

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

GRAZIELA RENATA STOPPA

**AVALIAÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE DE
RATOS DIABÉTICOS SUBMETIDOS À ATIVIDADE
FÍSICA REGULAR.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GRAZIELA RENATA
STOPPA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do título de
Mestre em Biologia
Funcional e Molecular na
área de Bioquímica

Orientador. Prof. Dr. Marcio
Alberto Torsoni.
Co-Orientadora. Profa. Dra.
Satie Hatsushika Ogo

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

IDADE 30
CHAMADA T/UNICAMP
St 73a
EX
MBO BCI 51147
COC 16.83710
DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 01/10/02
CPD

CM00174634-9

'B ID 259913

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

~~ST 73a~~
ST 73a

Stoppa, Graziela Renata
Avaliação do sistema antioxidante de ratos diabéticos submetidos à
atividade física regular/Graziela Renata Stoppa.--
Campinas, SP:[s.n.], 2002

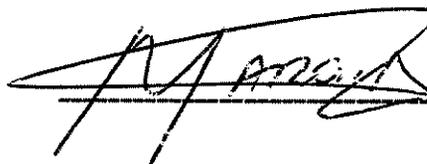
Orientador: Marcio Alberto Torsoni
Co-orientadora: Satie Hatsushika Ogo
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.Diabetes mellitus. 2.Ratos. 3.Enzimas. 4.Exercício físico.
5.Antioxidantes. I. Torsoni, Marcio Alberto. II. Ogo, Satie Hatsushika.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV.
Título.

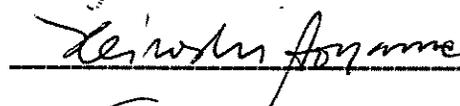
Data de defesa: 22/02/02

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama



Prof. Dr. José Mauro Granjeiro



Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

200216243

***“Semeia, semeia
O que importa é semear
pouco, muito, tudo
a semente da esperança.
Semeia tuas energias
para poderes enfrentar
as lutas da vida.
Semeia tua coragem
para poderes encorajar
os outros.
Semeia teu entusiasmo,
tua fé, teu amor.
Semeia coisas
pequeninas,
insignificantes.
Semeia e confia:
cada semente há de
enriquecer um pedaço
de chão.”***

Clarissa Pinkola Estés

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, grandes amores da minha vida, amor onde encontro forças para enfrentar todas as dificuldades.

À minha família, por acreditar em mim, por ser meu porto seguro, meu aconchego...

Aos meus amigos, cada um com seu encanto, cada um sendo fundamental em meu dia-a-dia, principalmente no que se refere a alegria e apoio (Daniela loira, Daniela morena, Renata, Italo, Guida, Fernanda, Gláucia, Silvana, Joaquim, Eleonora).

Ao Ricardo, um amigo especial, a quem devo muitos desabafos e muitos incentivos.

À Erika, pelo apoio, pela convivência, por ser uma pessoa muito especial.

À Maristela, por compartilhar comigo sonhos, realizações e como não podia faltar, também as decepções. E o melhor de tudo, sempre com muito humor. A Mãe com quem convivo mais do que com minha própria família e por tudo que representamos uma para a outra, posso dizer : obrigada de coração.

À Satie e ao Marcio pelas oportunidades, pelo incentivo, pelo aprendizado diário, enfim pela orientação que se transformou em amizade, carinho e admiração

Aos professores Dr. Hiroshi Aoyama, Dr. José Mauro Granjeiro e Dra. Nilce Correa Meirelles pela contribuição nas bancas prévia e definitiva e pelo carinho com que sempre me trataram desde os tempos de iniciação científica.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, D. Cida, Marina e Andréia pela disposição e amizade durante estes anos.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica pela amizade e colaboração.

À CAPES pelo apoio através da bolsa concedida durante o mestrado.

E finalmente a Deus, por ter tantas pessoas a agradecer.

ÍNDICE

1 – Introdução	01
1.1 - Diabetes mellitus	01
1.2 - Diabetes e Estresse Oxidativo	05
1.3 - Relação Entre Sistema Antioxidante e Diabetes	07
1.4 - Exercícios e Sistema Antioxidante	10
2 - Objetivos	12
3 - Materiais e Métodos	13
3.1 – Animais	13
3.1.1- Grupos experimentais	13
3.2 - Indução do Diabetes	14
3.3 – Treinamento	14
3.4 - Peso Corpóreo	15
3.5 - Obtenção do Sangue	15
3.6 - Preparo das Células para Dosagens Enzimáticas	15
3.7 - Determinação da Concentração de Hemoglobina	15
3.8 - Determinação da Concentração de Glicose	15
3.9 - Determinação de Hemoglobina Glicada (HbA _{1c})	15
3.10 - Determinação de Frutosamina	16
3.11 - Determinação de Glutathiona redutase (GSH)	16
3.12 - Atividade da Glutathiona Redutase (GR)	16
3.13 - Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)	17
3.14- Atividade da Catalase (CAT)	17

3.15 - Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	18
3.16 - Análise Estatística	18
4 -Resultados	19
4.1 – Concentração de Glicose e Frutosamina no Plasma e Níveis de HbA _{1c} no Sangue.	19
4.2 - Peso Corpóreo	20
4.3 - Glutathione Redutase	21
4.4 - Concentração de GSH no Eritrócito e no Sangue	22
4.5 - Glutathione Peroxidase	22
4.6 – Catalase	23
4.7 - Superóxido Dismutase	23
5 - Discussão	31
6 - Conclusão	41
7- Perspectivas	43
8 - Referência Bibliográfica	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Aminoguanidina
AGE	“Advanced glycation end product”
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamida tetracético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Favina adenina dinucleotídeo
GLUT4	Transportador de glicose
GPx	Glutaciona peroxidase
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GR	Glutaciona redutase
Grupo C	Animais controles
Grupo TR	Animais submetidos ao treinamento regular
Grupo D	Animais diabéticos
Grupo DTR	Animais diabéticos submetidos ao treinamento regular
Grupo CA	Animais controles tratados com AG
Grupo TRA	Animais submetidos ao treinamento regular e ao tratamento com AG
Grupo DA	Animais diabéticos tratados com AG
Grupo DTRA	Animais diabéticos submetidos ao treinamento regular e ao tratamento com AG
GSH	Glutaciona reduzida
HbA	Hemoglobina A
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IDDM	Diabetes mellitus dependente de insulina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT	“Nitro blue tetrazolium”
NIDM	Diabetes mellitus independente de insulina
NPSH	Grupos sulfidril não protéicos
$O_2^{\bullet -}$	Ânion superóxido
$\bullet OH$	Radical hidroxil
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
t-BOOH	Hidroperóxido de terc-butila

RESUMO

No diabetes mellitus a hiperglicemia decorrente da ausência ou da baixa secreção de insulina, ou ainda, da resistência à mesma, é responsável por inúmeros efeitos sobre a célula e seus constituintes. A glicose em particular, provoca alterações celulares decorrentes do processo de glicação não enzimática e da glicoxidação. Estes processos estão relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a formação de *advanced glycation endproduct* (AGEs), que contribuem para a modificação irreversível de proteínas, DNA e lipídios. Desta maneira, a hiperglicemia pode promover sérios danos celulares, podendo induzir precocemente morte celular. É conhecido que em resposta ao estresse oxidativo, o sistema antioxidante celular aumenta sua atividade, com o objetivo de manter o equilíbrio redox da célula, este comportamento é particularmente observado em eritrócitos e tecidos musculares de ratos submetidos à atividade física. Contudo, em condições de hiperglicemia, a glicação de proteínas pode promover a inativação de enzimas. Neste sentido, foi estudado o efeito da atividade física regular sobre o sistema antioxidante de animais diabéticos (induzido por estreptozotocina-STZ) sem um controle favorável da glicemia. A atividade da superóxido dismutase (SOD) diminuiu 64 % e a atividade das enzimas catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e a concentração de GSH no sangue de animais sádios submetidos à atividade física aumentou significativamente, 69, 63, 58 e 18 %, respectivamente. Por outro lado, nos animais diabéticos, as enzimas GPx e GR não responderam à atividade física, enquanto a CAT e o nível de GSH extracelular aumentaram e a atividade da SOD foi menor que no grupo dos diabéticos. O tratamento dos animais diabéticos com aminoguanidina (AG), um inibidor do processo de

glicação, possibilitou uma resposta positiva das enzimas antioxidantes eritrocitárias à atividade física. Analisando os resultados, é possível sugerir que a condição de hiperglicemia crônica, torna algumas enzimas incapazes de responder satisfatoriamente ao aumento do estresse oxidativo celular, possivelmente devido ao processo de glicação das enzimas. Desta maneira, a atividade física associada à hiperglicemia crônica pode provocar danos adicionais aos tecidos expostos às altas concentrações de glicose, tais como nos eritrócitos.

ABSTRACT

The hyperglycaemia due to low secretion, absence or resistance for insulin is responsible for numerous effects in diabetes mellitus. The glucose leads to the cellular alterations decurrent of nonenzymatic glycation process and glucose autoxidation. These processes are related with reactive oxygen species (EROs) production and to advanced glycation endproducts (AGEs) formation, that contribute to irreversible modifications of proteins, lipids and DNA and promote cytotoxic effects. Therefore, the hyperglycaemia can induce serious cellular damages, including cellular dead. The oxidative stress generate an increased response of antioxidant system, in order to maintain the redox balance of the cell, this behavior is particularly observed in erythrocytes and muscle tissues of rats submitted to physical activity. However, in hyperglycaemia conditions, the glycation of protein can lead to inhibition of antioxidant enzymes. This work evaluated the effect of regular physical activity on the antioxidant system of diabetic animals (induced by streptozotocin–STZ). The catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) activity and extracellular levels of glutathione (GSH) of healthy animals submitted to endurance training suffered a significant increase, 69%, 63%, 58% and 18 %, respectively. Whereas the superoxide dismutase (SOD) activity was inhibited about 64 %. On the other hand, in diabetic animals, the enzymes GPx and GR did not show any change in activity CAT activity and extracellular GSH level increased and SOD activity suffered a considerable decreasing. The treatment of diabetic animals with aminoguanidine (AG), an inhibitor of glycation process, allowed a positive response of erythrocyte antioxidant enzymes to physical activity. The results suggest that the chronic hyperglycaemia, lead to the

inactivation of some enzymes due to the glycation process. Therefore, physical activity associated to the uncontrolled or severe diabetes can promote damage to tissues exposed to high concentrations of glucose, such as erythrocytes.

1- INTRODUÇÃO

1.1- *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus é uma disfunção metabólica caracterizada por uma alta concentração de glicose no sangue e excessiva excreção urinária. Os mais importantes sintomas são sede, fome, fraqueza, podendo resultar em coma. Existem dois tipos de diabetes mellitus: tipo I e tipo II. Os pacientes tipo I (Diabetes mellitus dependentes de insulina-IDDM) são totalmente dependentes de insulina exógena, enquanto pacientes tipo II (Diabetes mellitus não dependentes de insulina-NIDDM) podem ser tratados com dietas, exercícios e medicamentos. Há uma clara separação entre os dois tipos de diabetes; em geral, os pacientes tipo I são jovens, enquanto que do tipo II acomete indivíduos mais velhos e obesos (Zimmet,1983).

Antes da introdução da insulina, a perspectiva de vida de indivíduos portadores de diabetes tipo I era extremamente baixa, com morte precoce decorrente de coma acidótico ou infecções (Rayfield et al, 1982). No entanto, com o início do tratamento dos pacientes com insulina, acreditava-se que os portadores de IDDM poderiam levar uma vida normal. Contudo, no decorrer das últimas décadas foi observado que esses pacientes eram alvos de complicações que diminuía a qualidade e o seu tempo de vida (Pell & D'Alonzo, 1971).

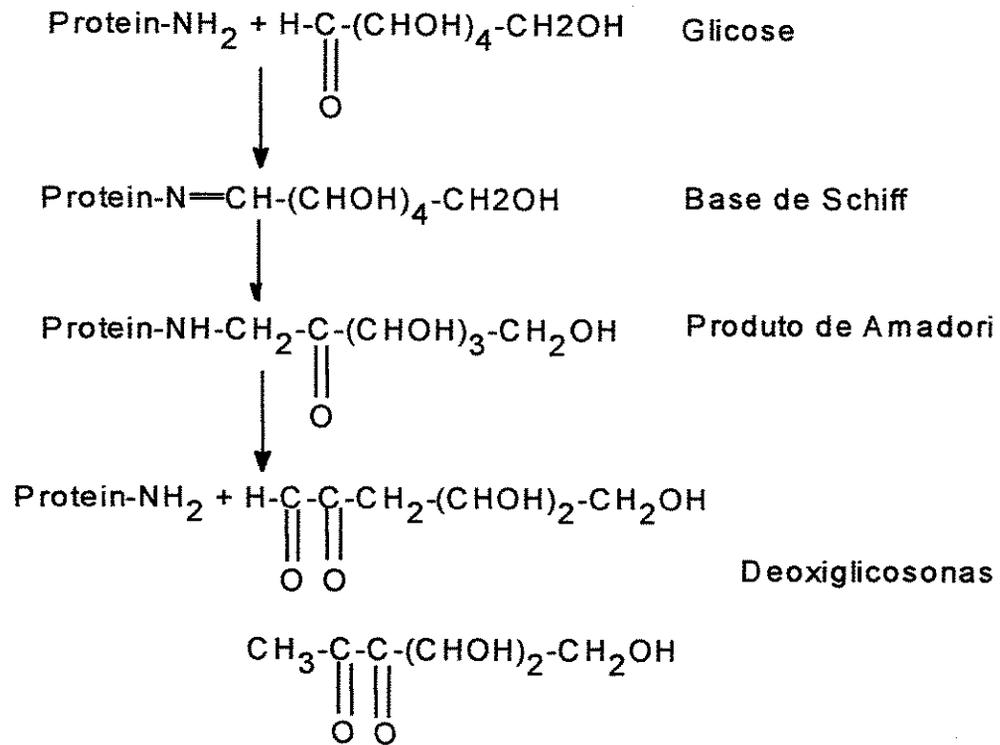
As complicações mais comuns observadas em pacientes com IDDM, afetam o sistema vascular (microangiopatia e macroangiopatia), rins, retina, nervos periféricos, cristalino, pele e contribuem para a aterosclerose. É conhecido que indivíduos diabéticos têm cerca de 25 vezes mais miopia, 20 vezes mais risco de ter falha renal, 20 vezes maior o risco de sofrer amputação

decorrente de gangrena, e de 2 a 6 vezes mais risco de sofrer de problemas cardíacos e isquemia cerebral (Klein et al, 1985).

