *Nature reviews, mol. cell boil.* **9**: 367-377; 2008.

Legends

Table 1: Body Parameters in Rats After 4 Months of Different Nutritional Treatment.

For treatment details, see Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD). Retroperitoneal and epididymal adipose tissue are expressed in % of total body weight. Additional data are expressed in grams (g), and represented as mean \pm SD (n=10 per group). Different letters at the same row indicate significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by Duncan multiple range test.

Tabela 2: Biochemical Parameters in Rats After 4 Months of Different Nutritional Treatments.

For treatment details, see Materials and Methods section: Control (C), Highly palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD). Glucose, cholesterol and high density lipoprotein (HDL) levels are expressed as mg/dL. Free fatty acids was expressed as μ M/ml and represented as mean \pm SD (n =10 per group). Different letters at the same row indicate significant difference ($P < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by Duncan multiple range test.

Figure 1: The Glucose Tolerance Test (A) and the total integrated area under the curve for glucose (AUC) (B) in rats after four months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control(C), Highly Palatable Diet (HPD) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD). Blood glucose levels are expressed as mg/dL and represented as the mean \pm SD (n = 6 per group). Two-way analysis of variance showed

significant time vs. diet interactions for Glucose Tolerance Test ($F=10.27$; $P=0.0002$). And AUC ($p<0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 2: Glucose oxidation (A) and synthesis of lipid from glucose (B) by epididymal adipose tissue in rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD). Data are expressed as pmol of glucose oxidized per milligram per hour of tissue and represented as the mean \pm SD ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p<0.05$) by one- way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 3: Hepatic glycogen synthesis from D-[U-14C]Glucose (A) in rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) ($n=8$ per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference ($p<0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 4: Lipid peroxidation (A) and protein carbonylation (B) in liver of rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) ($n=10$ per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference for TBARS ($p<0.05$) and Carbonyl ($p<0.005$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 5: Non-protein thiol groups (A) Glyoxalase I activity (B) in liver of rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference for ($p < 0.05$) for (A) and ($p < 0.01$) for (B) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 6: Antioxidant enzyme activity estimations in liver; Catalase (CAT) activity (A) and Superoxide dismutase (SOD) (B) in rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference ($p < 0,001$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 7: Levels of RAGE in the liver of rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. The results were normalized to 100% using data from the control group. Representative immunoblots are shown in the inset. The asterisk indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way ANOVA, followed by Duncan's test.

Table 1

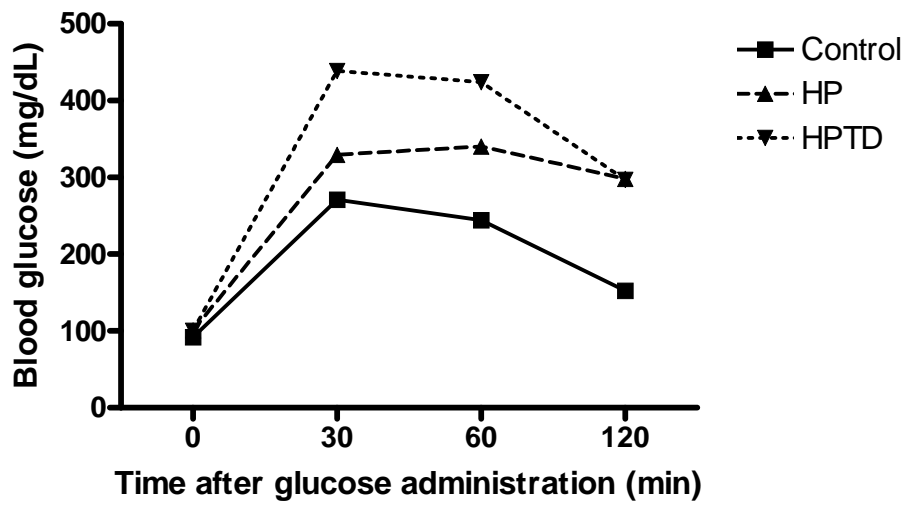
	Control	HP	HPTD
Initial body weight (g)	199± 28,7 ^a	216± 10,3 ^a	206,9± 19,2 ^a
Final body weight (g)	303,7± 22,9 ^a	344,2± 30,1 ^b	335,8± 38,3 ^b
Body weight gain (g)	104,7± 31 ^a	133,32 ± 21,6 ^b	137,29 ± 39,6 ^b
Retroperitoneal Adipose tissue (g)	4,81± 1,2 ^a	10,97± 3,6 ^b	11,33 ± 2,3 ^b
Retroperitoneal Adipose tissue (%)	1,55 ± 0,33 ^a	3,29 ± 1,5 ^b	4,28 ± 2,5 ^b
Epididymal adipose tissue (g)	4,83 ± 0,33 ^a	9,48 ± 1,76 ^b	8,84 ± 1,26 ^b
Epididymal adipose tissue (%)	1,57 ± 0,11 ^a	2,79 ± 0,36 ^b	2,99 ± 2,2 ^b

Table 2

	Control	HP	HPTD
Hepatic glycogen (mg %)	5,78 ± 0,88 ^a	5,2 ± 0,95 ^a	2,44 ± 1,00 ^b
Hepatic triglycerides (mg %)	0,87 ± 0,13 ^a	1,1 ± 0,17 ^a	1,2 ± 0,19 ^a
Plasmatic triglycerides (mg/dl)	130,5 ± 21,4 ^a	138,8 ± 42,00 ^a	186,1 ± 62,6 ^b
Plasmatic free fatty acid (µM)	559,2 ± 97,3 ^a	587,9 ± 155,9 ^a	751 ± 159,6 ^b
Plasmatic Cholesterol (mg/dl)	69,1 ± 12,9 ^a	74,4 ± 8,5 ^a	74,6 ± 10,7 ^a
Plasmatic HDL (mg/dl)	22,5 ± 3,9 ^a	23,81 ± 1,66 ^a	27,18 ± 6,0 ^a
Plasmatic glicose (mg/dl)	96 ± 10,66 ^a	108,2 ± 11,1 ^b	116,7 ± 15,2 ^b
Aspartate aminotransferase	265,6 ± 63,6 ^a	281,2 ± 37,2 ^a	274,6 ± 61,4 ^a
Alanine aminotrasferase	75,4 ± 27,1 ^a	64,2 ± 11,2 ^a	58,8 ± 11,4 ^a

Figure 1

A.



B.

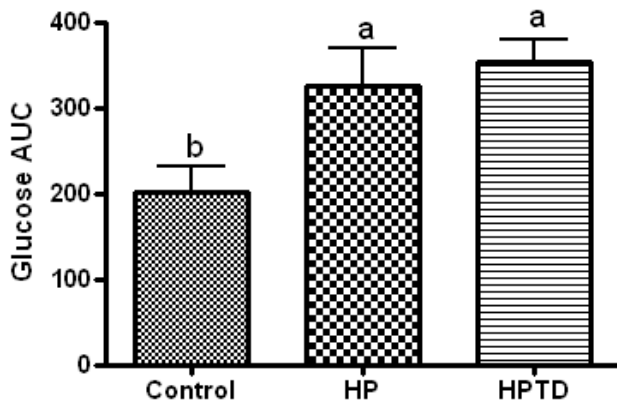
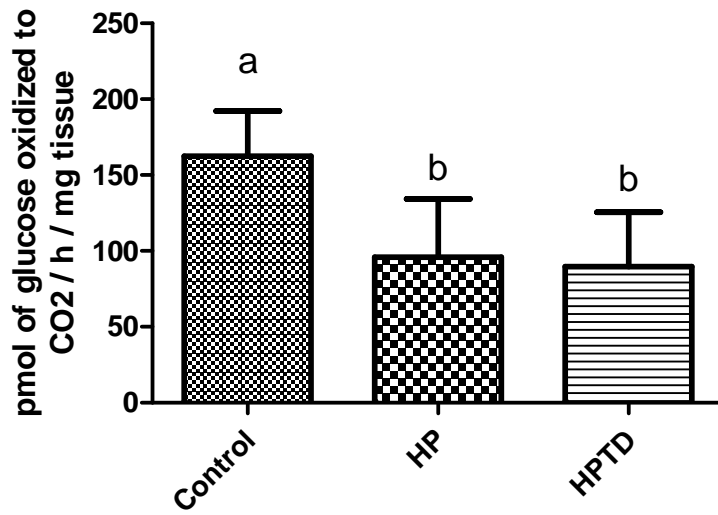


Figure 2

A.



B.

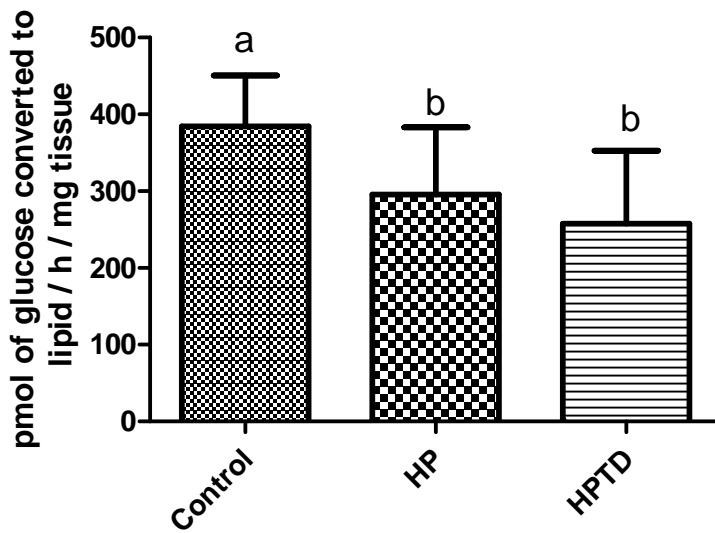


Figure 3

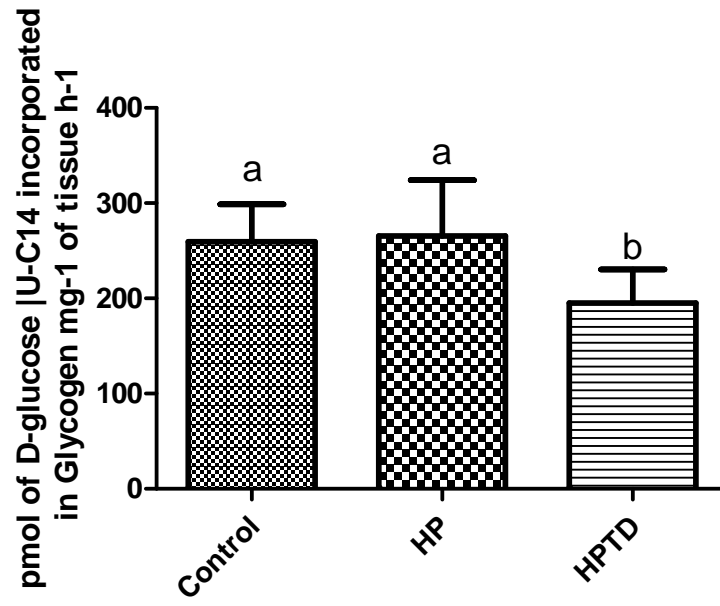
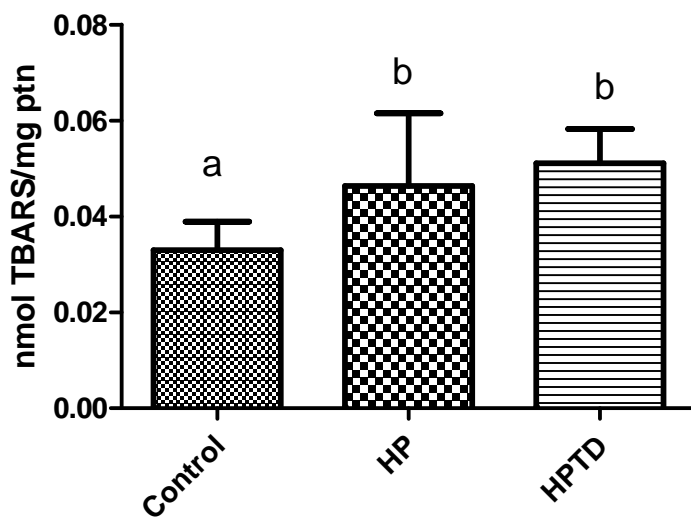


Figure 4

A.



