UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa em Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

ADRIANO SARTORI

Toxicidade de Aminoacetona a Células Produtoras de
Insulina

São Paulo

Data do Depósito na CPG

20/01/2010

ADRIANO SARTORI

**Toxicidade de Aminoacetona a Células Produtoras de
Insulina**

*Tese apresentada ao Instituto
de Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Bioquímica).*

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

São Paulo
2010

Adriano Sartori

Toxicidade de Aminoacetona a Células Produtoras de Insulina

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedico esta tese aos meus pais Walter Sartori e Yvonne Bronzeri Sartori e ao meu irmão Fábio Sartori. Pelo apoio incondicional, pois sem eles nada disto seria possível.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Dr. Etelvino Bechara pelo apoio, companheirismo, paciência e discussões científicas.

À Dra. Mari Cleide Sogayar por disponibilizar as culturas de células RINm5f bem como seu laboratório para a realização de muitos experimentos, além de apoio e amizade.

À Dra. Alícia Kowaltowski e à Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, por me aceitarem como aluno de iniciação científica em seus laboratórios, despertando meu interesse para a área acadêmica.

Ao meu amigo Dr. Humberto Miguel Garay-Malpartida e em especial a Maria Fernanda Forni, uma pessoa fantástica, competente e ótima cientista. Muitos dos resultados apresentados nesta tese são frutos do trabalho de ambos.

Aos meus amigos desde o tempo de graduação e que acabaram por me acompanhar também na pós-graduação: Danilo Bilches Medinas, Graciele Almeida de Oliveira, Lívia Fujita Barbosa, Luciana Mantzouranis e Lizandra B. R. Castro.

À Vanessa Cardoso, colega de laboratório, a qual admiro por sua perseverança, dedicação e amizade.

Ao Dr. Fernando Dutra por ensinar a síntese da aminoacetona e por ajudar no início do Doutorado.

Ao Dr. Pio Colepicolo Neto e ao Dr. Renato Lahos, pelos experimentos para a determinação de GSH.

Aos técnicos da Central Analítica: Wilton, Adriana e Márcio.

Ao Dr. Robert Ivan Schumacher pela amizade, discussões, incentivo e ensino da citometria de fluxo.

À minha namorada Sara Chacon, pelo apoio e paciência com meus horários alternativos, meus fins de semana experimentais e minhas idas aos congressos.

Ao grupo da Dra. Mari Cleide Sogayar, por sua receptividade e amizade durante todos estes anos.

A todo pessoal do laboratório que proporcionou um ótimo ambiente de trabalho e que foram importantes para o desenvolvimento da tese através de discussões e idéias: Dóris Araújo, Adriana Wendel, Dr. Cassius Stevani, Camila Marinho Mano, Rita Tokikawa, Chrislaine Soares, Júlio Massari Filho, Douglas Ganini, Anderson Garbuglio, Luiz Fernando Mendes, Olívia Domingues e Dr. Nílson Assunção.

Aos meus amigos da Pós-Graduação: Graziella Ronsein, Fernanda Manso Prado, Fernanda Cerqueira, Lauren Camargo e Júlio Rozenfeld.

À FAPESP, CAPES, CNPq e INCT Redoxoma pelo apoio financeiro.

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada.” (Marie Curie)

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz apenas onde os outros já foram.” (Alexander Graham Bell)

Resumo

(Sartori, A.) **Toxicidade de Aminoacetona a Células Produtoras de Insulina**. 2010. 131p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Danos induzidos por hiperglicemia em tecidos no diabetes são caracterizados por quatro mecanismos conectados: aumento do fluxo metabólico através da via do poliol, ativação da proteína quinase C (PKC), aumento da atividade da via das hexosaminas e aumento da produção intracelular dos precursores dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Entre eles, os derivados de metilglioxal, um potente agente de modificação de proteínas e DNA, têm sido associados a complicações microvasculares no diabetes: nefropatia, retinopatia e neuropatia. O metilglioxal é produzido a partir das trioses fosfato, acetona e aminoacetona, um catabólito de treonina e glicina, gerado na matriz mitocondrial. A aminoacetona sofre oxidação enzimática, catalisada por aminoxidase sensível a semicarbazida (SSAO), ou química, catalisada por íons de cobre e ferro, produzindo metilglioxal, H_2O_2 e NH_4^+ . Sabendo que metilglioxal e H_2O_2 são capazes de induzir apoptose e/ou necrose em células produtoras de insulina (RINm5f) propomos uma possível atividade pró-oxidante da aminoacetona sobre células *beta* do pâncreas. O tratamento destas linhagens com aminoacetona/Cu(II) aumentou a morte celular, fluxo de Ca^{2+} intracelular, produção de NO, fragmentação do DNA, depleção dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), expressão gênica da proteína apoptótica Bax, enzimas antioxidantes - glutathiona