O diabetes do tipo I tem como causa mecanismos patogênicos que levam a destruição das células β do pâncreas responsáveis pela produção de insulina. Um fator comum a todo modelo patogênico do diabetes é o aumento do componente autoimune (Charles et al, 1983). De acordo com Pozilli e colaboradores (1983) os linfócitos T têm um importante papel nessa doença, pois ocorre infiltração dessas células nas ilhotas de Langerhans e um número maior de linfócitos T estão ativados. Outros fatores, tais como, infecção viral, agentes ambientais, componentes da dieta ou predisposição genética podem estar relacionados a essa doença crônica (Charles et al, 1983; Pozilli et al, 1983).

Acreditava-se que as complicações decorrentes do diabetes eram originadas pelos mesmos processos que produziam a perda da capacidade de controlar a glicemia e o metabolismo de lipídios. Pirart (1978), no entanto, elaborou um estudo com 4400 pacientes diabéticos e estabeleceu a ligação de retinopatia, neuropatia e nefropatia, com o nível de glicose no plasma. Estas complicações foram associadas com a hiperglicemia, desde que esta era a única característica importante que diferenciava um indivíduo normal do diabético. Estudos realizados por Brownlee e colaboradores (1984), Lapolla e colaboradores (1995) e Soszmen et al. (2001) mostraram que a hiperglicemia pode causar danos por uma série de mecanismos, como o processo de glicação não enzimática, onde ocorre a ligação covalente da glicose (ou outro açúcar redutor) com os grupos amino da lisina e/ou arginina expostos na cadeia protéica. Este processo inicia-se com a formação da base de Schiff, que sofre um rearranjo formando um produto mais estável, chamado de cetoamina ou produto de Amadori (α -carbonil), o qual se degrada em 1,3- deoxiglicosonas

(Ruggiero-Lopez et al, 1999). Esquemáticamente o processo de glicação pode ser representado como segue:



O produto de Amadori sofre uma série de reações formando os chamados produtos finais de glicação avançados (AGEs), compostos associados a complicações em pacientes diabéticos (Ruggiero-Lopez, 1999). Os AGEs constituem uma classe heterogênea, com pigmentação amarelada, fluorescente, que realizam ligações cruzadas com macromoléculas, gerando intermediários reativos de O_2 . Alguns AGEs como a pentosidina N-(carboximetil) lisina pirralina têm sido identificados “*in vivo*” (Ruggiero-Lopez et al, 1999). Estudos realizados por Mitsuhashi e colaboradores (1993), Vlassara e colaboradores (1994) e Li e colaboradores (1996) sugerem a formação lenta de AGEs em indivíduos saudáveis e acelerada em diabéticos, levando ao acúmulo precoce de proteínas modificadas por AGEs nos tecidos.

Adicionalmente, a interação de AGE com receptores celulares, induz uma variedade de mudanças nos tecidos, os quais estão ligados a patologias em diabetes e no envelhecimento normal (Mitsuhashi et al, 1993; Vlassara et al, 1994; Li et al, 1996). A base de Schiff pode também gerar glioxal e metilglioxal (α -dicarbonil) que reagem com grupos amino de proteínas dando origem aos AGEs. O diabetes mellitus é caracterizado pelo aumento na produção de metilglioxal e glioxal (Wittmann, et al. 2001), mas é o glioxal o que representa a principal fonte de AGEs, correspondendo a cerca de 40 a 50% de todos os AGEs formados (Fig.1) (Roth, 1983).

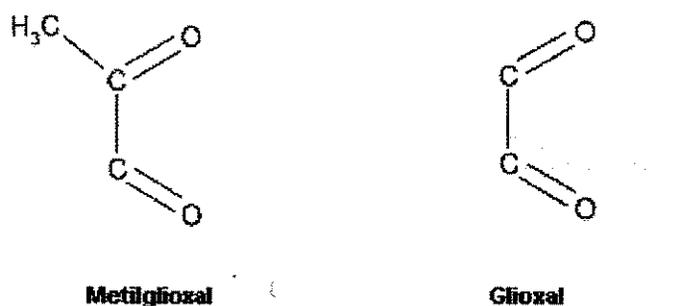


Fig. 1- Estruturas dos α -dicarbonil

Além da glicação não enzimática, a hiperglicemia também induz a ativação da via poliol, responsável pela produção de sorbitol (potente agente de glicação) que é catalisada pela enzima aldose redutase, principal enzima dessa via (Petersen et al, 1990). Tanto o sorbitol, como a aldose redutase têm sido implicados nas complicações diabéticas, como cataratogenese, retinopatia, neuropatia e nefropatia (Gabbay & Cathcart, 1974). Então, o aumento de AGE, e o acúmulo de sorbitol, processos gerados pela hiperglicemia, contribuem para um estado de estresse oxidativo.

1.2-Diabetes e Estresse Oxidativo

Atualmente existe um crescente interesse no estudo da contribuição do estresse oxidativo para desenvolvimento das complicações em diabetes mellitus (Gumieniczek et al. 2001). A origem deste estresse pode ser devido ao aumento da concentração de substâncias redutoras e/ou inclinadas a gerar peróxido de hidrogênio e radicais livres, como é o caso da glicose (Baynes, 1991 & Van Dam et al, 1995).

Como pode ser observado na Fig.2, a glicose e outros α -hidroxialdeídos são oxidados na presença de metais de transição, gerando H_2O_2 , intermediários reativos, radical hidroxil ($\cdot OH$) e cetoaldeídos (Wolff & Dean, 1987).

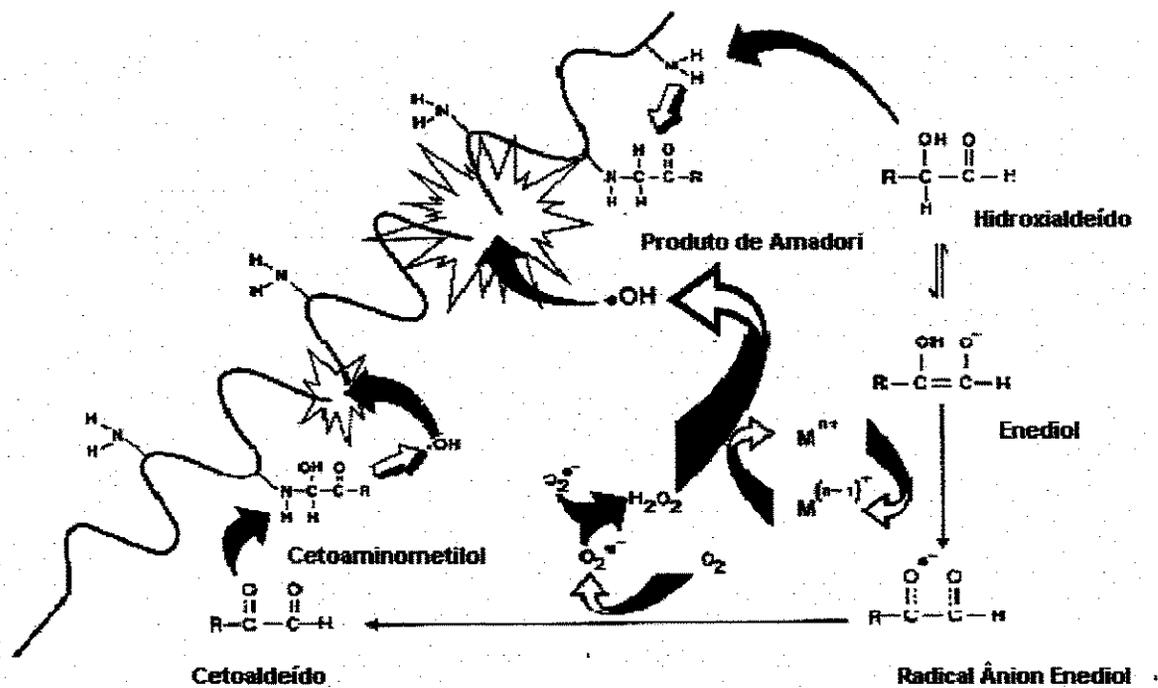


Figura 2– Oxidação da glicose na presença de metais de transição.

De acordo com Hunt & Wolff (1990) algumas complicações no quadro do diabetes mellitus devem derivar do estresse oxidativo em tecidos, catalisado pela “descompartimentalização” dos metais de transição. É conhecido que íons de metais de transição, principalmente, cobre, ferro e manganês, estão diretamente envolvidos na oxidação de várias moléculas. Neste caso, se o nível dos metais de transição for maior que dos substratos oxidáveis, como a glicose e seus produtos da glicação, os redutores biológicos (lipídios, grupos tióis e ácido ascórbico) serão oxidados, gerando um extenso estresse oxidativo (Wolff, 1993).

Os AGEs também desempenham um importante papel no estado de senescência e nas complicações diabéticas (Miyata et al. 2001). De acordo com Wolff & Dean (1987) os AGEs não somente modificam propriedades das proteínas, como também induzem danos biológicos “*in vivo*”. Por exemplo, AGEs depositados em vasos arteriais podem gerar radicais livres, capazes de oxidar os lipídios do vaso, e assim acelerar o processo de aterogênese em pacientes diabéticos hiperglicêmicos (Brownlee et al, 1984, Mullarkey et al, 1990), Os AGEs são produtos modificados, não só de proteínas, mas também de lipídios, ácidos nucleicos, que se acumulam nos tecidos vasculares e renais lentamente com a idade e mais rapidamente em diabéticos (Vlassara et al, 1994).

Para proteger os tecidos de indivíduos diabéticos, muitos esforços têm sido direcionados no sentido de reverter ou impedir os processos de glicação, desta maneira agentes inibidores desse processo têm sido utilizados (Raja et al, 1999). A aminoguanidina tem sido extensamente investigada por seu papel inibidor na formação de AGEs “*in vivo*” e “*in vitro*” (Edelstein & Brownlee, 1992; Wautier & Guillausseau, 2001). Este composto reage com aldoses e cetoses, impedindo a reação de Maillard e portanto, agindo ativamente na

minimização de complicações em pacientes diabéticos (Soulis-Liparota et al, 1991).

1.3- Relação Entre Sistema Antioxidante e Diabetes

De acordo com Halliwell & Gutteridge (1990), antioxidante é qualquer molécula que quando presente em baixas concentrações, comparada com as concentrações das substâncias oxidáveis, significativamente diminui ou inibe sua oxidação. Os mais importantes antioxidantes biológicos são vitamina C (ácido ascórbico) (Wayner et al, 1986), vitamina E (α -tocoferol) (Cheeseman et al, 1986), ácido úrico (Ames et al, 1981), glutathione peroxidase (Tappel, 1980), catalase e superóxido dismutase (SOD) (Fridovich, 1976), transferrina e ceruloplasmina (Halliwell & Gutteridge, 1986) e glutathione (GSH) (Reed,1990).

Distúrbios no equilíbrio entre processos oxidativos (gerados por uma disfunção no metabolismo, pela produção de grupos carbonil reativos e espécies reativas de oxigênio) e o sistema antioxidante em diabéticos, têm sido confirmado por inúmero relatos (Jennings & Barnett, 1988; Ji, 1995). Estes distúrbios levam a um déficit nos processos de detoxificação celular, contribuindo assim, para o aparecimento de complicações em indivíduos portadores dessa doença crônica (Jennings & Barnett, 1988).

GSH

A glutathione (L- γ -glutamyl-L-cisteinylglycine) é uma molécula bastante abundante em células de mamíferos e tem como função reverter o estresse oxidativo celular (Sies, 1999). De acordo com Reed (1990), o GSH elimina aldeídos e peróxidos, que são tóxicos ao organismo, mantêm as formas

reduzidas e assim funcionais das vitaminas C e E, sendo também coenzima da glutathione peroxidase.

O GSH sintetizado primariamente no compartimento citoplasmático celular, é utilizado fisiologicamente em outros tecidos ou pelos diferentes compartimentos da própria célula, como núcleo, matriz mitocondrial, reticulo endoplasmático e também em espaços extracelulares.

Em patologias tais como a cirrose alcoólica e infecções por vírus da imunodeficiência humana (HIV) têm sido observado baixos níveis de GSH no plasma (Sen et al, 1994; Smith et al, 1996). Em indivíduos diabéticos, mesmo aquele sem complicações, o nível de GSH nos eritrócitos é menor, provavelmente causado pelo estresse oxidativo ou pela diminuição da glutathione reductase, como foi observado *in situ* por Murakami e colaboradores (1989) e Matteucci & Giampietro (2000). De acordo com Choudhary e colaboradores (1997) houve também uma queda no nível de GSH em hepatócitos de ratos diabéticos, dados que contrariam o estudo de Grant & Duthie (1987) que detectaram um aumento de 20 % no nível de GSH hepático em ratos com diabetes.

Glutathione Redutase (GR) e Glutathione Peroxidase (GPx)

A GR é uma enzima dependente de NADPH, que catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG), formada durante a degradação do H_2O_2 pela GPx ou ainda pelo ataque de radicais livres ao GSH (Wendel, 1980).

O efeito da hiperglicemia sobre a atividade da GR é particularmente evidente quando são analisados os resultados obtidos por Blakytyn & Harding (1992). De acordo com estes autores a atividade da GR de intestino bovino, quando incubado com glicose, glicose-6-fosfato ou frutose, é menor. Em outra

condição de hiperglicemia, como no diabetes, a atividade da GR eritrocitária também está diminuída (Murakami et al, 1989).