B.

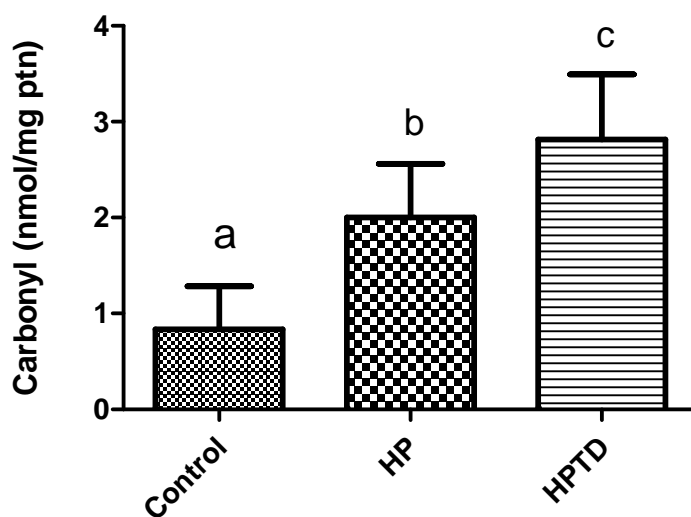
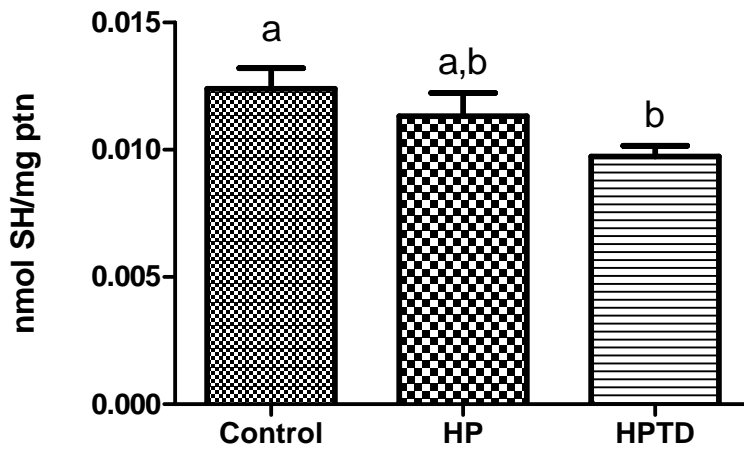


Figure 5

A.



B.

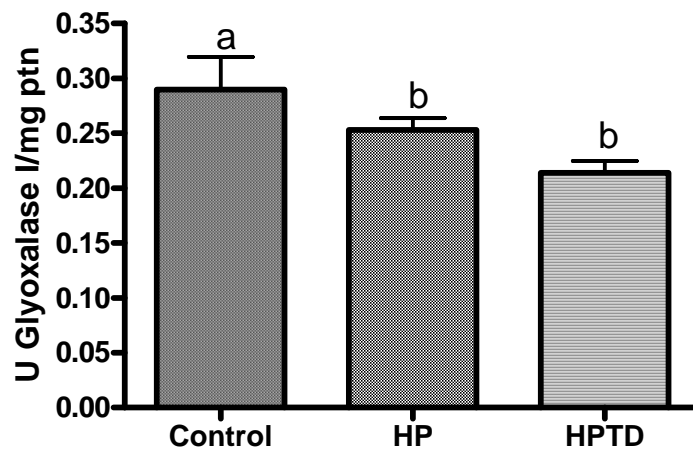
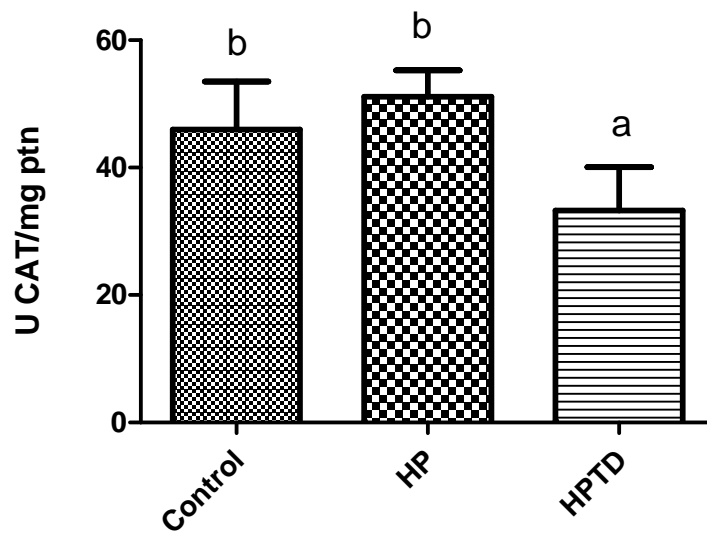


Figure 6

A.



B.

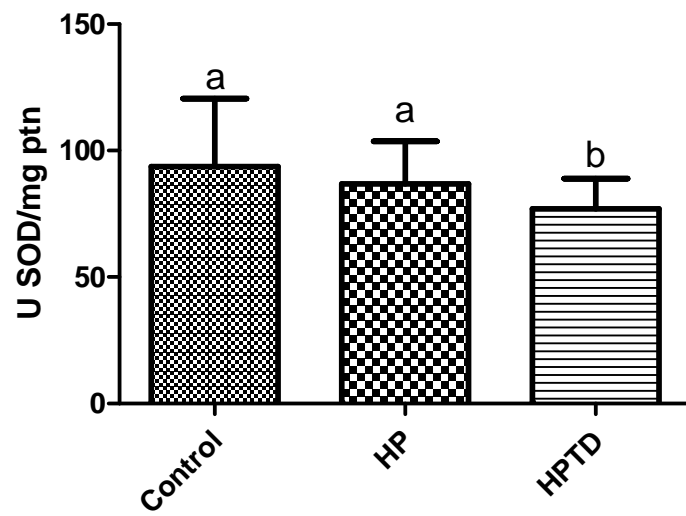
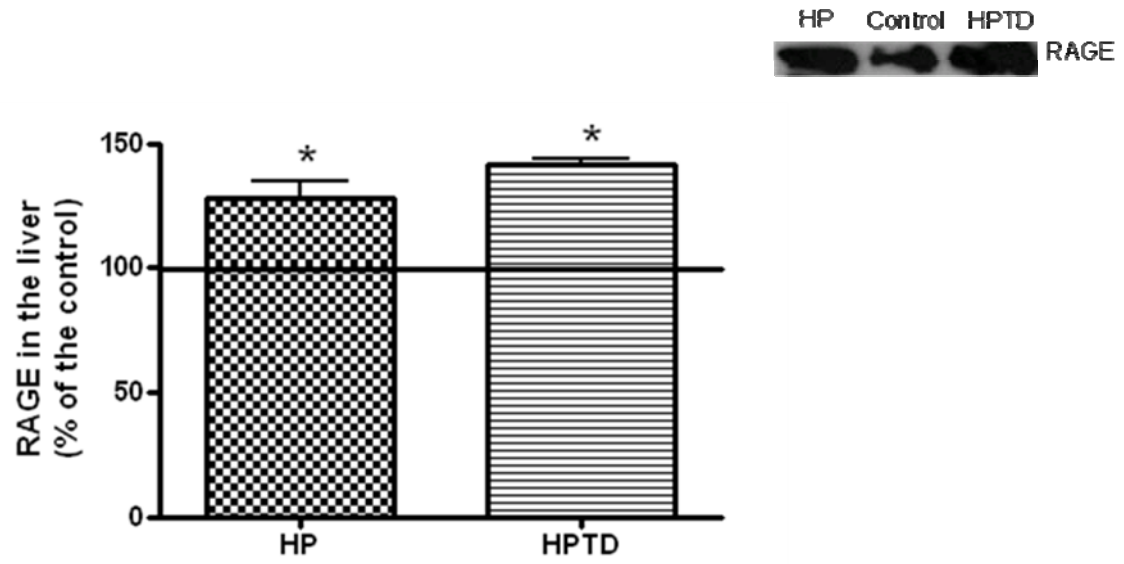


Figure 7



CAPÍTULO II

“Highly palatable termolized diet altered redox environment glycation defense and increased DNA damage in rats kidney and serum.”

Débora Kurrle Rieger¹, Adriano Martimbianco Assis¹, Aline Longoni dos Santos¹, Cíntia E. Battú², Cristiane Denardin¹, Fernanda Hansen¹, Simone Luz da Silveira¹, Ana C. Andreazza¹, Carmen Gottfried¹, Carlos A. Gonçalves^{1,2}, Liane Rotta^{3,4}, Marcos Luiz S. Perry^{1,2}

Highly palatable termolized diet altered redox environment, glycation defense and increased DNA damage in rats kidney and serum.

Débora Kurrle Rieger¹, Adriano Martimbianco Assis¹, Aline Longoni dos Santos¹, Cíntia E. Battú², Cristiane Denardin¹, Fernanda Hansen¹, Simone Luz da Silveira¹, Ana C. Andreazza¹, Carmen Gottfried¹, Carlos A. Gonçalves^{1,2}, Liane Rotta^{3,4}, Marcos Luiz S. Perry^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ² Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.; ³ Programa de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil; ⁴ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil;

Corresponding author:

Marcos Luiz Santos Perry

Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003,

Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5551

Fax: +55 51 3308 5540

E-mail: marcos.perry@gmail.com

Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) are implicated in the complications of diabetes by alter the structure and function of molecules in biological systems and increase oxidative stress. Many studies have demonstrated that DNA damage may be associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its complications. The aim of this study was to investigate the acute effects of dietary AGEs on redox state and antiglycation defense in kidney and plasma, and DNA damage in serum of rats. Male rats 8 weeks old was submitted to a highly palatable diet, heated (130°C/30minut) or not, during 4 months. DNA damage, Glyoxalase I activity and oxidative stress status were evaluated. The animals submitted to a highly palatable diet (HP) and highly palatable thermolyzed diet (HPTD) showed an increased in lipid peroxidation, protein carbonylation and a decreased in oxidation of protein thiol groups in kidney and serum, as well as change in Catalase (CAT), Superoxide Dismutase (SOD) and Glyoxalase I activity in kidney. Blood DNA damage was significantly higher in animals subjected to highly palatable diets, and the highest damage was observed in animals that received the highly palatable termolized diet. Ingestion of a highly palatable diet impairs the redox homeostase, increased DNA damage, where the thermolyzation process aggravates such a condition, perhaps because the formation of advanced glycation end products.