peroxidase (GPx), glutathione redutase (GRd), catalase e isoformas de superóxido dismutases (CuZnSOD e MnSOD) - e óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Embora as concentrações normais e patológicas da aminoacetona, provavelmente seja muito menores que as usadas nos experimentos, sugerimos que, em tecidos de diabéticos, um acúmulo da aminoacetona em longo prazo pode conduzir a danos oxidativos e eventualmente morte das células *beta* do pâncreas.

Palavras chaves: aminoacetona, metilglioxal, peróxido de hidrogênio, estresse oxidativo, diabetes, células RINm5f.

Abstract

(Sartori, A.) **Cytotoxicity of aminoacetone on insulin-producing cells**. 2010. 131p.
PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tissue damages induced by hyperglycemia in diabetics are characterized by four linked mechanisms: increased flux through the polyol pathway, protein kinase C (PKC) activation, increased hexosamine pathway activity and intracellular production of advanced glycation end product (AGE) precursors. The production of AGEs by modifying proteins and DNA agent, such as methylglyoxal, has been implicated in microvascular complications in diabetes: nephropathy, retinopathy and neuropathy. Methylglyoxal is putatively produced in vivo from trioses phosphate, acetone and aminoacetone, a catabolite of threonine and glycine synthesized in the mitochondrial matrix. Aminoacetone has been reported to undergo semicarbazide sensitive amine oxidase- catalyzed and copper- and iron-catalyzed oxidations by molecular oxygen to methylglyoxal, NH_4^+ ion and H_2O_2 . Considering that methylglyoxal and H_2O_2 have been found to promote apoptosis/necrosis to insulin-producing cells (RINm5f), we propose a possible pro-oxidant role of aminoacetone in pancreatic *beta*-cells. Treatment of RINm5f cells with aminoacetone plus Cu(II) ion promotes an increase of non-viable cells, influx of Ca^{2+} ions, NO production, DNA fragmentation, depletion of reduced glutathione (GSH) levels, and increased mRNA expression of pro-apoptotic protein (Bax), antioxidant enzymes - glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), MnSOD,

CuZnSOD and catalase - and inducible nitric oxide synthase (iNOS). Although both normal and pathological concentrations of aminoacetone are probably much lower than those used here, it is tempting to propose that excess aminoacetone in diabetic patients, at long term, may drive oxidative damage and eventually death of pancreatic *beta*-cells.

Keywords: aminoacetone, methylglyoxal, hydrogen peroxide, oxidative stress, diabetes, RINm5f cells.

Lista de Abreviaturas

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Prótons

AA – Aminoacetona

AGEs - Produtos Finais de Glicação Avançada

ALA - Ácido 5-aminolevulínico

AVC – Acidente Vascular Cerebral

CCT – Complexo de Clivagem da Treonina

Cit P₄₅₀ – Citocromo P₄₅₀

CuZnSOD – Cobre-Zinco Superóxido Dismutase

DAF-FM – Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína

DAG – Diacilglicerol

DHAP – Dihidroxiacetona fosfato

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTPA - Ácido dietilenotriaminopentaacético

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFAT - Glutamina:frutose-6-fosfato amidotransferase

GPx – Glutaciona peroxidase

GRd – Glutaciona redutase

GSH – Glutaciona reduzida

GSSG – Glutaciona oxidada

HL60 – Células Leucêmicas Promielocíticas Humanas

HRP - Peroxidase de raiz forte

iNOS - Óxido Nítico Sintase Induzida

IP – Iodeto de propídeo

MG – Metilglioxal

MnSOD – Manganês Superóxido Dismutase

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NAC - *N*-Acetilcisteína

NEM - *N*-etilmaleíimida

NIH – 3T3 – Linhagem Celular de Fibroblastos Embrionários de Rato

PARP - Poli(ADP) Ribose Polimerase

PBS – Tampão fosfato-salino

PKC – Proteína Quinase C

RINm5f - Linhagem clone de células *beta* pancreáticas

RPMI-1640 - meio “*Roswell Park Memorial Institute*”