De acordo com Atalay e colaboradores (1997) e Hagglof e colaboradores (1983) a GPx de eritrócitos de pacientes diabéticos tipo I não sofre alteração significativa em sua atividade

Catalase (CAT)

A CAT tem a mesma função da GPx e é uma enzima extensamente distribuída na natureza, encontrada em todos os microorganismos aeróbicos, plantas e células animais. Os eritrócitos de mamífero, em especial, são dotados de uma atividade extraordinariamente alta da CAT (Eaton et al, 1972). De acordo com Matkovics e colaboradores (1982) a atividade da CAT em ratos diabéticos é maior no fígado, rins e eritrócito, mas menor no baço. Nos eritrócitos de pacientes suscetíveis à estresse oxidativo, ocorre um aumento em sua atividade, como verificado nas doenças cardiovasculares, tumor, inflamação, anemia e diabetes (Al-Abrash et al, 2000). Estes resultados corroboram os achados de Terekhina e colaboradores (1998) que encontraram alta atividade da CAT nos eritrócitos de pacientes com diabetes mellitus, o que reflete um estresse oxidativo nestes indivíduos.

Superóxido dismutase (SOD)

As isoenzimas SODs estão presentes em quase todos organismos aeróbicos, e as SODs que contém cobre e zinco em suas estruturas, estão presentes em abundância nos eritrócitos, catalisando a dismutação de dois radicais ânion superóxido em uma molécula de H₂O₂ e uma molécula de O₂ (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os estudos realizados por Matkovics e colaboradores (1982) demonstraram que ratos com 2 meses de diabetes induzido por

estreptozotocina (STZ), tiveram a atividade da SOD alterada, os animais apresentaram uma menor atividade desta enzima no fígado, rins, baço, coração e eritrócitos. Crouch e colaboradores (1978) encontraram que ratos com diabetes induzida por STZ com duração de 5 dias, já apresentavam uma queda na atividade da SOD nos eritrócitos e na retina. Eritrócitos humanos contém SOD glicada e não glicada, mas a porcentagem de SOD glicada, a qual apresenta menor atividade, é maior em eritrócitos de pacientes diabéticos, se comparada com eritrócitos normais (Aray et al, 1987). De acordo com Sal'nikova & Musatova (1990 e Teice et al. (2000) alterações na atividade da SOD, observada em eritrócitos de crianças com diabetes mellitus tipo I depende da idade do paciente, da severidade da doença e do controle glicêmico. Então, a progressão de uma doença crônica (como o diabetes) pode causar alterações nos níveis de GSH e na atividade das enzimas antioxidantes de forma sistêmica. Esses distúrbios levam a um déficit nos processos de detoxificação celular, contribuindo assim, para o aparecimento de complicações em indivíduos portadores dessa doença crônica (Jennings & Barnett, 1988).

1.4-Exercícios e Sistema Antioxidante

De acordo com Ji (1995) a prática regular de exercícios físicos e esportes são benéficos à saúde, pois, diminuem a deterioração celular causada pela idade, controla o peso corporal e promove um melhor desempenho das funções cardíacas, respiratórias e muscular. Atividades físicas aeróbicas requerem energia, e para isso, ocorre aumento do consumo de oxigênio, que está diretamente associado ao estresse oxidativo. O oxigênio consumido, é usado pela mitocôndria como substrato do metabolismo e para a produção de ATP, mas uma pequena fração de O_2 (2-5%) é convertido em $O_2^{\bullet-}$ H_2O_2 , e

OH^\bullet , contribuindo assim, para os danos oxidativos (Ji, 1995). Desta maneira, em tecidos expostos cronicamente a um elevado estresse oxidativo, ocorre uma adaptação das defesas antioxidantes, especialmente da atividade enzimática (Cesquini et al, 1999; Harris, 1992; Jornot & Junot, 1992). De acordo com Jenkins (1988) e Ji e colaboradores (1992 e 1999) o exercício físico promove um aumento das defesas antioxidantes, incluindo a SOD, CAT e GPx na musculatura esquelética e no fígado (Ji et al, 1988). A prática de natação para ratos foi responsável pelo aumento na atividade da GR e da GPx nos eritrócitos e nos níveis de GSH do sangue (Cesquini et al, 1999), mas de acordo com Tidus e colaboradores (1996) este estímulo depende do tipo de exercício realizado, sua intensidade e frequência.

2.0- OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi analisar os efeitos do exercício regular de natação sobre o sistema antioxidante eritrocitário de ratos com diabetes mellitus tipo I, induzido por STZ. Neste sentido, foi investigado a atividade enzimática da GR, GPx, CAT e SOD e o nível de GSH no eritrócito e no sangue de ratos controles e ratos diabéticos submetidos ou não ao exercício regular de natação. Adicionalmente, foram analisados parâmetros bioquímicos dos mesmos animais, através das dosagens de glicose e frutossamina no plasma e HbA_{1c} no sangue, para se entender a relação do estado de hiperglicemia (gerado pelo diabetes sem controle glicêmico) e o comportamento do sistema citoprotetor. O sistema antioxidante e os níveis de glicose, frutossamina e HbA_{1c} dos grupos experimentais submetidos ao tratamento com AG, foram analisados com o objetivo de aferir o papel do processo de glicação não enzimática no diabético.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Animais Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) de variedade albina, linhagem Wistars-hannover com 75 dias de vida para o experimento. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da UNICAMP e divididos em 8 grupos (com 8 animais em cada grupo).

3.1.1- Grupos Experimentais

Grupos experimentais: Todos os animais foram mantidos no biotério em condições de fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 28 °C com água e ração fornecidos “ad libitum”.

Grupo C - animais sadios e sedentários.

Grupo TR - animais sadios submetidos, com 54 dias de vida, ao treinamento de natação (vide tabela I).

Grupo D - animais diabéticos sedentários.

Grupo DTR - animais diabéticos submetidos, com 54 dias de vida, ao treinamento de natação (vide tabela I).

Grupo CA - animais sadios sedentários tratados com aminoguanidina (AG) (0,1% em água) a partir do 21° de vida.

Grupo TRA - animais sadios submetidos, com 54 dias de vida, ao treinamento de natação (vide tabela I) e ao tratamento com AG (0,1% em água) a partir do 21° de vida.

Grupo DA - animais diabéticos sedentários tratados com AG (0,1% em água) a partir do 21° de vida.

Grupo DTRA - animais diabéticos submetidos, com 54 dias de vida, ao treinamento de natação e ao tratamento com AG (0,1% em água) a partir do 21º de vida.

3.2-Indução do diabetes Com 21 dias de vida e 18 horas de jejum, os animais receberam uma dose única de estreptozotocina (STZ) (60mg/Kg) intraperitonealmente, diluída em 0,5 ml de tampão citrato de sódio 0,01M pH 4,5. Após 3 dias o diabetes era detectado pelo nível de glicose na urina (glicosúria) através do teste Labstix.

3.3-Treinamento Os animais dos grupos TR, DTR, TRA e DTRA com 54 dias de vida foram submetidos ao treinamento de natação regular por 21 dias, com a temperatura da água em torno de 30°C. Os grupos submetidos à natação foram sacrificados 30 min após o término do treinamento (Cesquini et al. 1999).

Tabela I- Protocolo de treinamento:

Dia 1	5 min	Dia 6	15 min	Dia 11	20 min	Dia 16	25 min	Dia 21	40 min
Dia 2	5 min	Dia 7	15 min	Dia 12	20 min	Dia 17	30 min		
Dia 3	10 min	Dia 8	15 min	Dia 13	25 min	Dia 18	30 min		
Dia 4	10 min	Dia 9	20 min	Dia 14	25 min	Dia 19	30 min		
Dia 5	10 min	Dia 10	20 min	Dia 15	25 min	Dia 20	30 min		

3.4-Peso Corpóreo Os animais de todos os grupos experimentais foram pesados todas as semanas durante o tempo de duração do experimento e com 75 dias de vida (antes do sacrifício).

3.5-Obtenção do Sangue Os animais com 75 dias de vida foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 40 mg/Kg de Hypinol, e durante o efeito do anestésico, o sangue foi coletado por punção cardíaca em um tubo contendo heparina (500UI/ml) ou EDTA (0,1%).

3.6-Preparo das Células para Dosagens Enzimáticas

O sangue (com heparina) foi centrifugado por 5 min a 1,110 g para a separação do plasma, utilizado para a dosagem dos níveis de glicose. Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com NaCl 0,9% gelado.

3.7-Determinação da Concentração de Hemoglobina

A concentração de hemoglobina (Hb) no hemolisado foi determinada espectrofotometricamente, usando o reagente de Drabkin (100 mg de NaCN e 300 mg K_3FeCN_6 foram dissolvidos em 1 litro de H_2O). A solução de Hb foi diluída no reagente de Drabkin e a absorbância em 540 nm foi determinada depois de 5 min. A concentração de Hb foi calculada, usando o ϵ_{540} de 11,5 $mM^{-1} cm^{-1}$ (Winterbourn, 1990).

3.8-Determinação da Concentração de Glicose A dosagem foi realizada utilizando o Kit Glicose GOD-ANA (Labtest Diagnóstica).

3.9-Determinação de Hemoglobina Glicada (Hb_{1c}) A dosagem foi realizada utilizando o Kit (Labtest Diagnóstica) para quantificação de Hb_{1c} .

3.10-Determinação de Frutosamina A dosagem foi realizada utilizando o Kit (Labtest Diagnóstica) para quantificar frutosamina.

3.11-Determinação de GSH

A concentração de grupos sulfidril não protéicos (NPSH) foi determinada no eritrócito e no sangue total, usando ácido 5,5'-ditio-bis (2- nitrobenzóico) (DTNB). Para preparar o hemolisado foi adicionado 0,2 mL de suspensão de eritrócito em 2 mL de água destilada e 0,2 mL dessa solução (hemolisado), foi usada para determinar a concentração de Hb. Aos 2 mL do hemolisado restante foi adicionado 3 mL de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,2 g de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e 30 g de NaCl em 100 mL de água destilada). Depois de 5 min, a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada, restando NPSH no sobrenadante (extrato). A cubeta de reação continha 1,6 mL de tampão Na_2HPO_4 0,2 M/pH 8,0 e 0,2 ml de DTNB 0,5 mM (2 mg em 10 ml de citrato de sódio 1%) e 0,4 mL de extrato em um volume final de 2 mL. A absorvância foi lida em 412 nm, contra um branco que continha, 1,8 mL de tampão Na_2HPO_4 0,2 M/pH 8,0 e 0,4 mL de imitação de extrato (2 mL de água e 3 mL de solução precipitante). A concentração de NPSH foi expressa em número de SH por tetrâmero de Hb. Foi usado para o cálculo da concentração de NPSH o ϵ_{412} de $13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Beutler, 1975).

3.12-Atividade da Glutathione Redutase (GR)

A atividade desta enzima foi determinada seguindo a oxidação do NADPH espectrofotometricamente em 340 nm (ϵ_{340} de $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O hemolisado foi preparado adicionando 0,2 mL de eritrócito à 1,8 mL de solução

estabilizadora (6 mL de EDTA 0,1 M, 0,01 mL de β -mercaptoetanol 13 M e água para completar o volume de 200 mL) acertando a concentração de Hb para 70 μ M. A atividade foi determinada em uma solução contendo 0,15 mL de tampão Tris-HCl 50 mM/pH 8,0 contendo 25 mM de EDTA, 0,3 mL de FAD 9 μ M e diferentes volumes de hemolisado (0,1 e 0,15 mL) e incubada por 10 min à 37°C. Após a incubação foi adicionado 0,3 mL de GSSG 3,3 μ M à solução, e novamente uma incubação por 10 min à 37°C foi realizada, no final foi adicionado 0,15 mL de NADPH 0,1 mM. No branco não foi adicionado GSSG e NADPH, e a atividade desta enzima foi expressa em μ moles de NADPH consumido/min/g de Hb (Beutler, 1975).

3.13-Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

A atividade desta enzima foi determinada pela redução de GSSG pela glutathione redutase, utilizando NADPH. O hemolisado (70 μ M) foi preparado da mesma forma que para a glutathione redutase. A atividade foi determinada em uma solução contendo 0,3 mL de tampão Tris-HCl 50 mM/pH 8,0, 0,06 mL de GSH 2 mM e 0,3 mL de GR 1 UI/mL e diferentes volumes de hemolisado (0,05 e 0,1 mL) e incubada por 10 min à 37°C, e após seu término foi adicionado 0,05 mL de tert-BOOH 0,07 mM e 0,1 mL de NADPH 0,6 mM. No branco não foi adicionado NADPH; foi usado para calcular a atividade da enzima o ϵ_{340} de 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ (Beutler, 1975).

3.14-Atividade da Catalase (CAT)

A degradação do H₂O₂ pela CAT foi monitorada pela queda da absorbância em 230 nm. O hemolisado (70 μ M) foi preparado da mesma forma que para a glutathione redutase, em seguida, 0,2 mL desse hemolisado e 0,4 mL de etanol

foram adicionados em 19,8 mL de água, sendo a solução utilizada no experimento. Na cubeta de reação havia 0,15 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo 0,25 mM de EDTA e 2,7 mL de H₂O₂ 9 mM, que foi incubada por 10 min à 37°C, ao seu final foram adicionados diferentes volumes de hemolisado, 0,15; 0,3 ou 0,6 mL (no branco não foi adicionado hemolisado). O cálculo da atividade enzimática foi determinado, usando o ϵ_{230} de 0,071 mM⁻¹ cm⁻¹ (Beutler, 1975).

3.15-Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi baseada na redução do NBT pelo ânion superóxido, gerado pela hipoxantina/xantina oxidase à 37°C. A inibição da reação pela SOD, foi seguida espectrofotometricamente, monitorando a formação de formazan à 560 nm. Para a obtenção do extrato, foi misturado 4 mL de solução de Hb (70 µM), 1 mL de etanol e 0,6 mL de clorofórmio, a solução foi levada ao shaker por 10 min e depois centrifugada a 3000 rpm por 10 min; o sobrenadante foi utilizado como extrato.

Na cubeta de reação havia 0,03 mL de xantina oxidase 0,07 U/mL, 0,36 mL de NBT 600 µM, diferentes volumes de extrato (0,15; 0,3 ou 0,6 mL) e tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 para completar o volume de 3 mL. Somente na cubeta de reação foi adicionado 0,2 mL de hipoxantina 100 µM (Winterbourn et al, 1975).