Introduction

Type 2 diabetes is characterized by hyperglycemia due to insulin resistance in peripheral tissues and deficient insulin secretion by pancreatic islet β -cells (1). Prolonged hyperglycemia leads to diabetic complications, including vascular and renal disease (2). Hyperglycemia also fosters the endogenous non-enzymatic glycooxidation of proteins, lipids, and nucleic acids, and results in the accumulation of heterogeneous molecules known as advanced glycation end products (3).

AGEs may exert their effects through alter protein function, cause abnormal interactions among matrix proteins, and interfere with cellular functions by increasing the expression of cytokines and the production of ROS through their receptor, RAGE.

Diet is an important environmental risk factor for the development of diabetes and its complications (4). Diet-imported mixtures of AGEs could act independently of, or synergistically with, underlying hyperglycemia and endogenously formed AGEs to impact diabetic tissue injury. Following meal ingestion, an estimated 10% of pre-formed AGEs are absorbed by the human or rodent gastrointestinal tract (5,6). Of this, approximately two-thirds are retained in tissues, and in the presence of renal impairment the uncleared proportion of dietary AGEs can increase up to 95% (5).

DNA damage may be associated with T2DM and its complications (8). In this context, the accumulation of oxidative stress-related products appears to be responsible, at least in part, for DNA damage in diabetes patients (7). AGE-induced DNA modification and genotoxicity have been documented in bacteria, in mammalian cells and in patients with renal failure. AGE-modified nucleotide formation in DNA is associated with reduced DNA synthesis, mutations, DNA strand breaks and cytotoxicity (8).

The kidney is a target for AGE-mediated damage and is also a contributor to circulating AGEs concentrations as seen in settings such as diabetes, since the kidney is the major site of clearance of AGEs. In the kidney, AGE-adducts to amino acids and peptides are filtered into the glomeruli. AGE-amino acids are eliminated in urine, whereas AGE-peptides are partly eliminated and partly reabsorbed in the proximal tubule, to be degraded in the lysosomes and produce AGE-amino acids, the later being then excreted in urine. AGEs play a key role in glomerular nephropathy as they accumulate in glomerular basement membrane and interact with mesangial cells, endothelial cells and podocytes, to trigger oxidative stress, inflammatory signaling and apoptosis (9). Oxidative stress and the secretion of growth factors and cytokines are involved in AGE-induced nephropathy (10).

In the present studies we sought to compare the impact of a highly palatable diet and a highly palatable termolized diet that contains high levels of precursor and late AGEs, to a standard mouse diet. Focusing on oxidative stress, DNA damage and antiglycation defense in kidney and serum.

Research design and methods

Chemicals

Low and normal melting point agarose (Gibco,USA), ethyl-enediamine-tetra acetic acid(EDTA), TritonX-100 and dimethylsulfoxide(DMSO) (LabsynthProdutosdeLaboratorio Ltda, SP, Brazil), RMPI1640 medium (Nutricell, Campinas-SP, Brazil), ethidiumbromide, cytochalasin B, andhyamine hydroxide (J.T.Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ, USA) were all analytical grade. Bovine albumin (essentially fatty acid free), The following chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): 2-thiobarbituric acid (TBA); 1,1,3,3 – tetramethoxypropane (MDA); L- cysteine; 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH); glycine; (-)-Epinephrine and Catalase from bovine liver. 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and Folin-Ciocalteu reagent were purchased from Merck, Germany. trichloroacetic acid (TCA) and hydrogen peroxide (Vetec).

Animals and diet

Thirty 8-weeks-old male Wistar rats weighing from 200 to 220 g were obtained from the Central Animal House of Department of Biochemistry of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. They were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.), at a room temperature of 22 - 23°C. Animal care followed the official governmental guidelines in compliance with the Federation of Brazilian Societies for Experimental Biology and was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Rats were divided into three groups: The control group (C, n=10), which received standard laboratory rat chow (50% carbohydrate, from starch, 22% protein and 4% fat); the highly palatable diet group (HP, n=10), which received a enriched sucrose diet (65% carbohydrates being 34%from condensed milk, 8% from sucrose and 23% from starch, 25% protein and 10% of fat) (13), and the highly palatable termolizide diet (HPTD, n=10) which received the same enriched sucrose diet of HP group subjected to heating for 30 minutes at 130 degrees order to make it enriched in advanced end glycation

products (AGEs) (11, 12), and a vitamin mixture was added after heating. All animals had free access to food and water.

Tissue preparation

Five days after the glucose tolerance test, the rats were killed by decapitation. Kidney was dissected out and immediately stored at -70 °C for posterior biochemical measurements. For analysis of oxidative stress kidney tissue was homogenized in iced-cold 150mM saline. Blood was collected immediately after decapitation, and was centrifuged at 2500 g for 10 minutes to yield the serum fraction, remaining stored at -70 °C for posterior oxidative analysis.

Thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

As an index of lipid peroxidation, we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a method for measurement of lipid redox state, as previously described (16). Briefly, the samples were mixed with 0.8 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 mL of 0.8% thiobarbituric acid, and then heated in a boiling water bath for 30 min. TBARS were determined by the absorbance in a spectrophotometer at 532 nm using a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane. Results are expressed as nmol MDA/mg protein.

Measurement of protein carbonyl

The oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) as previously described (17). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% TCA and redissolved in DNPH and the absorbance read in a spectrophotometer at 370 nm. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein.

Protein and non-protein thiol groups.

Other form to analyze oxidative alterations in proteins is to measure the level of protein thiol content. Briefly, sample was diluted in 0,1% SDS and protein thiol groups were immediately determined as described by Ellman(19) at 412 nm after reaction with 5,5'-dithionitrobenzoic acid (DTNB). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of non-protein thiol groups in tissue samples. The free sulfhydryl (-SH) content was estimated in supernatant of samples mixed with 1 volume of 10% trichloroacetic acid, followed by centrifugation and neutralization of the supernatant (to pH 7.5) with 1 M Tris as described by Jacques-Silva et al.(18) by the same method.

Antioxidant enzyme activity estimations

Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease in H₂O₂ absorbance in a spectrophotometer at 240 nm. (20) The results of CAT activity are expressed as U CAT/mg protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed by quantifying the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm, as previously described. (21) The results of SOD are expressed as U SOD/mg protein.

Measurement of glyoxalase I activity

Measurement of glyoxalase I activity: Glyoxalase I activity was assayed according to Mannervik et al. (1981) (22). The assay was carried out in 96-well microplates using a microplate spectrophotometer (UV Star - Greiner). The reaction mixture 200 μ L/well contained 50 mM sodium-phosphate buffer pH 7,2, 2 mM methylglyoxal (MG) and 1 mM glutathione (GSH) (pre-incubated for 30 min at room temp). To the buffer, 10–20 μ g protein from the sample was added per well. The formation of S-(D)-lactoylglutathione was monitored at 240 nm for 15 min at 25°C. A unit of glyoxalase I activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of S-(D)-lactoylglutathione per minute. Specific activity is expressed in units per milligram of protein.

Comet Assay

DNA damage was evaluated in blood through alkaline single gel electrophoresis (comet assay), according to previously described work (23). The alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al. (24), with minor modifications. Cell suspensions from peripheral blood (5 l) were embedded in 95 l of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, the cover slip was gently removed, and the slides were placed in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM disodium EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide) for up to 24 h. Subsequently, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6) for 10 min and electrophoresed. Following electrophoresis, slides were immersed in neutralizing buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, 48C) for 5 min. Subsequently, 50 ml of 5 mg/ml ethidium bromide was applied to the slides, and they were left in the dark for 20 min for DNA staining. Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay to ensure the reliability of the procedure. Images of 100 randomly selected nuclei (50 nuclei from two replicated slides) were analyzed for each treatment. Nuclei were scored visually for comet tail size, based on an arbitrary scale of 0–4 (i.e., ranging from no DNA damage to extensive DNA damage). Thus, a group damage index could range from 0 (all nuclei without tail, 100 cells³⁰) to 400 (all nuclei with maximally long tails, 100 cells^{3 4}) (25). During electrophoresis, any relaxed or broken DNA fragments migrated farther than supercoiled, undamaged DNA. Slides were viewed on a Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory. Images were transferred to a computer with a digital camera (Sound Vision Inc., Wayland, MA, USA).

Protein concentration

Protein concentration was determined using the Lowry's method (26), using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm RD. All analyzes were performed using the statistical Package for the social Science (SPSS 15.0) software, diferencens between groups were determined by the one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test. *P* values were considered significant when $<0,05$.

Results

Oxidative stress parameters and Glyoxalase I activity

Lipid peroxidation increased from 0.053 ± 0.01 nmol MDA/mg prot (control group $n=10$) to 0.073 ± 0.01 (HP group; $n=10$; $P < 0.05$) and 0.072 ± 0.02 (HPTD group; $n=10$; $P < 0.05$) nmol MDA/mg prot in kidney of rats that received treatment for four moths (figure 1a); And in serum, lipid peroxidation increased from 0.0016 ± 0.0002 nmol MDA/ml (controle group $n=7$) to 0.0020 ± 0.0004 (HP group $n=7$) and 0.0024 ± 0.01 (HPTD group $n=7$) nmol MDA/ml in plasma of rats that received treatment for four moths ($p < 0,05$) (figure 1b).

Protein carbonylation increased from 0.88 ± 0.33 nmol carbonyl/mg prot (control group $n=10$) to 1.51 ± 0.65 (HP group; $n=10$; $P < 0.02$) and 1.48 ± 0.33 (HPTD group; $n=10$; $P < 0.02$) nmol carbonyl/mg prot in kidney of rats that received treatment for four moths (figure 2a); In plasma, protein carbonylation increased from 1.07 ± 0.36 nmol/mg prot (Control group $n=7$) to 1.29 ± 0.23 nmol/mg prot (HP group $n=7$, no statistic difference) and 1.44 ± 0.32 (HPTD group $n=7$; $p < 0.05$) (figure 2b).

In figure 3 we verify that non protein tiol contend was decreased from 0.0152 ± 0.002 nmol/mg prot (control group $n=10$) to 0.0119 ± 0.001 (HPTD group; $n=10$; $P < 0.005$) nmol/mg prot in kidney of rats that received treatment for four moths; Protein tiol contend in plasma no demonstrate statistic differences.

The activity of Glioxalase I was increased in HPTD group 0.33 ± 0.03 U/mg prot ($n=10$; $p < 0.05$) and HP dieta $0.28 \pm 0,04$ U/mg prot ($n=10$, no statistic significance), compared with the control group 0.25 ± 0.02 U/mg prot ($n=10$) (figure 6).

As show in figure 4 HPTD induced increased in activitie of antioxidant enzyme SOD. SOD activity was increased from 48.91 ± 16.49 U SOD/mg prot (control group; n=10) to 63.25 ± 17.73 (HPTD group; n=10; $P < 0.01$) and CAT activity was decreased from 60.37 ± 8.18 U CAT/mg prot (control group; n=10) to 55.64 ± 8.89 (HP group; n=10; $P < 0.05$) and 48.27 ± 9.08 (HP group; n=10; $p < 0.05$). The SOD/CAT ratio was increased from 1.01 ± 0.24 arbitrary units (Control group n=10) to 1.58 ± 0.59 arbitrary units in the HPTD group (N=10; $p < 0.005$) (Fig. 4C).