RT-PCR – PCR Quantitativo em Tempo Real

SFB – Soro Fetal Bovino

SSAO – Amino oxidase sensível a semicarbazida

***t*-ButOOH** - *tert*-Butil hidroperóxido

TMS – Tetrametilsilano

TOPA - 6-hidroxidopa: 2,4,5-trihidroxifenilalanina

TPI – Triose Fosfato Isomerase

UDP-GLc-Nac - UDP-*N*-acetil glucosamina

Índice

1 – INTRODUÇÃO	15
1.1 – Diabetes: epidemiologia, classificação e bioquímica	15
1.2 – α -Aminoacetonas, α -oxoaldeídos e aminoxidases	20
2 – OBJETIVOS	31
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 – Materiais	33
3.2 – Métodos	34
3.2.1 - Preparação de aminoacetona	34
3.2.2 – Caracterização química da acetoamidoacetona e aminoacetona	34
3.2.3 – Consumo de O ₂ por aminoacetona no meio de cultura RPMi-1640	35
3.2.4 – Testes de viabilidade celular	35
3.2.4.a – Medidas de viabilidade celular pós-adição da aminoacetona	36
3.2.4.b – Testes com metilglioxal	37
3.2.4.c – Testes com peróxido de hidrogênio	37
3.2.4.c.1 – Determinação de peróxido de hidrogênio (método de Cotton e Dunford)	37
3.2.4.d - Efeito do soro fetal bovino na viabilidade celular	38
3.2.4.e – Testes com fibroblastos	38
3.2.5 – Fragmentação de DNA celular	39
3.2.6 – Medidas de fluxo de cálcio intracelular por citometria de fluxo	39
3.2.7 – Expressão gênica de proteínas antioxidantes (catalase, CuZnSOD, MnSOD, GRd e GPx), Pró-(Bax) e anti- (Bcl-2) apoptóticas e iNOS	40
3.2.8 – Medidas da atividade da SOD total (CuZnSOD + MnSOD), catalase, GRd e GPx	42
3.2.9 – Quantificação de GSH	46
3.2.10 – Medidas da produção de NO por citometria de fluxo	47
3.2.11 - Análise estatística dos dados	48
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 – Otimização da síntese da aminoacetona	49
4.2 – Cinética de consumo de oxigênio por aminoacetona presente no meio de cultura RPMi 1640, na ausência e presença de soro fetal bovino	52
4.3 – Ação citotóxica de metilglioxal às células RINm5f	53
4.4 – Ação citotóxica de H ₂ O ₂ às células RINm5f	55
4.5 – Ação citotóxica da aminoacetona às células RINm5f em cultura	57

4.6 – Efeito protetor de soro fetal bovino adicionado as culturas de RINm5f	58
4.7 – Efeitos da adição de Fe(II), Fe(III) e Cu(II) a culturas de RINm5f tratadas com aminoacetona.....	62
4.8 - Testes com antioxidantes em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona na ausência de soro fetal bovino	67
4.9 – Ensaio comparativo da ação citotóxica da aminoacetona em culturas de células <i>beta</i> (RINm5f) e fibroblastos (NIH-3T3)	72
4.10 – Medidas da expressão gênica de enzimas antioxidantes (catalase, CuZnSOD, MnSOD, GRd e GPx) de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona	73
4.11 – Medidas da atividade da catalase, SOD (CuZnSOD + MnSOD), GRd e GPx de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona.....	76
4.11.a – Catalase	77
4.11.b – Superóxido Dismutase (CuZnSOD + MnSOD).....	78
4.11.c – Glutathione Redutase	80
4.11.d – Glutathione Peroxidase	81
4.12 - Quantificação de GSH em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona	82
4.13 – Medidas da produção de NO por citometria de fluxo de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona	84
4.14 – Medidas da expressão gênica da iNOS em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona	86
4.15 – Expressão gênica de proteínas pró- (Bax) e anti- (Bcl-2) apoptóticas em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona.....	89
4.16 – Fragmentação do DNA de culturas de células RINm5f induzida pelo tratamento com aminoacetona	91
4.17 – Medidas do fluxo intracelular de cálcio de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona	93
5 – CONCLUSÕES	96
6 – REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO A	124
ANEXO B	125
SÚMULA CURRICULAR.....	126

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Diabetes: epidemiologia, classificação e bioquímica

A história do diabetes *mellitus* remonta a aproximadamente 3.500 anos, desde sua descoberta, descrição e pesquisas sobre causas e tratamentos (Sanders, 2002). O número de casos da doença em todo mundo atingiu cerca de 171 milhões de pessoas em 2000 e pode chegar a mais de 350 milhões em 2030 (Wild *et al.*, 2004). Apenas nos Estados Unidos, estima-se que os casos da doença atingiram cerca de 20 milhões de pessoas em 2007, o que custou ao país aproximadamente 120 bilhões de dólares em campanhas publicitárias, pesquisas e tratamentos (International Diabetes Federation, 2010). O Ministério da Saúde do Brasil constatou, em 2009, que 5,2% da população adulta (acima dos 18 anos) é diabética.