3.16-Análise Estatística

Os dados foram analisados por one-way ANOVA com teste posterior de Bonferroni. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4-RESULTADOS

4.1-Concentração de Glicose e Frutosamina no Plasma e Níveis de HbA_{1c} no Sangue

A concentração de glicose no plasma dos animais tratados com STZ (grupo D) foi significativamente maior ($496,4 \pm 8,05$ mg/dL) em relação ao grupo C ($137,2 \pm 2,61$ mg/dL). O treinamento regular promoveu uma queda significativa na concentração de glicose no plasma dos animais do grupo TR ($115,17 \pm 1,04$ mg/dL) e nos animais do grupo DTR ($468,5 \pm 7,12$ mg/dL). O tratamento com AG (CA, TRA, DA e DTRA) não promoveu alteração na concentração de glicose no plasma em relação aos grupos não tratados (tabela II).

A concentração de frutosamina nos animais do grupo C foi de $2,27 \pm 0,49$ mmol/L, aumentando significativamente no grupo do D ($3,12 \pm 0,17$ mmol/L). O exercício de natação não alterou a concentração de frutosamina no grupo TR ($2,75 \pm 0,54$ mmol/L), mas aumentou no grupo DTR ($3,92 \pm 0,19$ mmol/L), quando comparada com os seus controles (C e D, respectivamente). A AG diminuiu a concentração de frutosamina nos grupos DA e DTRA em relação aos grupos D e DTR, respectivamente, como pode ser observado na tabela II.

Os níveis de HbA_{1c} nos animais D foram elevados ($6,15 \pm 0,20$ %) quando comparados ao C ($2,19 \pm 0,13$ %). O programa de treinamento não alterou o nível de HbA_{1c} no grupo TR ($1,98 \pm 0,1$ %), mas potencializou no grupo DTR ($7,05 \pm 0,52$ %) em relação ao grupo D. O tratamento com AG também não afetou a concentração de HbA_{1c} em nenhum dos grupos experimentais comparando com os grupos não tratados (tabela II).

Tabela II- Nível de glicose e frutossamina no plasma e HbA_{1c} no sangue dos grupos experimentais (n=8) com 75 dias de vida.

Grupo de animais	HbA_{1c} [%]	Glicose [mg/dL]	Frutossamina mmol/L
Controle	2,19 ± 0,13	137,2 ± 2,61	2,27 ± 0,49
TR	1,98 ± 0,10	115,17 ± 1,04**	2,75 ± 0,54
D	6,15 ± 0,20**	496,40 ± 8,05**	3,12 ± 0,17*
DTR	7,05 ± 0,52**	468,42 ± 7,12**	3,92 ± 0,19**
Controle (A)	2,24 ± 0,26	137,22 ± 5,9	2,33 ± 0,17
TRA	2,19 ± 0,35	115,0 ± 0,91	2,42 ± 0,49
DA	6,36 ± 0,22	495,60 ± 6,59	2,0 ± 0,13**
DTRA	7,08 ± 0,63	468,77 ± 6,67	3,0 ± 0,32*

*p < 0,05 para D x C e DTRA x DTR e **p < 0,01 para TR x C, D x C, DTR x D e DA x D.

4.2-Peso Corpóreo

O treinamento não promoveu alteração no peso nos animais sadios (C x TR). Os animais diabéticos (D) apresentaram um peso 21 % menor no final dos 75 dias de vida, quando comparado aos dos animais do grupo C. O mesmo

programa de treinamento induziu significativa queda de peso (13 %) nos animais diabéticos com 75 dias de vida (D x DTR). A AG não alterou peso dos grupos experimentais (dados não mostrados).

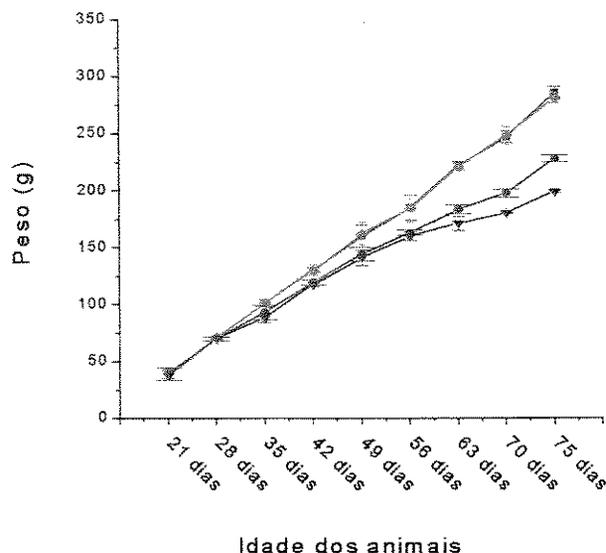


Fig. 02- Peso dos animais experimentais durante o experimento. Grupo C (■), Grupo TR (◆), Grupo D (●) e Grupo DTR (▼). Os valores representam média de 8 animais.

4.3-Glutationa Redutase

O tratamento dos animais com STZ (grupo D) não provocou alteração significativa ($2,2 \pm 0,59$ IU/g Hb) na atividade da GR, quando comparada com os animais do grupo C ($2,11 \pm 0,45$ IU/g Hb). Entretanto, o treinamento regular (TR), promoveu um aumento significativo em sua atividade ($5,10 \pm 0,26$ IU/g Hb). Os animais do grupo DTR ($2,10 \pm 0,46$ IU/g Hb), apresentaram uma atividade similar ao do grupo D (Fig. 3A). A AG não alterou a atividade da GR nos animais saudáveis (CA e TRA), mas promoveu um significativo

aumento nos animais diabéticos (DA- $3,10 \pm 0,1$ IU/g Hb e DTRA- $3,0 \pm 0,24$ IU/g Hb) em relação aos grupos D e DTR, respectivamente (Fig. 3B).

4.4-Concentração de GSH no Eritrócito e no Sangue

GSH no eritrócito: Houve uma alteração significativa na concentração de GSH entre os animais do grupo C, que continha $0,41 \pm 0,05$ GSH/ tetrâmero de Hb e os animais do grupo D que apresentaram $0,50 \pm 0,01$ GSH/tetrâmero de Hb. O treinamento realizado pelo grupo TR não alterou significativamente o nível de GSH ($0,45 \pm 0,06$ GSH/tetrâmero de Hb) em relação ao grupo C. O mesmo ocorreu com o grupo DTR ($0,47 \pm 0,06$ GSH/tetrâmero de Hb) onde a concentração de GSH foi similar em relação ao grupo D (Fig. 4A). O tratamento com AG não alterou significativamente as concentrações de GSH em nenhum dos grupos experimentais (CA- $0,43 \pm 0,06$; TRA- $0,45 \pm 0,05$, DA- $0,50 \pm 0,02$, DTRA- $0,49 \pm 0,01$ GSH/tetrâmero de Hb (Fig.4B).

GSH no Sangue: Os níveis de GSH nos grupos D e no TR foram consideravelmente maiores $0,68 \pm 0,03$ e $0,61 \pm 0,01$ GSH/tetrâmero de Hb, respectivamente, em relação ao grupo C $0,50 \pm 0,08$ GSH/tetrâmero de Hb. O treinamento para o grupo diabético (DTR) promoveu uma queda ($0,53 \pm 0,01$ GSH/tetrâmero de Hb) nos níveis de GSH (Fig. 5A). Com o tratamento de AG, a concentração de GSH nos grupos CA, TRA, DA e DTRA foram similares em relação aos grupos sem tratamento (Fig. 5B).

4.5-Glutationa Peroxidase

Os animais do grupo D não apresentaram aumento na atividade da GPx ($2,70 \pm 0,19 \times 10^2$ IU/g de Hb) em relação ao grupo C ($2,49 \pm 0,38 \times 10^2$ IU/g de Hb). Houve um considerável aumento na atividade da GPx nos

animais do grupo TR ($6,80 \pm 0,42 \times 10^2$ IU/g de Hb) quando comparado a dos animais C. Já nos diabéticos, o treinamento não aumentou a atividade enzimática ($2,80 \pm 0,19 \times 10^2$ IU/g de Hb) (DTR), como ocorreu nos animais saudáveis (Fig. 6A).

O tratamento com AG repetiu o comportamento observado na atividade da GR, os animais do grupo CA e TRA não apresentaram modificações em sua atividade, enquanto, os diabéticos tiveram um aumento considerável (DA- $4,10 \pm 0,01 \times 10^2$ IU/g de Hb e DTRA- $4,10 \pm 0,02 \times 10^2$ IU/g de Hb) em relação aos grupos D e DTR, respectivamente (Fig. 6B).

4.6-Catalase

Houve um aumento significativo da resposta da CAT no grupo D ($7,40 \pm 1,41 \times 10^4$ IU/g) em relação ao C, que apresentou uma atividade de $5,30 \pm 1,31 \times 10^4$ IU/g. O programa de treinamento no grupo TR proporcionou um aumento significativo em sua atividade ($17,40 \pm 1,13 \times 10^4$ IU/g) quando comparada ao C, o mesmo não foi observado nos animais do grupo DTR, pelo contrário, esses animais apresentaram uma queda significativa na atividade da CAT ($5,50 \pm 0,51 \times 10^4$ IU/g) em relação ao grupo D (Fig. 7A).

O valor de sua atividade no grupo CA e no TRA foram similares ao C e ao TR, respectivamente, enquanto, nos grupos DA ($8,91 \pm 1,11 \times 10^4$ IU/g) e DTRA ($8,90 \pm 1,11 \times 10^4$ IU/g) a AG promoveu o aumento da atividade da CAT (Fig. 7B).

4.7-Superóxido Dismutase

Como pode ser observado na Fig. 8A, o diabetes foi responsável por uma queda na atividade da SOD nos animais do grupo D ($47,82 \pm 6,31$ %), se

comparada a do grupo C ($71,38 \pm 5,81$ %). Uma queda ainda maior ocorreu nos animais do grupo TR ($41,8 \pm 5,70$ %), contrário do que foi observado com a GR, GPx e CAT. O exercício no animal diabético (DTR) também foi responsável por uma diminuição na resposta da SOD ($34,30 \pm 5,15$ %) quando comparada ao D. A atividade da SOD nos grupos tratados com AG não sofreu alteração em relação aos não tratados com AG. (Fig. 8B).

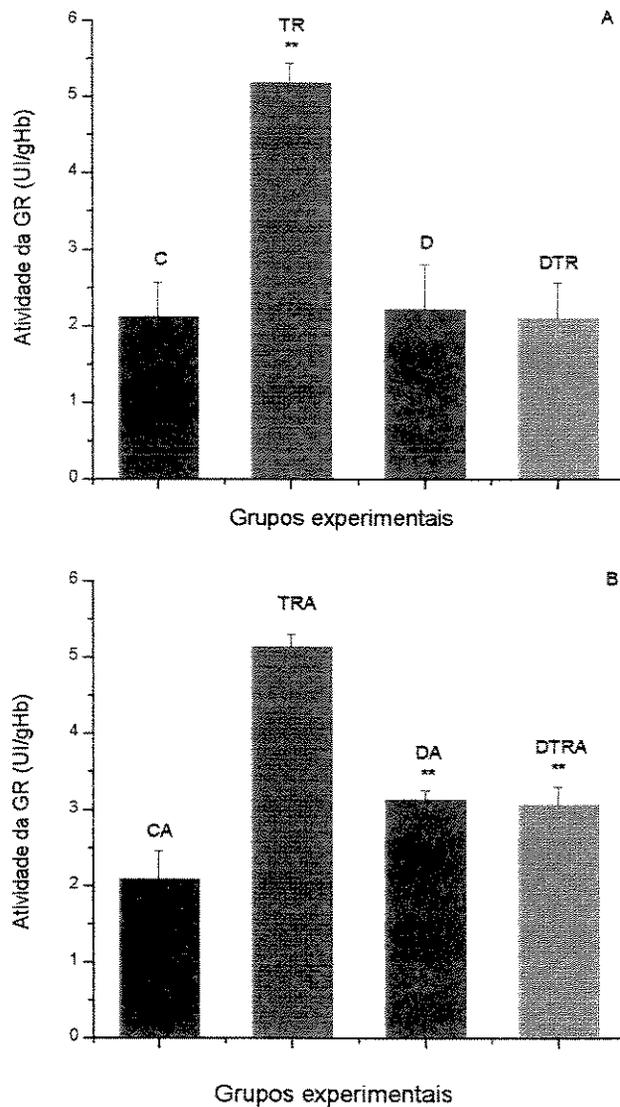


Fig. 3A- Efeito do exercício de natação na atividade da glutathione reductase eritrocitária em animais tratados ou não com aminoguanidina (AG). **(A) na ausência de AG:** a atividade da GR foi determinada como descrito na metodologia, em animais controle (C), submetidos ao treinamento regular (TR), diabéticos sedentários (D) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTR). **(B) na presença de AG:** em animais controle (CA), submetidos ao treinamento regular (TRA), diabéticos sedentários (DA) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTRA). Cada coluna representa a média de 8 indivíduos independentes. ** $p < 0,01$ para TR x C, DA x D e DTRA x DTR.

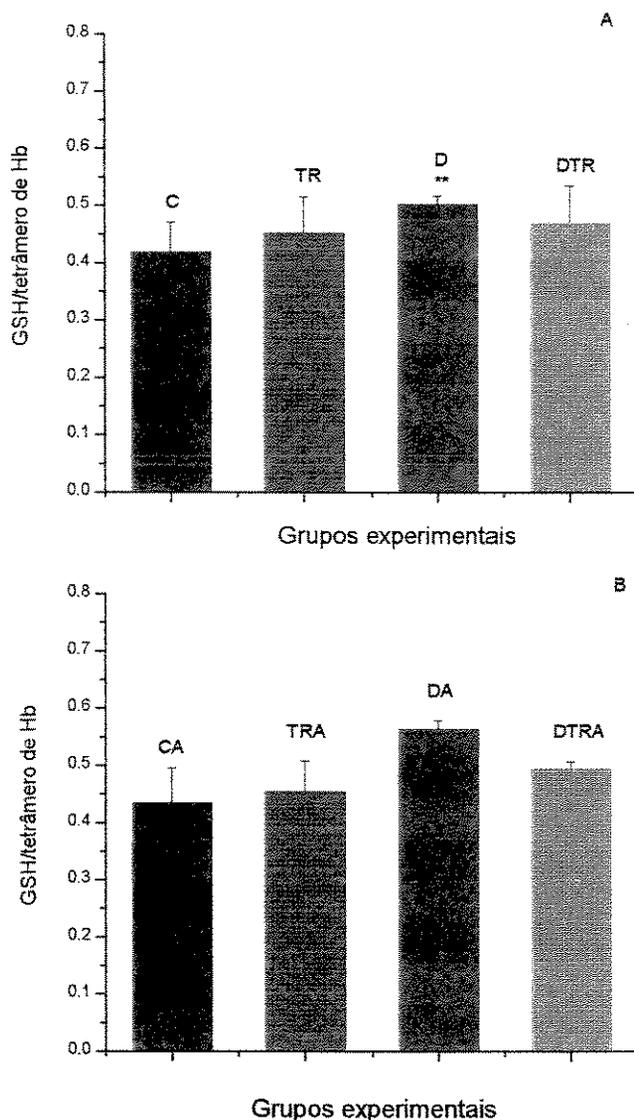


Fig. 4A- Efeito do exercício de natação no nível de glutathiona reduzida eritrocitária em animais tratados ou não com aminoguanidina (AG). **(A) na ausência de AG:** o nível de GSH foi determinado como descrito na metodologia, em animais controle (C), submetidos ao treinamento regular (TR), diabéticos sedentários (D) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTR). **(B) na presença de AG:** em animais controle (CA), submetidos ao treinamento regular (TRA), diabéticos sedentários (DA) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTRA). Cada coluna representa a média de 8 indivíduos independentes. **p < 0,01 para D x C.