DNA damage

DNA damage is related to T2DM, including its complications (8), Therefore, we sought out the effects of high fat diets on DNA damage levels in rat blood. Both high palatable diets induced marked DNA damage, but this phenomenon was higher in animals of the HPTD group (figure 5).

Discussion

The present study reveals a significant relationship between dietary AGE content, increased in oxidative stress and DNA damage.

The group that received a highly palatable diet, termolized or not, demonstrate alterations in the kidney and serum redox environment, increased the level of lipid peroxidation (TBARS level) and protein carbonylation, where the HPTD showed a greater increase. There are a number of enzymatic and nonenzymatic sources of ROS in the diabetic kidney, including auto-oxidation of glucose, transition metal-catalyzed Fenton reactions, advanced glycation, polyol pathway flux, mitochondrial respiratory chain deficiencies, xanthine oxidase activity, peroxidases, nitric oxide synthase (NOS) and NAD(P)H oxidase (10). the initiator of hyperglycemia-induced damage in the diabetic kidney is excess generation of mitochondrial O_2 , which then leads to activation of four major biochemical pathways, including increased AGEs formation, activation of protein kinase C isoforms, and increased flux through the polyol and hexosamine pathways (27). In addition, each of these pathways can contribute to perpetuation and in some cases initiate cellular ROS generation.

Bio-reactive advanced glycation end products (AGEs) alter the structure and function of molecules in biological systems and increase oxidative stress. These adverse effects of both exogenous and endogenously derived AGEs have been implicated in the pathogenesis of diabetic complications and changes associated with ageing including atherosclerosis, renal, eye and neurological disease.

Although elevated AGEs levels in patients with renal failure have been attributed to endogenous causes, namely increased oxidant stress and impaired renal clearance, (32) it now is evident that the ingestion of preformed AGEs peptides contained in foods, especially when prepared under elevated temperatures, represents an important cause for the increase of ages in the circulation and the impairment in redox state. After ingestion, 10% of preformed AGEs are absorbed into the human or rodent circulation(6), of which two-thirds are retained in tissues. This is demonstrated in our results where the HPTD group showed a greater increase in oxidative stress and impairment in antioxidant defense than the other groups.

Since the ultimate fate of most AGEs within the body is renal clearance, they can also interact with a number of renal cellular binding sites that mediate many of their biological effects. Arguably, the most important of these binding sites is the receptor for AGEs (RAGE), a member of the immunoglobulin superfamily (28). RAGE is a multi-ligand pattern recognition receptor involved in the amplification of immune and inflammatory responses primarily via activation of nuclear factor- κ B and production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α (29). Previously, cytosolic generation of ROS has been demonstrated in vitro through activation of the RAGE receptor in both proximal tubular and mesangial cells, most likely through NAD(P)H oxidase (30). This contribution of AGE-RAGE interactions to ROS generation in the pathogenesis of diabetic nephropathy has also been suggested in complementary in vivo studies (31).

The treatment with highly palatable termolizade diet caused a decrease in non protein thiol content in kidney mainly represented by the reduced form of glutathione (GSH). There is a decrease in the reduced form of glutathione given the prooxidant state imposed by a highly palatable termolized diet. Both hyperglycemia and oxidative stress are associated with GSH depletion and a decrease in an important non-enzymatic antioxidant defense.

There are a number of antioxidant systems in place to limit tissue damage initiated by the Maillard reaction including detoxification systems such as the glyoxalase pathway, aldose

reductases, aldehyde dehydrogenases, and the chelation of metal ions (33). We demonstrated an increased in Glyoxalase I activity. The upregulation of glyoxalase I suggests a possible defensive response to higher concentrations of the precursors of AGEs the α -dicarbonyls glyoxal and methylglyoxal.

High palatable thermolyzed diet increased the activity of SOD, suggesting an increased in $\cdot\text{O}_2$, since this free radical is that major allosteric activator of SOD activity. (34) however we found a decreased in Cat activity, as a consequence, an impairment SOD/CAT ratio is very likely to occur. This situation may result in an increased in H_2O_2 , favoring the permanence of a prooxidant state in kidney. Since H_2O_2 is a source of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) generation, the most powerful prooxidant molecule, by the Fenton reaction (35). Besides, AGEs modifications occur on antioxidant enzymes such as CuZnSOD, complex I, and MnSOD in diabetic nephropathy (36), and this would alter the activity of these enzymes, ultimately further contributing to excess cellular ROS accumulation. This reinforces our hypothesis that the elevated levels of AGEs in the diet contribute to an increased in oxidative stress.

Chronic illnesses such as obesity, diabetes mellitus and cancer have been shown to be associated with increased DNA damage (37). In the present study, the consume of high palatable diets was found to be associated to increased DNA damage. In situations when the generation of ROS exceeds the cell's antioxidant capacity (i.e., during conditions of oxidative stress), ROS amass and attack macromolecules such as lipids, proteins, and DNA.

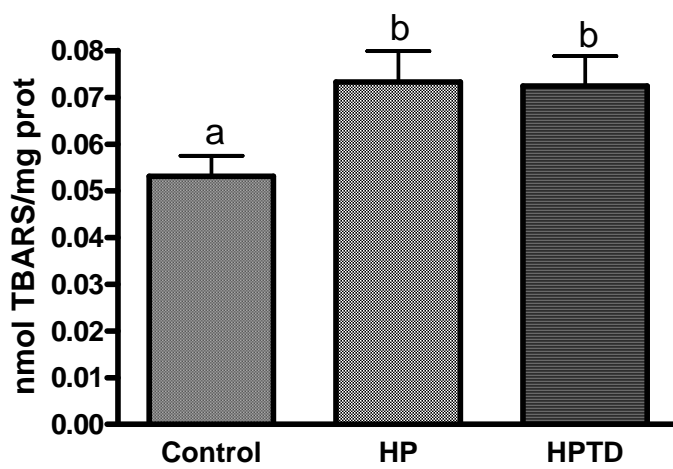
ROS mediated lipid peroxidation and glucose metabolism are some of the processes that lead to the production of reactive aldehydes. The aldehydic by-products of lipid peroxidation, i.e., crotonaldehyde, acrolein, 4-hydroxynonenal(HNE), and malondialdehyde (MDA), that was increased in serum of the animals treated with high palatable diets, form exocyclic ethano and propane base adducts in DNA that can block base pairing and are highly mutagenic. Oxidation of sugars, such as glucose, and sugar metabolism itself creates reactive carbonyl species, e.g., glyoxal and methylglyoxal, which can produce carcinogenic base adducts such as glyoxalated deoxycytidine (38).

In summary, we have established that the consumption of high palatable diet playing a role in the pathogenesis of diabetic complications by the impairs of redox homeostasis, reduced antiglycation defense and increased DNA damage. And the thermolization process aggravates such a condition because of the elevated levels of AGEs, in addition to these studies, against

the background of existing evidence for heat-promoted AGEs in human diets, led us to question the impact of the daily influx of food-derived AGEs analogs, especially in the context of existing diabetic nephropathy.

Fig 1: Lipid peroxidation kidney (A) and lipid peroxidation plasma (B) in rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference for TBARS ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

A.



B.

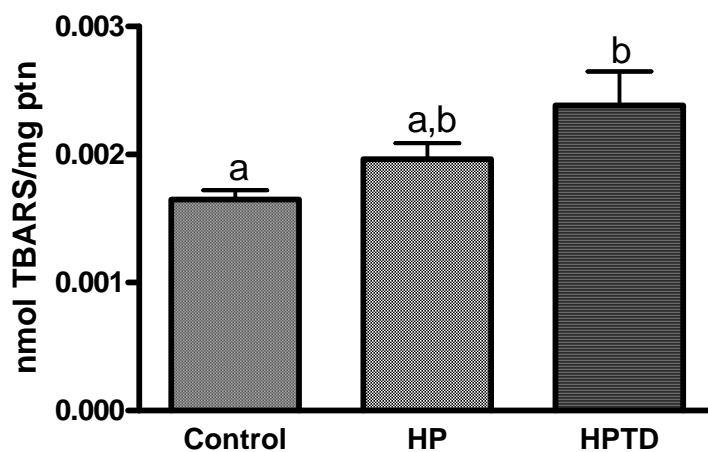
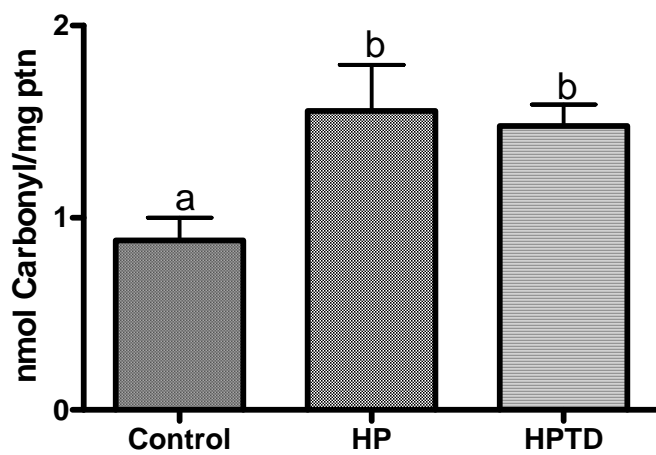


Fig 2: Protein carbonilation in kidney (A) and protein carbonylation in plasma (B) in rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference for Carbonil in kidney ($p < 0.02$) and in plasma ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

A.



B.

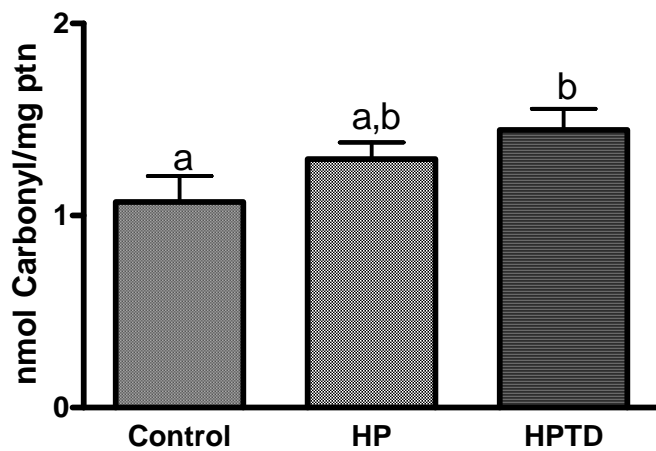
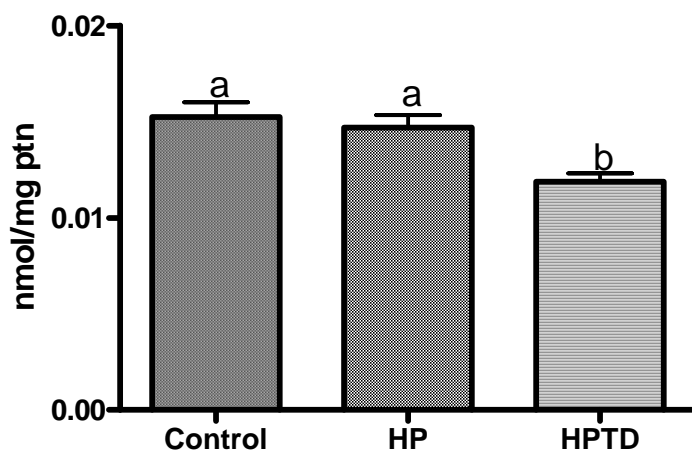


Fig 3: Non-protein thiol groups in kidney (A) and protein thiol groups in serum (B) in rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference ($p < 0.005$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

A.