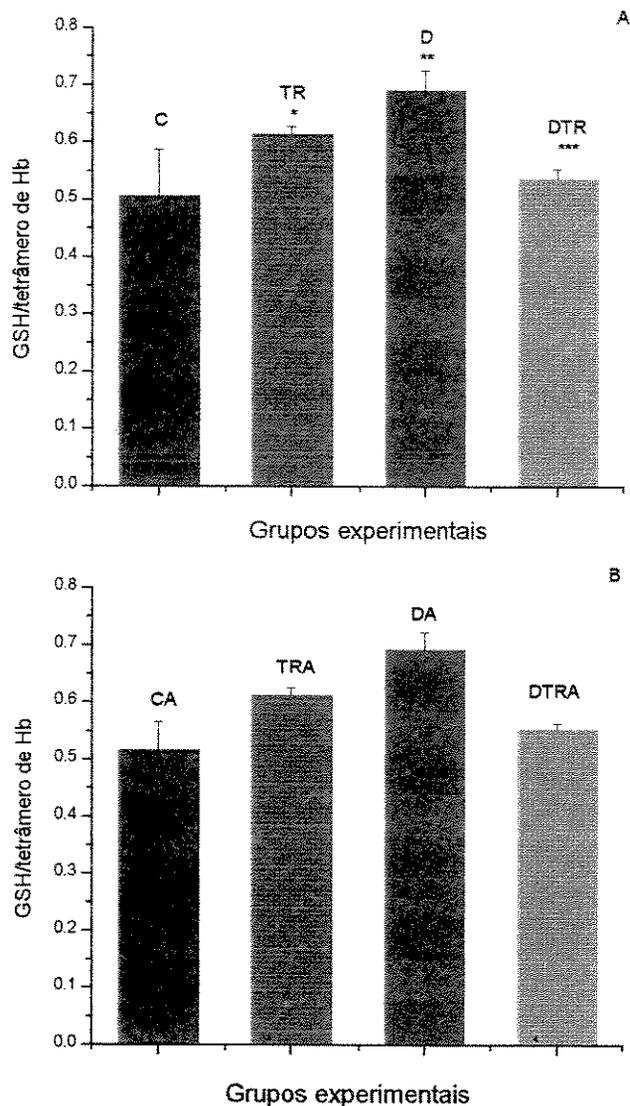


Fig. 5A- Efeito do exercício de natação no nível de glutathiona reduzida no sangue em animais tratados ou não com aminoguanidina (AG). **(A) na ausência de AG:** o nível de GSH foi determinado como descrito na metodologia, em animais controle (C), submetidos ao treinamento regular (TR), diabéticos sedentários (D) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTR). **(B) na presença de AG:** em animais controle (CA), submetidos ao treinamento regular (TRA), diabéticos sedentários (DA) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTRA). Cada coluna representa a média de 8 indivíduos independentes. * $p < 0,05$ para TR x C e ** $p < 0,01$ para DTR x D.

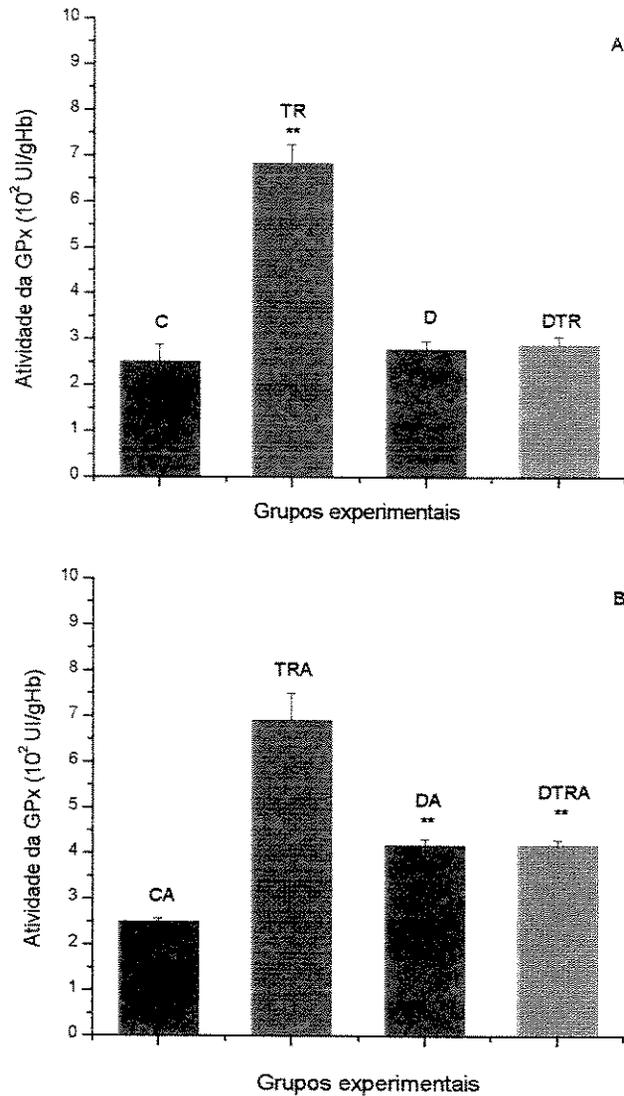


Fig. 6A- Efeito do exercício de natação na atividade da glutatona peroxidase eritrocitária em animais tratados ou não com aminoguanidina (AG). **(A) na ausência de AG:** a atividade da GPx foi determinada como descrito na metodologia, em animais controle (C), submetidos ao treinamento regular (TR), diabéticos sedentários (D) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTR). **(B) na presença de AG:** em animais controle (CA), submetidos ao treinamento regular (TRA), diabéticos sedentários (DA) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTRA). Cada coluna representa a média de 8 indivíduos independentes. ** $p < 0,01$ para TR x C, DA x D e DTRA x DTR.

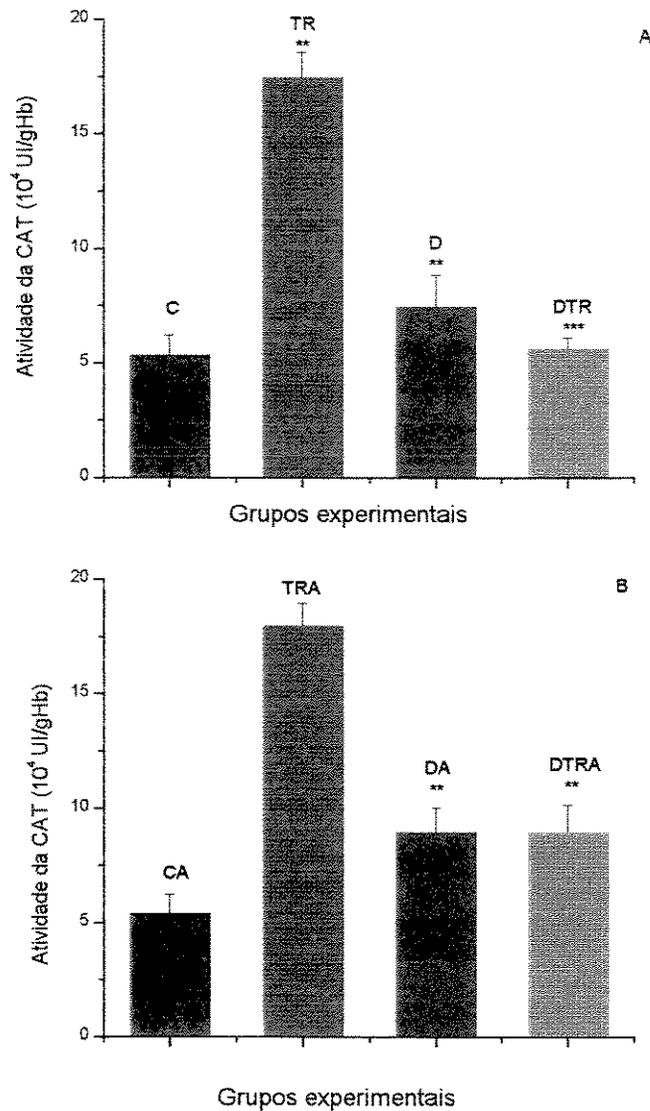


Fig. 7A- Efeito do exercício de natação na atividade da catalase eritrocitária em animais tratados ou não com aminoguanidina (AG). **(A) na ausência de AG:** a atividade da CAT foi determinada como descrito na metodologia, em animais controle (C), submetidos ao treinamento regular (TR), diabéticos sedentários (D) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTR). **(B) na presença de AG:** em animais controle (CA), submetidos ao treinamento regular (TRA), diabéticos sedentários (DA) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTRA). Cada coluna representa a média de 8 indivíduos independentes. ** $p < 0,01$ para TR x C, D x C, DTR x D, DA x D e DTRA x DTR.



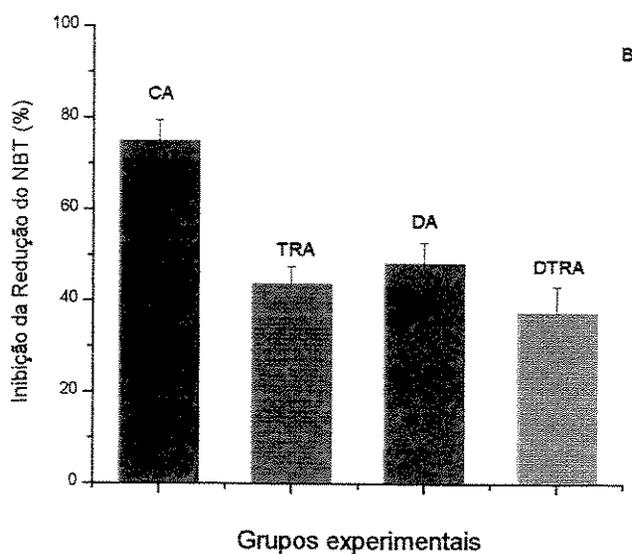
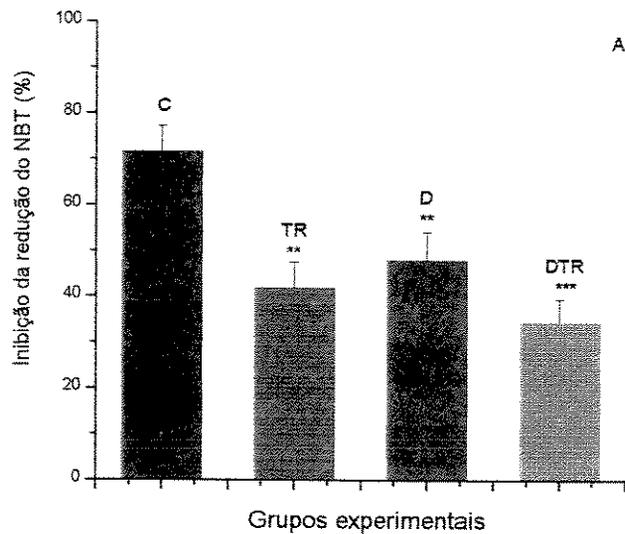


Fig. 8A- Efeito do exercício de natação na atividade da superóxido dismutase eritrocitária em animais tratados ou não com aminoguanidina (AG). **(A) na ausência de AG:** a atividade da SOD foi determinada como descrita na metodologia, em animais controle (C), submetidos ao treinamento regular (TR), diabéticos sedentários (D) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTR). **(B) na presença de AG:** em animais controle (CA), submetidos ao treinamento regular (TRA), diabéticos sedentários (DA) e diabéticos submetidos ao treinamento regular (DTRA). Cada coluna representa a média de 8 indivíduos independentes. ** $p < 0,01$ para TR x C, D x C e DTR x D.

5-DISCUSSÃO

Uma das principais características do diabetes mellitus é a alta concentração de glicose no sangue (Zimmet, 1983), como foi observado no grupo D. Desta maneira, dosagens de componentes específicos do sangue de portadores desta afecção, são utilizados como indicadores importantes do estado metabólico. Entre esses componentes, a hemoglobina glicada (HbA_{1c}) e a frutossamina (nome genérico de toda proteína glicada), refletem o controle glicêmico dos animais em dias anteriores (cerca de 30 dias antes) e nos dias atuais, respectivamente.

Desta maneira, é possível, através da dosagem destes parâmetros, inferir o estado metabólico do indivíduo. Os resultados apresentados na tabela II mostram que no modelo adotado neste estudo, o diabetes induzido por STZ foi responsável pelo aumento do nível de HbA_{1c} e frutossamina (reflexo da hiperglicemia). De acordo com Garetto e colaboradores (1984) o exercício estimula a captação de glicose circulante, promove um aumento da tolerância à glicose, além de prolongar a ação da insulina após o término do exercício. Estas alterações parecem ocorrer porque, durante a prática de exercícios físicos, há um estímulo na produção de GLUT 4, transportador de glicose na musculatura esquelética (Rodnick et al, 1990, Walberg & Holloszy, 1984) e da hexoquinase, que aumenta significativamente em resposta ao treinamento (O'Doherty et al, 1993). Neste sentido, os exercícios físicos são frequentemente recomendados aos indivíduos saudáveis e diabéticos tipo I e II, como tratamento adjunto, já que o exercício também diminui o estoque de gordura do corpo, além de favorecer o controle glicêmico (Peirce, 1999; Peltoniemi et al, 2001). Mas, o treinamento regular nos animais diabéticos (DTR) sem controle glicêmico potencializou o aumento nos níveis de

frutosamina e HbA_{1c}, o que não foi observado nos animais controles submetidos ao mesmo treinamento (TR). Estes resultados sugerem que a atividade física favorece os efeitos deletérios da hiperglicemia, resultados também encontrados por Elgawish et al. (1996) e Zhao et al. (2000), onde observaram que através do aumento da produção de EROs ocorre uma potencialização do processo de glicação não enzimática .