B.

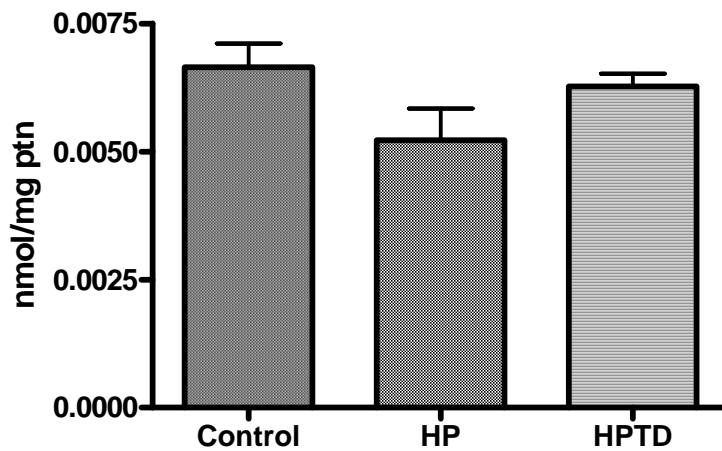
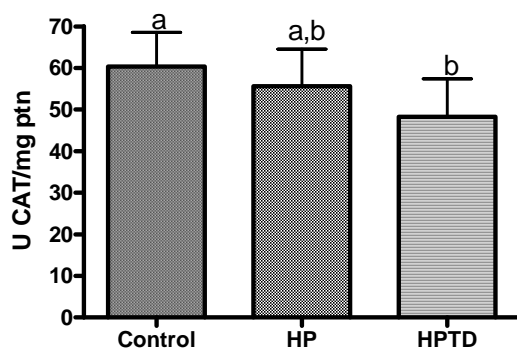
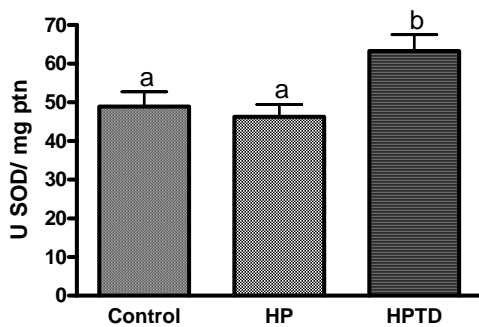


Fig 4: Antioxidant enzyme activity estimations in kidney; Catalase (CAT) activity (A), Superoxide dismutase (SOD) (B) and ratio SOD/CAT (C) in kidney of rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group) represented as mean \pm SD. Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) for CAT activity and ($p < 0.01$) for SOD activity, by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

A.



B.



C.

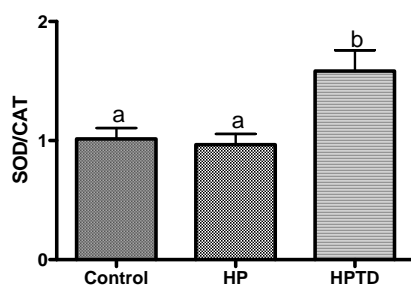


Figure 5: DNA damage in total blood of rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n= 7 per group). Different letters indicate the significant difference ($P > 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

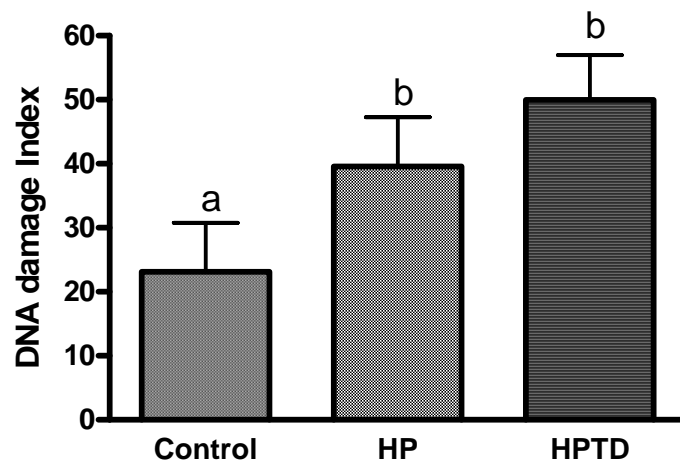
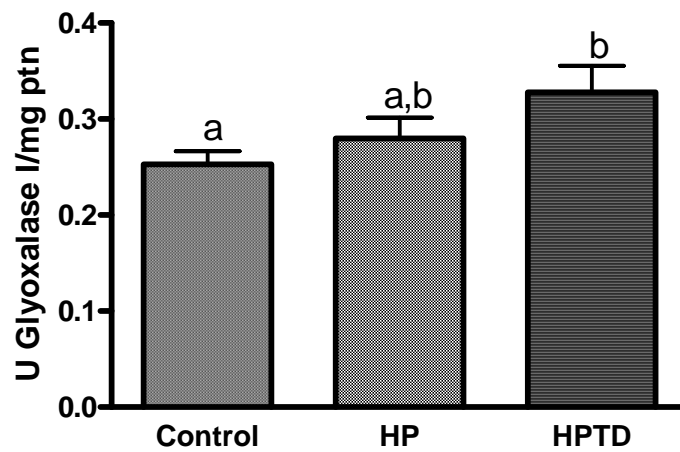


Figure 6: Glyoxalase I activity in kidney of rats after 4 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods section: Control (C), Highly Palatable Diet (HP) and Highly Palatable Thermolyzed Diet (HPTD) (n=10 per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.



Bibliography:

1. Marchetti, P., Dotta, F., de Lauro, D., Purrello, F. An over view of pancreatic beta-cell defects in human type2 diabetes: Implications for treatment. *Regulatory Peptides*; 146: 4–11, 2008.
3. Vlassara, H., Palace, M.R. Diabetes and advanced glycation end products. *Journal of Internal Medicine*; 251:87-101, 2002.
4. Zheng, F., He, C., Cai, W., Hattori, M., Steffes, M., Vlassara, H. Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycooxidation products. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18:224–237, 2002.
5. Koschinsky, T., He, C., Mitsuhashi, T., et.al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins) – a potential risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* ; 94:6474–6479, 1997.
6. He, C., Sabol, T., Mitsuhashi, T., Vlassara, H. Dietary glycotoxins: Inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. *Diabetes*; 48:1308–1315, 1999.
7. de Assis, A.M., Rieger, D.K., dos Santos, A.L., Battu, C., Raymndi, S., da Rocha, R.F., Andreazza, A.C., Farina, M., Rotta, L.N., Gottfried, C., Gonçalves, C.A., Moreira, J.C., Perry, M.L.S. High Fat and Highly Thermolyzed Fat Diets Promote Insulin Resistance and Increase DNA Damage in Rats. *Exp. Biol. Med.* 234:000–000, 2009.
8. Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska, M., Drzewoski, J. DNA damage and repair in type2 diabetes mellitus. *Mutat. Res.* 554:297–304, 2004;
9. Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Augé, N., Pamplona, R., Portero-Otín, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal.* 11(12):3071-109, 2009.
10. Forbes, J.M., Coughlan, M.T., Cooper, M.E. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes* 57:1446–1454, 2008.
11. Sandu, O; Song, K; Weijing, C; Zheng, F; Uribarri, J; Vlassara, H. Insulin resistance and tipe 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotxin intake. *Diabetes*; 54: 2314 – 2319, 2005.
12. Diamanti-Kandarakis, E., Piperi, C., Korkolopoulou, P., Kandaraki, E., Levidou, G., Papalois, A., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med*; 85:1413–1420, 2007.
13. C.G. Souza, J.D. Moreira, I.R. Siqueira, A.G. Pereira, D.K. Rieger, D.O. Souza, T.M. Souza, L.V. Portela, M.L.S. Perry. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*; 81: 198–203, 2007.
15. Akazawa, T., Conn, R.E. The oxidation of reduced pyridine nucleotides by peroxidase. *J Biol Chem*; 232: 403-415, 1958.

16. Draper, H.H., Hadley, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*; 186:421–431, 1990.
17. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*; 186:464–478, 1990.
18. Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M.M., Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol*; 88:119–25, 2001.
19. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*; 82:70–7, 1959.
20. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*; 105:121–126, 1984.
21. Misra, H. P., Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*; 247: 3170–3175, 1972.
22. Mannervik, B., Aronsson, A.C., Marmstål, E., Tibbelin, G. Glyoxalase I (rat liver). *Methods Enzymol*. 77:297-301, 1981.
23. Gedik, C. M., Grant, G., Morrice, P. C., Wood, S. G., Collins, A. R. Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats. *Eur J Nutr* 44:263–272, 2005.
24. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221, 2000.
25. Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. The comet assay: what can treallytellus? *Mutat Res* 29:183–193, 1997.
26. Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.F. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*; 93: 265–75, 1951.
27. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X .L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787–790, 2000.
28. Neeper, M., Schmidt, A. M., Brett, J., Yan, S. D., Wang, F., Pan, Y. C., Elliston, K., Stern, D., Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998–15004, 1992.
29. Schmidt, A. M., Hori, O., Chen, J. X., Li, J. F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S. D., Brett, J., Stern, D. Advanced glycation end products interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) In culture human endothelial cell sandin mice: a potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96:1395–1403, 1995.
30. Wendt, T. M., Tanji, N., Guo, J., Kislinger, T. R., Qu, W., Lu, Y., Bucciarelli, L. G., Rong, L. L., Moser, B., Markowitz, G. S., Stein, G., Bierhaus, A., Liliensiek, B., Arnold, B., Nawroth, P. P., Stern, D. M., D'Agati, V. D., Schmidt, A. M. RAGE drives the development

of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 162:1123–1137,2003.

31. Inagi, R., Yamamoto, Y., Nangaku, M., Usuda, N., Okamoto, H., Kurokawa, K., van Yperselede Strihou, C., Yamamoto, H., Miyata, T. A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by megin overexpression in RAGE/iNOS transgenic mice. *Diabetes* 55:356–366, 2006.

32. Uribarri, J., Peppas, M., Cai, W., Goldberg, T., Lu, M., Baliga, S., Vassalotti, J.A., Vlassara, H. Dietary Glycotoxins Correlate With Circulating Advanced Glycation End Product Levels in Renal Failure Patients *Am J Kidney Dis* 42:532-538 2003.

33. Magdalena, M., Staniszewska Ram,H. Nagaraj. Upregulation of glyoxalase I fails to normalize methylglyoxal levels: A possible mechanism for biochemical changes in diabetic mouse lenses *MolecularandCellularBiochemistry* 288: 29–36,2006.

34. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids.*Arch Biochem Biophys.* 280(1):1-8, 1990.