O programa de treinamento não alterou o peso dos animais do grupo TR, mesmo com o aumento do metabolismo de carboidratos e lipídios, utilizados como fontes de energia (Raguso et al, 1995). Por outro lado, a atividade física, para os animais diabéticos (DTR) promoveu a diminuição do peso, que é justificado pela ativação da lipólise (Hagenfeldt, 1979), comum em indivíduos diabéticos não tratados (D) (El-Khatib et al. 2001) e que é potencializada pela necessidade energética aumentada com a prática de exercícios (Wahrenberg et al, 1989).

O diabetes mellitus além de induzir alterações hormonais e metabólicas, induz a modificação não enzimática de proteínas (como foi detectado pela HbA_{1c} e pelos níveis de frutosamina) podendo ocorrer dentro e fora da célula (Fluckiger et al, 1984).

A modificação não enzimática de proteínas é considerada por muitos autores como um possível mecanismo patogênico (Rellier et al, 1997), resultado de estresse oxidativo (Harman,1992) e da glicação não enzimática (Monnier, 1990). Estas alterações têm provocado particular interesse, pois são a base de modificações moleculares que induzem disfunções típicas do processo de envelhecimento e do diabetes (Kristal, 1992). Os α -oxoaldeídos e AGEs *in vivo* são produtos de processos combinados de glicação e modificação oxidativa (Miyata et al, 1999). O acúmulo de glioxal, metilglioxal e outros α -oxoaldeídos nas células, podem modificar DNA,

levando a mutagênese e a apoptose (Vaca et al, 1994), modificar proteínas, induzindo degradação protéica, resposta imune mediada por citoquinas e inibição enzimática (Okado et al, 1996).

Neste contexto, a hiperglicemia proveniente do diabetes pode implicar na alteração do sistema antioxidante, contribuindo para os danos oxidativos. Os danos e benefícios promovidos pela prática de exercícios físicos podem ser particularmente importantes para pacientes diabéticos que, mesmo em repouso apresentam um nível maior de estresse oxidativo (Davies et al, 1982).

É conhecido que a atividade física estimula o sistema antioxidante celular durante sua prática (Cesquini et al, 1999; Ji, 1999). De acordo Jenkins (1998), ocorre um aumento de até 10 vezes na taxa metabólica aeróbica, o que acarreta elevação na concentração de EROs que por sua vez, estimula a capacidade protetora da célula para que ela possa prevenir os danos causados pelo estresse oxidativo. De acordo com Cheesman & Slater (1993) as células têm um formidável sistema de defesa, pois estão continuamente em contato com radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio.

Assim, no modelo de estudo escolhido, o efeito do exercício de natação sobre o sistema antioxidante eritrocitário de animais diabéticos foi avaliado.

Uma das principais enzimas antioxidantes deste sistema, a glutathione redutase, apresentou um aumento considerável em sua atividade quando animais controle foram submetidos ao treinamento regular (TR), mostrando que existe uma resposta adaptativa da glutathione redutase à atividade física. Este aumento na atividade da enzima, eleva a capacidade de detoxificação da célula, sugerindo uma proteção celular contra o acúmulo de GSSG devido a prática de exercícios (Ji et al, 1992). A maior atividade da GR pode também, ser uma resposta ao aumento da atividade da GPx e outras vias dependentes de GSH (Ji et al, 1992). Durante a atividade física a glicose 6-fosfato

desidrogenase (G6PD) eritrocitária também é ativada, aumentando a produção de NADPH (Spodaryk et al, 1989), favorecendo assim, a resposta da GR, que depende de NADPH (sua coenzima) para estar ativa (Kirsch & Groot, 2001). Contudo, os animais diabéticos (D) não apresentaram alteração na atividade da glutathione redutase, dado que corrobora o estudo de Stahlberg & Hietanen (1991), sugerindo que a proteína sofreu glicação não enzimática, processo que inibe o aumento em sua atividade. Este processo é particularmente evidente nos animais diabéticos que foram submetidos à atividade física (DTR). De acordo com Iberg & Fluckiger (1986), o processo de glicação de aminoácidos livres têm mostrado preferência por sequências lisil-lisina, mais do que pelo simples resíduo de lisina, como observado em albumina sérica humana. A GR tem a sequência lisil-lisina em seu sítio catalítico, o que a tornaria suscetível ao processo de glicação (Pai et al, 1988). Desta maneira, o exercício físico praticado pelos animais do grupo DTR não resultou no aumento da atividade da GR, provavelmente pelo processo de glicação da enzima.

O exercício físico em animais controle (TR) apresentou efeito semelhante sobre a enzima GPx, aumentando sua atividade, possivelmente em resposta ao aumento de H₂O₂ gerado pelo alto metabolismo aeróbico, como sugerido por Tidus e colaboradores (1996) e Wilson & Johnson (2000). Entretanto, o grupo dos animais diabéticos (D), não apresentou alteração na atividade GPx, provavelmente porque o composto 3-deoxiglicosona (produto da reação de Maillard e da via Poliol) reaja com a GPx, levando à sua inativação (Baldwin et al, 1995; Niwa & Tsukushi, 2001). No grupo DTR, a hiperglicemia também impossibilitou que a GPx respondesse ao alto nível de H₂O₂ gerado pela prática do treinamento regular, como ocorreu com a GR.

O sistema de detoxificação celular de peróxidos utiliza como redutor o GSH. Desta maneira, a alteração provocada pela hiperglicemia sobre a

atividade das enzimas GR e GPx, pode induzir alteração na concentração de GSH eritrocitária e circulante.

Neste trabalho foi determinado a concentração de GSH no eritrócito e no sangue dos diferentes grupos experimentais. O nível de GSH no eritrócito dos animais submetidos ao treinamento regular (TR) não apresentou alteração significativa, apesar de Sen e colaboradores (1994) sugerirem que exercícios moderados ou exaustivos podem potencializar o estresse oxidativo aumentando assim, a forma oxidada da GSH. Contudo, em nosso modelo o aumento de GSSG adicional sugerida por Sen et al (1994), pode ter sido reduzido pelo aumento da atividade da GR observado no grupo TR.

O diabetes favoreceu o aumento nos níveis de GSH no eritrócito, como observado nos animais do grupo D. De acordo com Bryan & Taylor (1993) tecidos expostos à estresse oxidativo de forma crônica *in vitro* aumentam a captação de GSH ou de aminoácidos precursores, o que reflete uma adaptação compensatória ao aumento do estresse oxidativo. Desta maneira, o aumento no nível de GSH no eritrócito do grupo D, parece ser resultado da importação de GSH do fígado. Esta hipótese é reforçada pela não alteração da GR neste grupo, desde que esta enzima é a responsável pela redução de GSSG à GSH. O nível de GSH eritrocitário no grupo DTR não se modificou, mesmo com o diabetes favorecendo a captação deste tripeptídeo da circulação sanguínea, isso ocorreu porque o exercício físico gera estresse oxidativo, fazendo com que o GSH disponível seja oxidado. Esta característica somada a inibição da glutathion redutase em diabéticos, levaria ao quadro observado.

Existe uma função biológica específica do GSH no espaço extracelular, que é manter o estado redox (Hwang et al, 1992). O nível de GSH foi determinado no sangue e assim foi possível observar que os grupos TR e D apresentaram aumento nas concentrações de GSH livre no plasma. Nas duas

condições (TR e D) ocorre um estímulo hepático para aumentar o “turnover” do GSH/GSSG; contudo, nestas duas condições, o principal destino do GSH no plasma parece ser diferente. Enquanto no diabetes ocorre um aumento de GSH no eritrócito, nos animais exercitados (TR), o mesmo não foi observado. Neste caso, o tecido muscular apresenta aumento no metabolismo aeróbico, levando a um maior consumo de GSH (Sen, 1999)

O aumento significativo de GSH no sangue, exibido pelos grupos TR e D, possibilitou o aumento do fornecimento do potencial redutor aos tecidos expostos ao estresse oxidativo, neste caso, gerado pelo exercício ou pelo diabetes. De acordo com a necessidade imposta pelo exercício e pelo diabetes simultaneamente, houve um aumento significativo no consumo de GSH no sangue dos animais do grupo DTR, resultado que reflete a importância de GSH no combate ao estresse oxidativo.

Para a redução de peróxidos, a célula conta ainda com a enzima CAT que está homogeneamente distribuída no citoplasma do eritrócito (Eaton et al, 1972). O papel desta enzima é fundamental em situação onde ocorre aumento na formação de H_2O_2 , tal como observado em tecidos com metabolismo aeróbico acelerado (Tidus et al, 1996; Wilson & Johnson, 2000). Neste contexto, foi possível observar um aumento na atividade da CAT em animais controles, que foram submetidos aos exercícios físicos (TR). O mesmo comportamento ocorreu com os animais diabéticos sedentários, sugerindo que o diabetes, assim como o exercício físico, estariam promovendo um aumento na concentração de H_2O_2 . É interessante salientar que o grupo diabético que foi submetido ao treinamento de natação (DTR) apresentou menor atividade que os grupos D e TR. De acordo com Ou & Wollf (1994) a CAT sofre uma inibição dose-e-tempo dependente pelo H_2O_2 . Assim, a diminuição da atividade da CAT observada no grupo DTR sugere um alto estresse oxidativo,

gerando muito H_2O_2 . Adicionalmente, o NADPH tem um importante papel na atividade da CAT, como sugerido por Kirkman & Gaetani (1984). Estes autores demonstraram a associação desta coenzima com a CAT com uma constante de dissociação muito baixa. A presença de NADPH ligado a enzima a protegeria da inativação ou ainda poderia reverter este processo (Kirkman & Gaetani, 1984). Para que isso ocorra, é necessário o fornecimento normal de NADPH pela célula. De acordo com Som e colaboradores (1981) o diabetes não provoca alteração na principal enzima regulatória da via das pentoses, a G6PD. Mas o alto estresse oxidativo encontrado no grupo DTR promove um alto consumo de NADPH por diferentes vias (GR, aldose redutase e CAT) e de acordo com Scott e colaboradores (1993) a queda na concentração de NADPH leva a danos na atividade da catalase.

A elevação da concentração de H_2O_2 no eritrócito, proveniente do aumento do metabolismo aeróbico, parece ter um papel fundamental na atividade da enzima Cu-Zn-SOD.

A atividade da Cu-Zn-SOD nos animais do grupo TR foi significativamente menor que o observado no grupo C, resultado que corrobora com os dados de Hodgson & Fridovick (1975) e Ou & Wolff (1994). De acordo com Hodgson & Fridovick (1975), altas concentrações de H_2O_2 (confirmada pelo aumento na atividade da GPx e CAT) inibem a atividade da SOD, pois de acordo com Hodgson & Fridovick (1973) o cobre ligado a histidina (que se encontra no sítio ativo da enzima) em contato com o H_2O_2 alterna entre o estado cúprico e cuproso, durante seu ciclo catalítico. Este é um processo rápido que acarreta uma lenta inativação irreversível da enzima, por destruir o resíduo de histidina (Symonyan & Nalbandyan, 1972). Adicionalmente, a inativação da Cu-Zn-SOD pode ser iniciada pela glicação (Kawamura et al, 1992, Yadav et al, 1994), o que foi observado nos animais

do grupo diabéticos sedentários (D) que apresentaram menor atividade desta enzima.

Neste estudo, também houve uma queda na atividade da Cu-Zn-SOD no grupo DTR, inativação que ocorreu pelo processo de glicação concomitantemente com o aumento na produção de H_2O_2 . Para explicarmos a menor atividade da Cu-Zn-SOD nos animais TR em relação aos diabéticos sedentários (D), sugerimos uma maior produção de H_2O_2 pelo treinamento de regular quando comparado com o diabetes, e que o H_2O_2 é mais efetivo na inativação da enzima do que o processo de glicação. No grupo DTR onde ocorre processo de glicação e alta produção de H_2O_2 simultaneamente, a inativação da SOD foi maior do que em todos os outros grupos.

Assim, foi evidenciado que o processo de glicação das enzimas do sistema antioxidante é um fator adicional nas alterações produzidas pela hiperglicemia. Este processo promove entre outros danos, um déficit no sistema antioxidante eritrocitário, contribuindo diretamente para o aumento do estresse oxidativo. É importante salientar que através dos processos citados, o exercício pode promover danos ainda maiores às células de indivíduos portadores de diabetes, desde que nestas condições o sistema antioxidante está debilitado e a prática de atividade física leva à maior necessidade de mecanismos de defesa celular contra EROs.

AMINOGUANIDINA

A AG tem sido apontada por ter atividade antioxidante, podendo assim contribuir para o efeito citoprotetor, evitando complicações no diabetes (Giardini et al, 1998). De acordo com Hirsh e colaboradores (1992) este composto pode agir como sequestrador de dicarbonil reativos ou se ligar a

aldoses e cetoses, impedindo a reação de Maillard e conseqüentemente, a formação de AGEs.

Por possuir estas características, utilizamos a AG no tratamento de animais diabéticos, e observamos seu efeito sobre o sistema antioxidante em diabéticos sedentários e diabéticos exercitados.

O peso corpóreo, a concentração de glicose sanguínea e o nível de HbA_{1c} dos animais do grupo DA e DTRA não sofreram alteração, como também foi observado por Bannai e colaboradores (1992), Degenhardt e colaboradores (1999) e Cartledge e colaboradores (2001). A manutenção do peso corpóreo e dos níveis de glicose sanguínea, são resultados esperados, já que a AG não interfere no metabolismo. Contudo, a conservação dos níveis de HbA_{1c}, deve-se provavelmente à baixa concentração de AG utilizada no tratamento, fato que impossibilitou uma ação eficiente sobre a Hb no interior do eritrócito.