35. Halliwell, B. Reactive Species and Antioxidants *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life Plant Physiology*, Vol.141,pp.312–322, 2006.

36. Melinda, T., Coughlan, Amy L., Mibus, Forbes, J.M. Oxidative Stress and Advanced Glycation in Diabetic Nephropathy *Ann.N.Y.Acad.Sci*; 1126:190–193, 2008.

37. Faust, F., Kassie, F., Knasmüllerb, S.,Mann, S.H.B.M., Mersch-Sundermann, V. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies *Mutation Research*; 566:209–229, 2006.

38.Kulkarni, A.,Wilson, D.M. The Involvement of DNA-Damage and-Repair Defects in Neurological Dysfunction *The American Journal of Human Genetics* 82,539–566, 2008.

PARTE III

4. DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou os efeitos do consumo de uma dieta hiperpalatável e de uma dieta hiperpalatável aquecida a 130°C/30min, com a finalidade de torná-la enriquecida em Produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Sandu, et al., 2005; Diamanti-Kandarakis, et al., 2007), sobre parâmetros de resistência à insulina, estresse oxidativo, defesa antiglicação e dano ao DNA.

Mostramos que animais submetidos a uma dieta hiperpalatável aquecida ou não, apresentam mudanças na homeostase da glicose, justificadas pelo teste de tolerância à glicose, onde os animais dos grupos HP e HPTD são mais intolerantes do que o grupo controle, sendo que a dieta aquecida contribui para uma maior intolerância à glicose.

Animais submetidos às dietas hiperpalatáveis apresentam um aumento no peso corporal e do tecido adiposo. Também apresentaram alterações em parâmetros bioquímicos como o aumento dos níveis plasmáticos de glicose e dos ácidos graxos livres no soro, parâmetros indiretos de resistência á insulina (Burgert et al., 2006).

Em ratos e humanos, a ingestão de altas quantidades de gordura e carboidratos simples provoca efeitos adversos na sensibilidade à insulina. De fato, o consumo de uma dieta com alta palatabilidade, conhecida também como dieta de cafeteria ou dieta dos países ocidentalizados, tem sido associada com o aumento da adiposidade e resistência à insulina em humanos (Prada, et al., 2005). Pesquisadores concordam que a resistência à insulina precede o desenvolvimento da hiperglicemia, e diferentes variáveis estão envolvidas em seus efeitos metabólicos (DeFronzo, 2009; Lillioja, et al., 1998; Lyssenko, et al., 2005).

Outro parâmetro observado foi a redução na concentração hepática de glicogênio nos grupos HP e HPTD. Golden, (1979), Gannon e Nuttal (1997) demonstram que esta

concentração em animais diabéticos no estado alimentado encontra-se diminuída. A insulina promove o acúmulo de glicogênio através do estímulo da enzima glicogênio sintase e redução da degradação do glicogênio via inibição da enzima glicogênio fosforilase. Ambas atividades da insulina no fígado, acima mencionadas, parecem estar desreguladas tanto na fosforilação quanto na transcrição gênica no diabetes tipo 2 (Velho, et al., 1996).

A partir deste dado verificamos os efeitos das dietas na síntese de glicogênio no fígado dos animais e observamos uma menor síntese a partir de glicose nos animais tratados com a dieta hiperpalatável aquecida. Este efeito pode estar relacionado com os altos níveis de AGEs na circulação, visto que a hiperglicemia, causada pelo consumo de dietas hiperpalatáveis, aumenta a glicação não enzimática de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, o que resulta no acúmulo de moléculas heterogêneas conhecidas como AGEs (Goldberg, et al., 2004). Os AGEs possuem propriedades pró-oxidantes e pró-inflamatórias, quando são reconhecidos pelo seu receptor RAGE e ativam o fator de transcrição genética NF- κ B que estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α (Goldin, et al., 2006), e inibe a atividade do receptor de insulina e uma série de passos enzimáticos que dependem desta ativação, como a atividade da enzima glicogênio sintase, justificando esta diminuição encontrada na síntese de glicogênio hepático.

Além da sua formação endógena, AGEs presentes nos alimentos, especialmente quando submetidos a altas temperaturas no preparo, representam uma importante causa para o seu aumento na circulação e nos tecidos. Recentes estudos em humanos confirmam que em torno de 10% dos AGEs ingeridos são absorvidos e correlacionados com o nível de AGEs na circulação (Negrean, et al., 2007). Pesquisadores confirmam esta significativa absorção intestinal de AGEs e proporcional deposição de AGEs em tecidos como rim e fígado (Basta, et al., 2004; Coughlan, et al., 2008). Uma restrição dietética de AGEs resultaria em significativa redução dos níveis de AGEs circulantes e redução da progressão da aterosclerose

e diabetes em modelos animais para estas doenças, bem como em pacientes diabéticos com função renal normal e não diabéticos com função renal comprometida (Koschinsky, et al., 1997).

Além disso, o aumento de ácidos graxos livres circulantes levam ao acúmulo intra-hepático de lipídeos pelo aumento da concentração intracelular de diacilglicerol devido a lipogênese aumentada e /ou diminuída oxidação de ácidos graxos na mitocôndria, ativando PKC, que se liga e inativa o receptor de insulina e sua atividade cinase, resultando na redução da fosforilação de IRS-1 e IRS-2 estimulada por insulina. Isto por sua vez resulta na redução da fosforilação e ativação de PI3K e AKT. Redução na ativação de AKT resulta em menor fosforilação de GSK3 que pode contribuir para menor síntese de glicogênio estimulada por insulina (Savage, et al., 2007; Oakes, et al., 1997).

O tratamento com uma dieta hiperpalatável, aquecida ou não, alterou o ambiente redox no fígado, rim e soro dos animais, isto é demonstrado pelo aumento do nível de peroxidação lipídica (TBARS) e carbonilação de proteínas nestes tecidos.

A elevação crônica da glicose é umas das alterações metabólicas causadas pelo consumo de uma dieta hiperpalatável. Hiperglicemia *per se* é associada com o aumento na produção de EROs por diferentes mecanismos. Um destes mecanismos é a elevação da glicose dentro das células, aumentando a oferta de glicose para oxidação via glicólise e ciclo de Krebs. O efeito do aumento desta oxidação é a produção de doadores de elétrons para cadeia transportadora na mitocôndria (NADH e FADH₂) em quantidades elevadas. Como resultado, o gradiente de voltagem através da membrana mitocondrial aumenta até que um limiar crítico é atingido. Neste ponto o complexo III da cadeia é bloqueado, causando um retorno dos elétrons para a coenzima Q, que doará estes elétrons para o oxigênio molecular formando superóxido (Bronwlee, 2004). Outros mecanismos de formação de EROs pelo

aumento da concentração de glicose são a auto-oxidação da glicose, o metabolismo anormal do ácido aracdônico, a ativação da proteína cinase C, aumento na atividade da Oxido nítrico sintase (NOS), ativação da rota da aldose redutase e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Baynes & Thorpe, 1999) .

Produtos finais de glicação alteram a estrutura e função de moléculas nos sistemas biológicos e aumentam o estresse oxidativo. Os AGEs exercem seus efeitos através da alteração da função de proteínas e interferem nas funções celulares pelo aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio através da ligação com seu receptor, RAGE. Demonstramos neste trabalho um aumento do conteúdo dos receptores de AGEs no tecido hepático. AGEs através da ligação com seu receptor RAGE, promove ativação de NAD(P)H oxidase, aumentando a formação de EROs. Estes efeitos adversos tem sido relacionados com a patogênese das complicações do diabetes e mudanças associadas incluindo aterosclerose, nefropatia, retinopatia e doenças neurológicas (Wendt, et al., 2003). Contudo, não podemos justificar que o aumento do estresse oxidativo seja mediado exclusivamente por RAGE.

O aumento na geração de EROs também esta interligado com intermediários da formação de AGEs. Metilgioxal (MG), um α -oxaldeido intermediário na rota de formação de AGEs pode gerar EROs. A produção de MG a partir de acetona e aminoacetona produz peróxido de hidrogênio e radical superóxido. Metilgioxal interage com os grupos SH de proteínas como a GSH, formando adutos hemetilacetal e diminuindo os níveis de GSH em vários tipos de células. Também reage com grupo funcional de varias moléculas afetando sua atividade biológica, a modificação de proteínas, como SOD, CAT e GSH peroxidase, pelo metilgioxal pode resultar na perda ou diminuição da sua atividade enzimática (Kalapos, 2008).

As alterações encontradas nos parâmetros de estresse oxidativo foram mais significativas nos animais que receberam a dieta hiperpalatável aquecida. Estas modificações podem estar relacionado com o aumento de AGEs circulantes advindos da dieta. Embora muitos estudos demonstrem que AGEs endógenos estão envolvidos na patogênese de muitas doenças (Goldin, et al., 2006; Basta, et al., 2004; Thornalley, et al., 1999), o aumento do estresse oxidativo observado pelos resultados causados pela dieta aquecida encontrados neste trabalho podem ser explicados pelo aumento na ingestão de AGEs na dieta. Estes achados sugerem que AGEs vindos da dieta podem constituir um fator de risco ambiental para dano tecidual, e o aumento do estresse oxidativo pode ser a explicação para este dano (He, et al., 1999).

O tratamento com dieta hiperpalatável aquecida causou uma diminuição no conteúdo de grupos tiois não protéicos no fígado e no rim, representados principalmente pela forma reduzida da glutathiona (GSH). Esta diminuição da forma reduzida da glutathiona é justificada pelo estado pró-oxidante imposto pelas dietas hiperpalatáveis. Ambos, hiperglicemia e estresse oxidativo, são associadas com a depleção de GSH sendo que esta é considerada uma defesa não enzimática muito importante.

Existem no organismo sistemas antiglicação que protegem os tecidos dos danos causados pela formação de AGEs, estes sistemas incluem sistemas de detoxificação de precursores α -dicarbonil como o glioxal e metilglioxal pela rota das Glioxalases. Neste estudo observamos uma diminuição na atividade da enzima Glioxalase I no fígado. A Glioxalase I tem um papel fundamental na diminuição da formação de AGEs, uma vez que com a diminuição na sua atividade a concentração de precursores de AGEs, glioxal e metilglioxal, aumentam. Visto que a atividade desta enzima é dependente de níveis adequados de GSH (Shangari, et al., 2003), a depleção experimental da GSH, como observado no fígado dos

animais tratados com a dieta aquecida, induz a diminuição na atividade desta enzima e o acúmulo de precursores de AGEs promovendo citotoxicidade. Já no rim encontramos um aumento significativo na atividade da enzima Glioxalase I, sugerindo uma possível resposta defensiva a altas concentrações de glioxal e metilglioxal.

O grupo que recebeu a dieta hiperpalatável aquecida apresentou aumento na atividade da SOD no rim, sugerindo um aumento na concentração de $\cdot\text{O}_2^-$, pois este radical livre é o maior ativador alostérico da atividade desta enzima. (Halliwell & Gunter, 1999). Contudo, encontramos uma diminuição na atividade da CAT, prejudicando a relação SOD/CAT, o que possivelmente esteja relacionado com uma elevada concentração de H_2O_2 , favorecendo a permanência de um estado pró-oxidante neste tecido, uma vez que H_2O_2 é uma fonte de geração de radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), a mais poderosa molécula próoxidante, pela reação de Fenton (Halliwell, 2006). Além disso, modificações causadas por AGEs podem ocorrer em enzimas antioxidantes como CuZnSOD, MnSOD, GPx e complexo I da cadeia respiratória na nefropatia diabética (Coughlan, et al., 2008), e isto pode levar a alteração na atividade destas enzimas, contribuindo por fim para o acúmulo de EROs.

Já no fígado, o grupo tratado com a dieta hiperpalatável aquecida apresentou uma diminuição em ambas as atividades de SOD e CAT. Isto pode aumentar a disponibilidade de superóxido, já que a atividade da SOD esteja reduzida. Este aumento de superóxido pode alostericamente inativar CAT, diminuindo sua atividade (de Oliveira, et al., 2007).

O consumo de dietas hiperpalatáveis aumenta a produção de superóxido pela elevação crônica da glicose e pelo aumento na produção endógena de AGEs que geram EROs durante a sua formação e pela sua ligação com seu receptor RAGE. Fontes exógenas de AGEs como a dieta promovem um aumento destes metabolitos na circulação, contribuindo para o aumento

dos danos provocados pelos AGEs. O aumento de EROs e a diminuição na atividade de enzimas antioxidantes resultam em uma situação de estresse oxidativo.

Para entender o aumento de ácidos graxos livres na circulação destes animais verificamos a síntese de lipídeos e oxidação de glicose no tecido adiposo. Mostramos uma diminuição na oxidação de glicose e na síntese de lipídeos. No tecido adiposo, uma importante consequência da resistência à insulina é o aumento da lipólise e a menor captação e esterificação de ácidos graxos livres (Bays et al., 2004) levando a um maior fluxo deste metabolito para o músculo e o fígado, contribuindo para o desenvolvimento das complicações geradas pela lipotoxicidade nestes e em outros tecidos (Mcgarry et al., 2002). Durante uma ingesta excessiva de calorias os adipócitos desencadeiam uma resposta inflamatória, liberando citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Estas citocinas provocam dois efeitos dramáticos na função dos adipócitos – um aumento na lipólise e um a diminuição na síntese de triglicerídeos. Isto resulta no aumento dos níveis de AGL, aumentando a sua oxidação pela mitocôndria. A β oxidação dos ácidos graxos e a oxidação dos AGL gera acetilCOA para o ciclo de Krebs, que aumenta a liberação de doadores de elétrons para a cadeia transportadora (NADH e FADH₂), causando um aumento na produção de EROs pelo mesmo mecanismo descrito para a hiperglicemia.

Doenças crônicas como obesidade, diabetes mellitus e câncer, estão associadas com o aumento no dano ao DNA (Faust et al., 2004). No presente estudo, o consumo de dietas hiperpalatáveis aumentou o dano ao DNA. Em situações onde a geração de EROs excede a capacidade antioxidante da célula (durante condições de estresse oxidativo) há um acúmulo de EROs que atacam macromoléculas como lipídeos, proteínas e o DNA.

EROs provocam o aumento na peroxidação lipídica, este aumento leva a produção de aldeídos reativos. Os produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA),

acroleína, crotonaldeído, que estão aumentados no soro dos animais submetidos a dietas hiperpalatáveis, formam aductos exocíclicos de propano e etano na base do DNA, que podem bloquear o pareamento e são altamente mutagênicos. A oxidação de açúcares como a glicose, e a reação de Maillard aumentam a concentração de espécies reativas dicarbonil (glioxal e metilglioxal) que podem produzir aductos carcinogênicos como glioxalato deoxitidina (Kulkarni & Wilson, 2008).

Com base nos resultados podemos dizer que o consumo de dietas hiperpalatáveis causou hiperglicemia e induziu estresse oxidativo em diferentes tecidos periféricos, através da formação endógena e do consumo de AGEs. Os mecanismos que explicam esta interação entre estresse oxidativo e AGEs justificam muitos dos resultados encontrados neste trabalho e corroboram dados da literatura que relacionam o aumento do consumo de dietas ricas em AGEs com aumento do estresse oxidativo e a fisiopatologia das complicações do diabetes.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que o consumo de dietas hiperpalatáveis acarreta um aumento da glicose e ácidos graxos livres no soro, reduz a concentração de glicogênio no fígado, aumenta adiposidade e prejudica a tolerância à glicose. O processo de aquecimento agrava estas condições possivelmente pela formação de Produtos Finais de Glicação Avançada, além de exercer um importante papel na patogênese das complicações do diabetes por prejudicar a homeostase redox, a defesa antiglicação e aumentar o dano ao DNA. Neste trabalho demonstramos o impacto do consumo de uma dieta hiperpalatável na sensibilidade à insulina e desenvolvimento do diabetes, na produção de espécies reativas de oxigênio e alterações nas defesas antioxidantes e antiglicantes. Portanto intervenções nutricionais para prevenção da resistência à insulina são estratégias preventivas importantes para diminuição do diabetes e suas complicações. Este modelo de tratamento simula uma condição nutricional muito comum para grande parcela da população, o estudo sobre as consequências do seu consumo devem ser cuidadosamente avaliados e considerados.

6. BIBLIOGRAFIA

ALISON GOLDIN, BA; JOSHUA A. BECKMAN, MD; ANN MARIE SCHMIDT, MD; MARK A. CREAGER, MD. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury, **Circulation**; 114: 597-605, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**; 29 (suppl1): S43:48, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Mortality. **Diabetes Vital Statistics**; 75–86, 2001.

BASHAN, N., KOVSAN, J., KACHKO, I., VADIA, H., RUDICH, A. Positive and Negative Regulation of Insulin Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Physiol Rev**; 89:27–71, 2009.

BASTA, G., SCHIMIDT, A.M., CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular Research**; 63: 582– 592, 2004.

BAYNES, J.W., THORPE, S.R., Perspectives in Diabetes Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications A New Perspective on an Old Paradigm **D i a b e t e s**; 48:1–9, 1999.

BAYS, H., MANDARINO, L., DEFRONZO, R.A. Role of the role of the adipocyte, free fat acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator – activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; 89: 463-478, 2004.

BOWIE, A., O'NEILL, L.A. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. **Biochem. Pharmacol**; 59(1):13-23, 2000.

BROWNLEE, M. Banting Lecture The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. **Diabetes**; 54: 1615-1625, 2004.

BURGERT, T.S., TAKSALI, S.E., DZIURA, J., GOODMAN, T.R., YECKEL, C.W., PAPADEMETRIS, X., CONSTABLE, R.T., WEISS, R., TAMBORLANE, W.V., SAVOYE, M., SEYAL, A.A., CAPRIO, S. Alanine aminotransferase levels and fatty liver in childhood obesity: associations with insulin resistance, adiponectin, and visceral fat. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; 91(11): 4287–4294, 2006.

- BUTLER, A.E., JANSON, J., BONNER-WEIR, S., RITZEL, R., RIZZA, R.A., BUTLER, P.C. Cell deficit and increased cell apoptosis in humans with type2 diabetes. **Diabetes**; 52:102–110, 2003.
- CANCELLO, R., TORDJMAN, J., POITOU, C., GUILHEM, G., BOUILLOT, J.L., HUGOL, D., COUSSIEU, C., BASDEVANT, A., BARHEN, A., BEDOSSA, P., GUERRE-MILLO, M., CLEMENT, K. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid humano besity. **Diabetes**; 55:1554–1561, 2006.
- CARPENTIER, A., MITTELMAN, S.D., BERGMAN, R.N., GIACCA, A., LEWIS, G.F. Prolonged Elevation of Plasma Free Fatty Acids Impairs Pancreatic - Cell Function in Obese Nondiabetic Humans But Not in Individuals With Type 2 Diabetes. **D i a b e t e s**; 4 9 :3 9 9–408, 2000.
- CHANCE, B., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev**; 59(3):527-605, 1979.
- CHANG-CHEN, K.J., MULLUR, R., BERNAL-MIZRACHI, M., β cell failure as a complication of diabetes **Rev. Endocr. Metab. Disord**; 9:329–343, 2008.
- COUGHLAN, M., MIBUS, A.L., FORBES, J.M. Oxidative Stress and Advanced Glycation in Diabetic Nephropathy. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**; 1126:190–193, 2008.
- DAVID, E., KELLEY BRET, H., Goodpaster, Len Storlien. Muscle Triglyceride and Insulin resistance. **Rev.Nutr**; 22: 325–46, 2002.
- DE OLIVEIRA, M.R., DE BITTENCOURT PASQUALI, M.A., SILVESTRIN, R.B., MELLO E SOUZA, T., MOREIRA, J.C. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. **Brain Res.**; 12; 1169: 112-9. 2007.
- DEFRONZO, R.A. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type2 Diabetes Mellitus. **Diabetes**; 58: 773-795, 2009.
- DEFRONZO, R.A., Pathogenesis of type2 diabetes mellitus. **Med. Clin. N. Am**; 88:787–835, 2004.
- DESPRÉS, J.P., LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**; 444: 881-886, 2006.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, PIPERI C, KORKOLOPOULOU P, KANDARAKI E, LEVIDOU G, PAPALOIS A, PATSOURIS E, PAPAVALASSILIOU AG. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. **J. Mol. Med**; 85:1413–1420, 2007.
- DIAMOND, M.P., THORNTON, K., CONNOLLY-DIAMOND, M., SHERWIN, R.S., DEFRONZO, R.A., Reciprocal variation in insulin-stimulated glucose uptake and pancreatic

- insulin secretion in women with normal glucose tolerance. **J. Soc. Gynecol. Invest**; 2:708–715, 1995.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev**; 82(1):47-95, 2002.
- ESPLUGUES, J.V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **Br. J. Pharmacol**; 135(5):1079-95, 2002.
- FONTANA, L., EAGON, J.C., TRUJILLO, M.E., SCHERER, P.E., KLEIN, S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. **Diabetes**; 56:1010–1013, 2007.
- FORBES, J.M., COUGHLAN, M.T., COOPER, M.E., Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. **Diabetes**; 57:1446–1454, 2008.
- GANG HU et.al. Physical activity, body mass index, and risk of tipe 2 diabetes in patients with normal or impaired glucose regulation. **Archives of Internal Medicine**; 164: 892-896, 2004.
- GANNON, M.C., NUTTALL, F.Q. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein and mRNA in rats. **Diabetologia**; 40: 758-763, 1997.
- GOH, S.Y., COOPER, M.E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J. Clin. Endocrin. Metab**; 93(4):1143-52, 2008.
- GOLDBERG, T., CAI, W., PEPPA, M., DARDAINE, V., BALIGA, B.S., URIBARRI, J., VLASSARA, H. Advanced Glycooxidation End Products in Commonly Consumed Foods. **J. Am. Diet Assoc**; 104:1287-1291, 2004.
- GOLDBERG, T., CAI, W., PEPPA, M.P., DAIANE, V.Q., BALIGA, B., URIBARRI, J., VLASSARA, H. Advanced Glycooxidation End Products in Commonly Consumed Foods. **J. Am. Diet. Assoc**;104:1287-1291, 2004.
- GOLDEN, S. ET.al. Glycogen synthesis by hepatocytes from diabetec rats. **Biochemical Journal**; 182: 727-734, 1979.
- GROOP, L.C., BONADONNA, R.C., DELPRATO, S., RATHEISER, K., ZYCH, K., FERRANNINI, E., DEFRONZO, R.A. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. Evidence for multiples sites of insulin resistance. **J. Clin. Invest**; 84:205–15, 1989.
- GUILHERME, A., VIRBASIOUS, J.V., PURI, V., CZECH, M.P. Adipocyte disfunctions linking obesity to insulin resistance and tipe 2 diabetes. **Nature reviews, molecular cell biology**; 9: 367-377, 2008.
- HAJER, G.R., VAN HAEFTEN, T.W., VISSEREN, F.L. Adipose tissue dysfunction in obesity diabetes, and vascular diseases. **Eur. Heart. J**; 29 (24):2959-71, 2008.