Por outro lado, a AG foi responsável pela diminuição nos níveis de frutossamina nos animais do grupo DA, já que após a absorção, a AG se distribui no plasma sanguíneo, inibindo a glicação de proteínas plasmáticas, como a albumina (maior representante das frutosaminas).

A AG permitiu o aumento da atividade das enzimas GR, GPx e CAT nos grupos DA e DTRA, o que evidencia o processo de glicação como um dos principais fatores que contribuem para os resultados obtidos nos grupos que não receberam AG. Os níveis de GSH no eritrócito e no sangue dos animais tratados com AG, não sofreram alterações, pois a AG não interfere na conversão de GSSG em GSH.

A AG não teve efeito sobre a atividade da SOD, pois ela não conseguiu impedir sua inibição. Parece ser razoável acreditar que a inibição da SOD, é exercida principalmente pelo H₂O₂ que atua sobre a histidina no sitio ativo da

enzima, o tratamento com AG não alterou a atividade da enzima, por não ter efeito sobre este mecanismo.

Em conclusão, o sistema antioxidante, uma ferramenta celular fundamental contra o estresse oxidativo está comprometido pelo processo de glicação não enzimática, o que foi comprovado pelo aumento da atividade antioxidante com o tratamento com AG.

Por isso, o estado metabólico do diabético, principalmente a glicemia, tem que estar normalizada para que não ocorra danos as enzimas antioxidantes e ao GSH. Nestas condições o exercício físico poderá estimular uma resposta adaptativa das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, contribuindo para homeostase celular e para uma menor suscetibilidade oxidativa das células de portadores de diabetes.

6- CONCLUSÕES

Animais saudáveis submetidos ao treinamento de natação:

- A atividade física induziu estresse oxidativo, que foi observado pelo aumento na atividade das enzimas do sistema antioxidante do eritrócito (GR, GPx e CAT) e pelos maiores níveis de GSH no sangue destes animais em relação aos animais sedentários.
- A atividade da SOD eritrocitária foi menor quando comparada aos animais sedentários, o que sugere que durante a atividade física ocorre alta produção de H₂O₂, já que esta espécie reativa pode destruir seu sítio catalítico, levando à inativação da enzima.

Animais com diabetes mellitus:

- O diabetes sem controle glicêmico gerou estresse oxidativo, pois ocorreu um aumento nos níveis de GSH no eritrócito e no sangue dos animais do grupo D em relação ao controle, o aumento de GSH representa uma compensação ao estresse oxidativo
- O processo de glicação não enzimático (observado pelo aumento nos níveis de frutossamina e HbA_{1c} no grupo D) impediu que a GR e a GPx apresentassem aumento em suas atividades sob o estado de estresse oxidativo gerado pela hiperglicemia.
- A CAT apresentou um aumento em sua atividade em relação aos animais controle, devido a presença de NADPH ligado a sua estrutura, que impede ou reverte o processo de glicação.
- O diabetes inibiu a atividade da SOD, como também pode ser observado nos animais do grupo TR, mas a inibição gerada pela prática da natação foi maior, podendo ser reflexo de uma maior produção de H₂O₂ do que ocorre no diabetes.

Animais diabéticos submetidos ao treinamento de natação:

- No grupo DTR, o exercício potencializou o processo de glicação, detectado pelo aumento nos níveis de frutossamina e HbA_{1c} em relação ao grupo D. Como ocorre no grupo D, a glicação impediu que a GR e a GPx apresentassem uma atividade maior, em resposta ao maior estresse oxidativo, gerado pelo exercício físico e pelo diabetes, simultaneamente.
- O aumento de GSH no sangue dos animais do grupo DTR, indica que ele está sendo exportado do fígado para a corrente sanguínea, com o objetivo de fornecer potencial redutor aos tecidos expostos a EROs.
- A atividade da CAT no grupo DTR foi menor que do grupo D, sugerindo um maior consumo de NADPH pelo primeiro grupo, expondo a CAT ao processo de glicação.
- O grupo DTR apresentou a menor atividade da SOD quando comparada aos outros grupos, evidenciando a alta produção de H₂O₂ pelo mesmo.

Aminoguanidina:

- A AG demonstrou ser um potente agente inibidor do processo de glicação, pois diminuiu os níveis de frutossamina no plasma e permitiu o aumento na atividade da GR, GPx e CAT eritrocitárias nos grupos DA e DTRA.
- A AG não impediu que a SOD tivesse sua atividade inibida, o que sugere que o H₂O₂ pode ser mais efetivo na inibição enzimática do que o processo de glicação.

◆ Em teoria, extrapolando os resultados para humanos, a prática de atividade física não deve ser realizada por diabéticos que não tenham um controle glicêmico favorável, pois seu sistema antioxidante não poderá responder de maneira satisfatória e assim, se adaptar à alta produção de EROs.

7- PERSPECTIVAS

- Estudo do efeito do diabetes mellitus na expressão das enzimas SOD, CAT, GPx e GR em reticulócitos através de Rt-PCR.
- Análise da expressão das enzimas antioxidantes no hipotálamo através de Rt-PCR e imunohistoquímica.
- Realizar estudos na presença de hipoglicemiantes orais, tais como: Biguanida (Metformina), Sulfoniluréia (Glibenzamida/Glibizida) ou Tiazolidinediona (Rosiglitazona).

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ABRASH, A. S.; AL-QUOBAILI, F. A.; AL-AKAHRAS, G. N. Catalase evaluation in different human disease associated with oxidative stress. **Saudi. Med. J.**, v. 21, p 826-830, 2000.
- AMES B. N.; CATCHCART R.; SCHWIERS E.; HOCHSTEIN P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant - and radical - caused aging and cancer: a hypothesis. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 78, p. 6858-6862, 1981.
- ARAY K.; MAGUCHI S.; FUNJU S.; ISHIBASHI H.; OIKAWA K.; TANIGUCHI N. Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycated sites. **J. Biol. Chem.**, v.265, p.16969-16972, 1987.
- ATALAY M.; LAAKSONEN D. E.; NISKANEN L.; UUSITUPA M.; HANNINEN O.; SEN C. K. Altered antioxidants enzymes defenses in insulin-dependent diabetic men with increased and exercise-induced oxidative stress. **Acta Physiol. Scand.**, v.161, p 195-201, 1997.
- BALDWIN J. S.; LEE L.; LEE L.; LEUNG T. K.; MURUGANANDAM A., MUTUS B. Identification of the site of non-enzymatic glycation peroxidase: rationalization of the glycation-related catalytic alterations on the basis of three-dimensional protein structure. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1247, p. 60-64, 1995.
- BANNAL, C.; YAMAZAKI, M.; MATSUSHIMA, Y., KUNIKA, K.; ITAKURA, M.; OKUDA, Y.; YAMASHITA, K. Amalioration of dermal lesions in streptozotocin-induced diabetic rats by aminoguanidine. **Diabetes Res.**, p.20: 87-95; 1992
- BAYNES, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in Diabetes. **Diabetes.**, v. 40, p. 405-411, 1991.
- BAYNES, J. W. & THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes.**, v. 48, p. 1-9, 1999.

- BAYNES, J. W. Reactive oxygen in the aetiology and complications of diabetes. In **Drugs, Diet and Disease: Mechanistic Approaches to Diabetes**. Pergamon Press, 1996. v. 2, p. 203-240.
- BEUTLER, E. Red cell metabolism. In: **A Manual of Biochemical Methods**. Academic Press, 1975. v. 5, p. 395-406.
- BLAKYTRY R. & HARDING, J. J. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. **Biochem. J.**, v. 288, p. 303-307, 1992.
- BRAY, T. M. & TAYLOR, C. G. Tissue glutathione, nutrition and stress oxidative. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 71, p. 746-751, 1993.
- BROWNLEE, M., VLASSARA,., CERAMI, A. Nonenzymatic glycosilation and the pathogenesis of diabetic complications. **Ann. Int. Med.**, v. 101, p. 527-53, 1984.
- CESQUINI, M; TORSONI, M. A.; OGO, S. H. Adaptive response to swimming exercise: Antioxidant systems and Lipid Peroxidation. **J. Anti-Aging Med.**, v. 2, p. 357-363, 1999.
- CARTLEDGE, J, J., EARDLEY, I., MORRISON, J. F. Advanced glycation end-products are responsible for the impairment of corpus cavernosal smooth muscle relaxation seen in diabetes. **BJU Int.** , v. 87, p. 402-407, 2001.
- CHARLES, M. A.; SUZUKI, M.; WALDEK. N.; DODSON, L. E.; SLATER, L.; ONG, K.; KERSHNER, A.;BUCKINGHAM, B.; GOLDEN, M. Immune islet killing mechanisms with insulin-dependent diabetes: in vitro expression of cellular and antibody-mediated islet cell cytotoxicity in humans. **J. Immunol.**, v.130, p. 1189-1193, 1983.
- CHEESEMAN, K. H. & SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **Br. Med. Bull.**, v. 49, p. 481-493, 1993.
- CHOUDHARY, D.; CHANDRA, D.; KATE, R. K. Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. **Toxicol. Lett.**, v .93, p. 141-52, 1997.

- CROUCH R.; KINSEY, G.; PRIEST, D. G.; SARDA, A.; BUSE, M. G.
Effect of streptozotocin on erythrocyte and retina superoxide dismutase.
Diabetologia., v. 15, p.53-57, 1978.
- DAVIES, K. J. A.; QUINTANILHA, G. T.; BROOKS G. A. & PACKER, L.
Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 107, p. 1198-1205, 1982.
- DEGENHARDT, T. P.; FU, M. X.; VOSS, E.; REIFF, K.; NEIDLEIN, R.;
STREIN, K.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W.; REITER, R.
Aminoguanidine inhibits albuminuria, but not the formation of advanced
glycation end-products in skin collagen of diabetic rats. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 43 , p. 81-90, 1999.
- EATON, J. W.; BORAAS, M.; ETKIN, N. L. Catalase activity and red cell
metabolism. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 28, p. 121-131, 1972.
- EDELSTEIN. D. & BROWNLEE M. Aminoguanidine ameliorates
albuminuria in diabetic hypertensive rats. **Diabetologia.**, v. 35, p. 96-97,
1992.
- ELGAWISH, A.; GLOMB, M.; FRIEDLANDER, M.; MONNIER, V. M.
Involvement of hydrogen peroxide in collagen cross-linking by glucose in
vitro and in vivo. **J. Biol. Chem**, v.271, p. 12964-12971, 1996.
- EL-KHATIB, A. S.; MOUSTAFA, A. M.; ABDEL-AZIZ, A.A.; AL-
SHABANAH, O. A.; EL-KASHEF, H. A. Effects of aminoguanidine and
desferrioxamine on some vascular and biochemical changes associated
with streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. **Pharmacol. Res.** , v.
43, p. 233-240, 2001.
- FLUCKIGER, P. M.; GALLOP, J. W.; BAYNES, S. R.; THORPE, M. A.;
MURTIASHOW, J. L. Nonenzymatic modifications, In : **Methods in
Enzymology Posttranslational Modification**. Academic Press, 1984. v.
106, p. 77-115.
- FRIDOVICH I. Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism.
Adv. Exp. Med. Biol, v. 74, p. 530-539, 1976.

- GABBAY, K. H. & CATHCART, E. S. Purification and immunologic identification of aldose reductases. **Diabetes.**, v. 23, p. 460-468, 1974
- GARETTO, L. P.; RITCHER, E. A.; GOODMAN, M. N. & RUDERMAN, N. B. Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: the two phases. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. E471- E475, 1984.
- GIARDINI, I.; FARD, A. K.; HATCHELL, D. L.; BROWNLEE M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. **Diabetes.**, v. 47, p. 1114-1120, 1998.
- GRANT, M. H. & DUTHIE, S. J. Conjugation reactions in hepatocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 3647-3655, 1987.
- GUMIENICZEK, A.; WOJTOWICZ, Z.; NIERADKO, M. Differences in antioxidant status in skeletal muscle in experimental diabetes. **Clin. Chim. Acta.**, v. 31, p. 39-45, 2001.
- HAGENFELDT, L. Metabolism of free fatty acids and ketone bodies during exercise in normal and diabetic men . **Diabetes.**, v. 28, p. 66-70, 1979.
- HAGGLOF, B., MARKLUND, S. L., HOLMGREN, G. Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocyte in insulin-dependent diabetic children. **Acta Endocrinol.**, v. 102, p. 235-239, 1983.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. The antioxidant of human extracellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 280, p. 1-8, 1990.
- HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB J.**, v. 6, p. 2675-2683, 1992.
- HARMAN, D. Theory of aging. **Mutat. Res. Free Radical.**, v. 275, p. 257-266, 1992.

- HIRSH, J., PETRAKOVA, E., FEATHER, M. S. The reaction of some dicarbonyl sugars. **Carbohydr. Res. Free Radical.**, v. 232, p. 125-130, 1992.
- HODGSON, E. K. & FRIDOVICH, I. Reversal of the superoxide dismutase reaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 54, p. 270-279, 1973.
- HODGSON W. K. & FRIDOVICH I. The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide chemiluminescence and peroxidation. **Biochemistry.**, 14, p. 5299-5303, 1975.
- HUNT, J. V & WOLFF, S. P. Is glucose the sole source of tissue browning in diabetes mellitus?. **FEBS Lett.**, v. 269, p. 258-260, 1990
- HWANG, C., SINSKEY, A. J., LODISH, H. F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. **Science.**, v. 257, p. 1496-1502, 1992.
- IBERG, N. & FLUCKIGER R. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 13542-13545, 1986.
- JENKINS, R.R. Free radical chemistry. Relationship to exercise. **Sports Med.**, v. 5, p. 156-170, 1988.
- JENNINGS, P. E. & BARNETT, A. H. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. **Diabet. Med.**, v. 52, p. 111-117, 1988.
- JL, L. L.; STRATMAN F.; LARDY, H. Antioxidant enzyme system in rat liver and skeletal muscle: influences of selenium deficiency chronic training, and acute exercise. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 263, p. 150-160, 1988.
- JL, L.L.; FU, R.; MITCHELL, E. T. Glutathione antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. **J. Appl. Physiol.**, v. 73, p. 1854-1859, 1992
- JL, L. L. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 1079-1086, 1995.