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

HALLIWELL B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**; 18: 685-716, 2001.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol**; 142(2): 231-55, 2004.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**; 141: 312–322, 2006.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys**; 280(1):1-8, 1990.

HE, C.,SABOL, T., MITSUHASHI ,T., VLASSARA, H. Dietary glycotoxins: Inhibition of reactive products by aminoguanidine facilitates renal clearance and reduces tissue sequestration. **Diabetes**; 48:1308–1315, 1999.

HOBBS, A.J., HIGGS, A., MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol Toxicol**; 39:191-220, 1999.

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

KALAPOPOS, M.P., The tandem of free radicals and methylglyoxal. **Chemico-Biological Interactions**; 171: 251–271, 2008.

KASHYAP, S.R., DEFRONZO, R.A. The insulin resistance syndrome: physiological considerations. **Diabetes Vasc. Dis. Res**;4:13–19, 2007.

KNASMÜLLERB, S., MANN, R.H.B.M., MERSCH-SUNDERMANN, V. FAUST, F., KASSIE, F. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutation Research**; 566: 209–229, 2004.

KOHÁRYOVÁ, M., KOLÁROVÁ, M. Oxidative stress and thioredoxin system. **Gen. Physiol. Biophys.**; 27(2): 71-84, 2008.

KOSCHINSKY T, HE CJ, MITSUHASHI T, BUCALA R, LIU C, BUENTING C, HEITMANN K, VLASSARA H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 94: 6474 – 9, 1997.

KOSCHISKY, T., HE, C.J., MITSUHASHI, T., BUCALA, R., LIU, C., BUETING, C., HEITMANN, C., VLASSARA, H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Medical Sciences* 94: 6474–6479,1997.

KULKARNI, A., WILSON, D.M. The Involvement of DNA-Damage and-Repair Defects in Neurological Dysfunction. **The American Journal of Human Genetics**; 82: 539–566, 2008.

LAPOLLA, A., TRALDI, P., FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. **Clinical Biochemistry**; 38:103-115, 2005.

LAZAR, M.A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. **Science**; 307:373–375, 2005.

LEE, A.Y., CHUNG, S.S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. **FASEB J**; 13: 23–30,1999.

LILLIOJA, S., MOTT, D.M., HOWARD, B.V., BENNETT, P.H., YKI-JARVINEN H., FREYMOND, D., NYOMBA, B.L., ZURLO, F., SWINBURN, B., BOGARDUS, C. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action: longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. **N. Engl. J. Med**; 318:1217–1225, 1998.

LYSSENKO, V., ALMGREN, P., ANEVSKI, D., PERFEKT, R., LAHTI, K., NISSEN, M., ISOMAA, B., FORSEN, B., HOMSTROM, N., SALORANTA, C., TASKINEN, M.R., GROOP, L., TUOMI, T. Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. **Diabetes**; 54:166–174, 2005.

MACGARRY, J.D. Desregulation of Fatt Acid Metabolism in the Etiology of type 2 diabetes. **Diabetes**; 51: 7-18, 2002.

MARCHETTI, P., DOTTA, F., DE LAURO, D., PURRELLO, F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. **Regulatory Peptides**; 146: 4–11, 2008.

MATÉ, J.M., REZ-GOMEZ, C., CASTRO, I.N. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. **Clinical Biochemistry**; 32: 595-603, 1999.

MATSUZAWA, Y., FUNAHASHI, T., NAKAMURA, T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines and adipocyte-derived bioactive substances. **Ann. N.Y. Acad. Sci**; 892:146–154, 1999.

NAVASA, M., GORDON, D.A., HARIHARAN, N., JAMIL, H., SHIGENAGA, J.K., MOSER, A., FIERS, W., POLLOCK, A., GRUNFELD, C., FEINGOLD, K.R. Regulation of microsomal triglyceride transfer protein mRNA expression by endotoxin and cytokines. **J. Lipid. Res**; 39: 1220–1230, 1998.

NEGREAN, M., STIRBAN, A., STRATMANN, B., GAWLOWSKI, T., HORSTMANN, T., GÖTTING, C., KLEESIEK, K., ROESEL, M.M., KOSCHINSKY, T., URIBARRI, J., VLASSARA, H., TSCHOEPE, D. Effects of low – and high – advanced glycation end product meals on macro – and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. **Am. J. Clin. Nutr**; 85:1236–43, 2007.

NEGRE-SALVAYRE, A., SALVAYRE, R., AUGÉ, N., PAMPLONA, R., PORTERO-OTÍN, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. **Antioxidants & Redox Signaling**; 11(12):3071-109, 2009.

OAKES, N.D. ET.al. Mechanism of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. **Diabetes**; 46: 1768-1774, 1997.

OTERO, M., LAGO, R., LAGO, F., CASANUEVA, F.F., DIEGUEZ, C., GOMEZ-REINO, J.J., GUALILLO, O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett**; 479:295–301, 2005.

POITOUTAND, V.R., ROBERTSON, P. Glucolipototoxicity: Fuel Excess and Cell Dysfunction. **Endocrine Reviews**; 29:351–366, 2008.

PRADA PO, ZECCHIN HG, GASPARETTI AL, TORSONI MA, UENO M, HIRATA AE, COREZOLA DO AMARAL ME, HÖER NF, BOSCHERO AC, SAAD MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**; 146(3):1576-87, 2005.

PRADA, P.O., ZECCHIN, H.G., GASPARETTI, A.L., TORSONI, M.A., UENO, M., HIRATA, A.E., AMARAL, M.E.C., HÖER, N.F., BOSCHERO, A.C., SAAD, M.J.A., Western Diet Modulates Insulin Signaling, cJun N Terminal Kinase Activity, and Insulin Receptor Substrate-1 ser307 Phosphorylation in a Tissue-Specific Fashion. **Endocrinology**; 146:1576–1587, 2005.

RUDOFISKY, G., JR, SCHROEDTER, A., SCHLOTTERER, A., VORON'KO, O.E., SCHLIMME, M., TAFEL, J., ISERMANN, B.H., HUMPERT, P.M., MORCOS, M., BIERHAUS, A., NAWROTH, P.P., HAMANN, A. Functional polymorphisms of UCP2 and UCP3 are associated With a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**; 29: 89–94, 2006.

SAAD M.J., POITOUTAND, V.R., ROBERTSON, P. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Braz. J. Med. Biol. Res.**; 27(4):941-57, 1994.

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

SAVAGE, D.B. ET.al. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiological Reviews**; 87: 507-520, 2007.

SAYESKI, P.P., KUDLOW, J.E. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha transcription. **J. Biol. Chem**; 271:15237–15243,1996.

- SCHMIDT, A.M., YAN, S.D., YAN, S.F., STERN, D.M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **J. Clin. Invest**; 108:949–955, 2001.
- SHANGARI, N., BRUCE, W.R., POON, R., O'BRIEN, P.J. Toxicity of glyoxals – role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency. **Biochemical Society Transactions**; Vol.31, part 6, 2003.
- SIES H. Strategies of antioxidant defense. **Eur. J. Biochem**; 215(2):213-9, 1993.
- SMYTH, S., HERON, A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. **Nature Medicine**; 12:75-80, 2006.
- SOUZA, C.G., MOREIRA, J.D., SIQUEIRA, I.R., PEREIRA, A.G., RIEGER, D.K., SOUZA, D.O., SOUZA, T.M., PORTELA, L.V., PERRY, M.L.S. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences*; 81: 198–203, 2007.
- THORNALLE, P.J., GlyoxalaseI–structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. **Biochemical Society Transactions**; 31: 1343 – 1348, 2003.
- THORNALLEY, P.J., LANGBOR, A., MINHAS, G.H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation Of proteins by glucose. **Biochem. J.**; 344: 109±116, 1999.
- VELHO G, PETERSEN KF, PERSEGHIN G, HWANG JH, ROTHMAN DL, PUEYO ME, CLINE GW, FROGUEL P, SHULMAN GI. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. **J. Clin. Invest**; 98: 1755–1761, 1996.
- WAJCHENBERG, B.L., Cell Failure in Diabetes and Preservation by Clinical Treatment. **Endocrine Reviews**; 28(2): 187–218, 2007.
- WEIJING, C. ET AL. Oxidative Stress-Inducing Carbonyl Compounds From Common Foods: Novel Mediators of Cellular Dysfunction. **Molecular Medicine**; 8(7): 337–346, 2002.
- WEISBERG, S.P., MCCANN, D., DESAI, M., ROSENBAUM, M., LEIBEL, R.L., FERRANTE A.W.JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest**; 112: 1796–1808, 2003.
- WENDT, T.M., TANJI, N., GUO, J., KISLINGER, T.R., QU, W., LU, Y., BUCCIARELLI, L.G., RONG, L.L., MOSER, B., MARKOWITZ, G.S., STEIN, G., BIERHAUS, A., LILIENSIEK, B., ARNOLD, B., NAWROTH, P.P., STERN, D.M., D'AGATI, V.D., SCHMIDT, A.M. RAGE drives the development of glomérulo sclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Am. J. Pathol**; 162:1123–1137, 2003.
- WOLFF, S.P., Dean, R.T. Glucose autoxidation and protein modification: the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. **Biochem. J.**; 245:243–250, 1987.

WOLFF, S.P., JIANG, Z.Y., Hunt J.V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. **Free Radic. Biol. Med**; 10: 339–352, 1991.

XU, H., BARNES, G.T., YANG, Q., TAN, G., YANG, D., CHOU, C.J., SOLE, J., NICHOLS, A., ROSS, J.S., TARTAGLIA, L.A., CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest**; 112: 1821–1830, 2003.

YAN, S.F., RAMASAMY, R., SCHMIDT, A.M. Receptor for AGE (RAGE) and its ligands – cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. **J. Mol. Med**; 87: 235–247, 2009.

YU, C., CHEN, Y., CLINE, G.W., ZHANG, D., ZONG, H., WANG, Y., BERGERON, R., KIM, J.K., CUSHMAN, S.W., COONEY, G.J., ATCHESON, B., WHITE, M.F., KRAEGEN, E.W., SHULMAN, G.I. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) –associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle. **J. Biol. Chem.**; 277 (52): 50230–50236, 2002.

ZHANG, Z., APSE, K., PANG, J., STANTON, R.C. High glucose inhibits glucose-6-Phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. **J. Biol. Chem**; 275: 40042–40047, 2000.

ZIMMET, P., ALBERTI, K.G., Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**; 414: 782–7, 2001.