- Jl, L. L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 222, p. 283-292, 1999.
- JORNOT, L. & JUNOT, A. F. Response of human endothelial cell antioxidant enzymes to hyperoxia. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 6, p. 107-115, 1992.
- KAWAMURA, N.; OOKAWARA, T., SUZUKI, K. J. Increased glycated Cu, Zn-SOD levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 74, p. 1352-1354, 1992.
- KIRKMAN, H. N. & GAETANI, G. F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 81, p. 4343-4347, 1984.
- KIRSCH, M & DE GROOT, H. NAD(P)H, a directly operating antioxidant? **FASEB. J.**, v. 15, p. 1569-1574, 2001.
- KLEIN, R.; KLEIN, E. K.; MOSS, S. E.; DAVIS, M. D.; DEMETS, D. L. Retinopathy in young-onset diabetic patients. **Diabetes Care.**, v. 8, p. 311-315, 1985.
- KRISTAL, B. S. & YU, B. P. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. **J. Gerontol.**, v. 47, p. B107-B114, 1992.
- LAPOLLA, A; FEDELE, D; SERAGLIA, R; CATINELLA, S; BALDO, L; ARONICA, R; TRALDI R. A new effective method for the evaluation of glycated intact plasma proteins in diabetic subjects. **Diabetologia.**, v. 38, p. 1076-1081, 1995.
- LI, Y. M.; STEFFES, M.; DONNELLY, T.; LIU, C.; FUH, H.; BASGEN, J.; BUCALA, R.; VLASSARA, H. Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 93, p. 3902-2907, 1996.
- MATKOVICS, B.; VARGA, S. I.; SZABO, L.; WITAS, H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. **Horm. Metab. Res.**, v. 14, p. 77-79, 1982.

- MATTEUCCI, E. & GIAMPIETRO, O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. **Diabetes Care.**, v. 23, p. 1182-1186, 2000.
- MIYATA, T., IZUHARA, Y., SAKAI, H., KUROKAWA, K. Carbonyl stress: increased carbonyl modification of tissue and cellular proteins in uremia. **Perit. Dial. Int.**, v. 2, p. S:58-60, 1999.
- MYATA, T.; VAN YPERSELE DE STRIHO, C.; IMASAWA, T.; YOSHINI, A., UEDA, Y.; OGURA, H.; KOMINAMI, K.; ONOGI, H., INAGI, R., NANGAKU, M., KUROKAWA, K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. **Kidney Int.**, v. 60, p. 2351-2359, 2001.
- MITSUHASHI, T.; NAKAYAMA, H.; ITOH, T.; KUWAJIMA, S.; ATSUMIT, T.; KOIKE, T. Immunochemical detection of advanced glycation and products in renal cortex from STZ-induced diabetic rat. **Diabetes.**, v. 42, p. 826-832, 1993.
- MONNIER, V. M. J. Nonenzymatic glycosylation, the Maillard and the aging process. **Gerontol.**, v. 45, p. B105-B111, 1990.
- MULLARKEY, C. J.; EDELSTEIN D. ; BROWNLEE M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 173, p. 932-939, 1990.
- MURAKAMI, K., KONDO, T., OHTSUKA, Y., FUJIWARA, Y., SHIMADA, M., KAWAKAMI, Y. Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients diabetes mellitus. **Metabolism.**, v.38, p. 753-758, 1989.
- NIWA, T. & TSUKUSHI, S. 3-deoxyglucose and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucose. **Kidney Int. Suppl.**, v. 78, p. S37-S41, 2001.
- O'DOHERTY R. M.; BRACY, D. P.; OSAWA, H.; WASSERMAN, D. H.; GRANNER, K. Rat skeletal muscle hexokinase II mRNA and activity are increased by a single bout of acute exercise. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. E1781-E178, 1993.

- OKADO, A.; KAWASAKI, Y.; TAKAHASHI, M.; TESHIMA, T.; FUJU, J.; TANIGUCCHI, N. Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucose in macrophage-derived cell lines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.225 , p. 219-224, 1996.
- OU P. & WOLFF S. P. Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in the presence of aminotriazole role of transition metals and relevance to diabetes. **Biochem. J.**, v. 1, p. 303-307, 1994.
- PELL, S. & D'ALONZO, C. Factors associated with long term survival of diabetes. **JAMA.**, v. 214, p. 1833-1840, 1971.
- PAI, E. F., KARPLUS, P. A., SCHULZ, G. E. Crystallographic analysis of the binding of NADPH, NADPH fragments, and NADPH analogues to GR. **Biochemistry.**, v.27, p. 4465-4474, 1988.
- PELTONIEMI, P.; YKI-JARVINEN, H.; OIHONEN, V.; OKSANE, A.; TAKALA, T. O.; RONNEMMA, T.; ERKINJUNTTI, M.; KNUUTI, M. J.; NUUTILA, P. Resistance to exercise-induced increase in glucose uptake during hyperinsulinemia in insulin-resistant skeletal muscle of patients with type 1 diabetes. **Diabetes.**, v. 50, p. 1371-1377, 2001.
- PEIRCE, N. S. Diabetes and exercises. **Br. J. Sports Med.**, v.33, p. 161-172, 1999.
- PETERSEN, A.; SZWERGOLD, S. S.; KAPPLER, F.; WEINGARTEN M.; BROWNLEE T. R. Identification of sorbitol 3-phosphate and fructose 3-phosphate in normal and diabetic human erythrocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 15. p. 17424-17427, 1990.
- PIRART, J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. **Diabetes Care.**, v. 168-188, p. 252-263, 1978.
- POZILLI, P.; ZUCCARINI, O.; IAVICOLI, M.; SENSI, M.; SPENCER, K. M.; BEVERELEY, J. L.; KYNER, J. L.; CUDWORTH, A. G. Monoclonal antibodies defined abnormalities of T-lymphocytes in type I (insulin-dependent) diabetes. **Diabetes.**, v. 32, p. 91-94, 1983.

- RAGUSO, C. A.; COGGAN A. R.; GASTALDELLI A.; SIDOSSIS, L. S.; BAYYR, E. J. WOLH, R.R. Lipid and carbohydrate metabolism in IDDM during moderate and intensive exercise. **Diabetes.**, v. 44, p. 1066-1074, 1995.
- RAJA, G. K., BAYNES, J. W., HUDSON, B.G. Amadorins: Novel post-amadori inhibitors of advanced glycation reactions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 257, p. 251-258, 1999.
- RAYFIELD, E. J.; AULT, M. J.; KEUSH, G. T.; BROTHERS, M. J.; NEOCHEMIAS, C.; SMITH, H. Infection and diabetes: the case for glucose control. **Am. J. Med.**, v.72, p. 439-450, 1982.
- RELLIER, N., RUGGIERO, D., LECOMTE, M., LAGARDE, M., WIERNSPERGER, N. Advanced glycation end products induce specific glycoprotein alterations in retinal microvascular cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 281-285, 1997.
- REED, D. J. Glutathione: Toxicology implications. **Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 603- 631, 1990
- RITCHTER, E. A.; PLOUG T.; GALBO H. Increased muscle glucose uptake after exercise. No need for insulin during exercise. **Diabetes.**, v. 34, p. 862-865, 1985.
- RODNICK, K. J.; HOLLOSZY, J. O.; MONDON, C. E.; JAMES, D. E. Effects of exercise training on insulin-regulatable glucose-transporter protein levels in rat skeletal muscle. **Diabetes.**, v. 39, p. 1425-1429, 1990.
- ROTH, D. M.; REIBIL, D. K.; LEFER, A. M. Vascular responsiveness and eicosanoid production in diabetic rats. **Diabetologia.**, v .24, p. 372-376, 1983.
- RUGGIERO-LOPEZ, D., LECOMTE, M., MOINET, G., PATEREAU, G., LAGARDE, M., WIEMSPERGER, N. Reactions of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implications of advanced glycation end product formation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 58, p. 1765-1773, 1999.

- SAL'NIKOVA, L. A. & MUSATOVA, N. V. Activity of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in erythrocytes of children with diabetes mellitus. **Vopr. Med. Khim.**, v. 36, p. 39-41, 1990.
- SCOOT, M. D.; WAGNER, T. C.; CHIU, D, T. Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 118, p.163-168, 1993
- SEN, C. K.; ATALAY, M.; HANNINEN, O. Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. **J. Appl. Physiol.**, v. 77, p. 2177-2187, 1994.
- SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 916-921, 1999.
- SMITH, C. V.; JONES, D. P.; GUENTHNER, T. M.; LASH, L. H.; LAUTERBURG, B. H. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 140, p. 1-12, 1996.
- SOM, S.; BASU, S.; MUKHERJEE, D.; DEB, S.; CHOUDHURY, P. R.; MUKHERJEE, S.; CHATTERJEE, S. N.; CHATTERJEE, I. B. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. **Metabolism.**, v. 30, p. 572-577, 1981.
- SOULIS-LIPAROTA, T; COOPER, M. E.; PAPAZOGLO, D.; CLARKE, B.; JERUMUS, G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in STZ-Induced diabetic rat. **Diabetes.**, v. 40, p. 1328-1334, 1991.
- SOZMEN, E. Y.; SOZMEN, B.; DELE, N.; ONAT, T. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate pour glycemic control. **Arch. Med. Res.**, v. 32, p. 283-287, 2001.
- SPODARYK, K., MISZTA, H., DABROWSKI, G., GAWRONSKI, W. Metabolism of red blood cells after short-term exercise in rats. **Acta Physiol. Pol.**, v. 40, p. 381-386, 1989

- STAHLBERG, M. R. & HIETANEN, E. Glutathione and glutathione-metabolizing enzymes in the erythrocytes of health children and children with insulin-dependent diabetes mellitus, juvenile rheumatoid arthritis, coliac disease and acute lymphoblastic leukaemia. **Scand. Clin. Lab. Invest.**, v. 51, p.125-130, 1991.
- SYMONYAN, M. A. & NALBANDYAN, R. M. Interaction of H₂O₂ with superoxide dismutase from erythrocyte. **FEBS Lett.**, v. 28, p. 22-29, 1972.
- TAPPEL, A. L. Vitamin E and selenium protection from in vivo lipid peroxidation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 355, p. 18-31, 1980.
- TELCI, A.; CAKATAY, U.; SALMAN, S.; SATMAN, I., SIVAS, A. Oxidative protein damage in early stage type 1 diabetic patients. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 50, p. 213-223, 2000.
- TEREKHINA, N. A., KHOROBRYKH, O.I., KHOROBRYKH, T. P. Antioxidant enzyme activity in the erythrocytes of rats with alloxan diabetes. **Patol. Fiziol. Eksp. Ter.**, v. 4, p. 25-26, 1998.
- TIDUS, P. M.; PUSHKARENKO, J.; HOUSTON, M. E. Lack of antioxidant to short-term aerobic training in human muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 271, R832-836, 1996.
- THORNALLEY, P. J. Glutathione-dependent detoxification of alpha-oxoaldehydes by glyoxalase system: involvement in disease mechanisms and anti-proliferative activity of glyoxalase I inhibitors. **Chem. Biol. Interact.**, v. 24, 137-151, 1998.
- VACA, C. E.; FANG, J. L.; CONRADI, M.; HOU S. M. Development of a P-postlabelling technique for the analysis of 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA of methylglyoxal. **Carcinogenesis.**, v. 15, p. 1887-1894, 1994.
- VAN DAM, P. S.; VAN ASBECK, B. S.; ERKELENS, D. W.; MAX, J. J.; GISPEN, W. H.; BRAVENBOER, B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 1, p.1181-192, 1995.

- VLISSARA, H.; STRIKER, L. J.; TEICHBERG, S.; FUH, H.; LI, Y. M.; STEFFES, M. Advanced glycation endproducts induce glomerular sclerosis and albuminuria in noemal rats. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. 91, p. 11704-11708, 1994.
- YADAV, P., SARKAR, S., BHATNAGAR, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocyte and tissues in aged diabetic rats. **Indian. J. Exp. Biol.**, v. 35, p. 389-392, 1997.
- WAHRENBERG, H.; LONNQVIST, F.; ENGLELDT, P.; AMER, P. Abnormal action of catecholamines on lipolysis in adipocytes of type I diabetic patients treated with insulin. **Diabetes.**, v. 38, p. 524-533, 1989.
- WALLBERG-HENRIKSSON, H. & HOLLOSZY, J. O. Contractile activity increases glucose uptake by muscle in severely diabetic rats. **J. Appl. Physiol.**, v. 57, p. 1045-1049, 1984.
- WAYNER, D. D., BURTON, G.W., INGOLD, K. U. The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 884, p. 119-123, 1986.
- WAUTIER, J. L. & GUILLASSEAU, P. J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diabetes Metab.**, v. 27, p. 535-542, 2001.
- WENDEL, A. & CIKRYT, P. The level and half-life of glutathione in human plasma. **FEBS. Lett.**, v. 120, p. 209-211, 1980.
- WILSON, D. O. & JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme expression in rat myocardium and liver. **J. Appl. Physiol.**, v. 88. p. 1791-1796, 2000.
- WINTERBOURN, C. C.; HAWKINS, R. E.; BRIAN. M.; CARREL, R. W. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 85, p. 337-341, 1975.
- WINTERBOURN, C. C. Oxidative reactions of hemoglobin. **Meth. Enzymol.**, v. 186, p. 265-272, 1990.

- WITTMANN, I.; MAZAK, I, POTO, L.; WAGNER, L.; VAS, T.; KAVACS, T.; BELAGYI, J.; NAGY, J. Role of iron in the interation of red bloos cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling. **Chem. Biol. Interact.**, v. 28, p. 171-187, 2001.
- WOLFF, S. P. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. **Br. Med. Bull.**, v. 49, p. 642-652, 1993.
- WOLLF, S. P. & DEAN, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. **Biochem. J.**, v. 245, p. 243-250, 1987.
- ZHAO, W.; DEVAMANOCHARAN, P. S.; VARMAN, S. D. Fructose induced deactivation of antioxidant enzymes: prevent effect of pyruvate. **Free Radic. Res.**, v. 33, p. 23-30, 2000.
- ZIMMET, P. The global epidemiology of diabetes mellitus. **J. Exp. Med.**,v.141,p.541-554,1983.