O estilo de vida sedentário aliado a uma má alimentação é um grande passo para a aquisição do diabetes tipo 2 (Narayan e Williamson, 2010), sendo os países em desenvolvimento os mais afetados pela doença, devido à adoção do estilo de vida cada vez mais parecido com o americano (Tuchman, 2009). Por ser predominante, o diabetes tipo 2, é a forma que concentra maior número de estudos sobre seu desenvolvimento e tratamento (Israili, 2009). No que concerne ao diabetes tipo 1, uma doença autoimune, a hiperglicemia é o resultado da destruição das células produtoras de insulina (Hawa *et al.*, 2009; Skyler, 2007). Por isso, ainda não há uma forma eficaz de tratamento da doença (Cernea *et al.*, 2009), apesar de o transplante de ilhotas ser considerado uma das alternativas de tratamento (Corrêa-Giannella e Raposo do Amaral,

2009). O primeiro transplante de ilhotas no Brasil foi realizado com a colaboração da Profa. Dra. Mari Sogayar do IQ-USP (Eliaschewitz *et al.*, 2004). Outra proposta para um tratamento eficaz da doença poderá resultar do estudo de células-tronco (Couri e Voltarelli, 2009).

Todas as formas de diabetes são caracterizadas por hiperglicemia crônica e o desenvolvimento de patologias na retina, nervos periféricos e glomérulos renais (Brownlee, 2001). O diabetes também é associado com o aceleração da aterosclerose macrovascular, a qual afeta as artérias que suprem o coração, cérebro e membros inferiores. Como resultado, pacientes com diabetes têm alto risco de sofrer infarto no miocárdio, amputações de membros inferiores e acidente vascular cerebral (AVC) (Brownlee, 2001; Wei *et al.*, 1998). Danos que ocasionam disfunção mitocondrial são atualmente associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Friederich *et al.*, 2009; Schiff *et al.*, 2009). Esses danos são precedidos por estresse oxidativo (Munusamy e MacMillan-Crow, 2009; Houstis *et al.*, 2006) e sugerem a MnSOD como um dos prováveis alvos de estudo para elucidar/tratar a doença (Nishikawa e Araki, 2007; Bertera *et al.*, 2003).

Durante muitos anos, a relação entre hiperglicemia e desenvolvimento de patologias microvasculares e macrovasculares não era totalmente entendida, porém, hoje há quatro hipóteses sobre como a hiperglicemia pode causar as complicações no diabetes. São elas: (1) aumento do fluxo na via de formação do sorbitol, a partir da ativação da enzima aldose redutase (Lorenzi, 2007); (2) formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), a partir da decomposição dos produtos de Amadori a 3-deoxiglucosona (Monnier *et al.*, 2008), autooxidação da glicose a glioxal (Grillo e Colombatto, 2008) e aumento na formação de metilglioxal (Kalapos, 2008); (3) ativação

das isoformas da proteína quinase C (PKC), a partir do aumento da concentração de diacilglicerol (DAG) (Das Evcimen e King, 2007); e (4) aumento do fluxo através da via das hexosaminas, com formação de UDP-*N*-acetil glucosamina (UDP-GLc-Nac), a partir da frutose 6-fosfato, a qual acarreta O-glicosilação de resíduos de treonina e serina em fatores de transcrição, resultando em mudanças patológicas na expressão gênica (Hu *et al.*, 2009).

Em fins de 2009, o PubMed registrou aproximadamente 343.000 referências sobre o verbete “Diabetes”, porém, até pouco tempo atrás, não havia relatos que interligassem as quatro hipóteses bioquímicas de danos causados pela hiperglicemia. Primeiro, porque faltava um elemento comum e, segundo, porque todas as tentativas de tratamento pontual de cada uma das hipóteses haviam falhado (Brownlee, 2005). Porém, em 2000, o grupo do pesquisador Michael Brownlee (Albert Einstein College of Medicine, New York) apresentou dados que suportam a hipótese de que a hiperglicemia eleva a produção do $O_2^{\bullet-}$ na mitocôndria, ativando o ciclo das hexosaminas (Du *et al.*, 2000) e que a normalização da produção do $O_2^{\bullet-}$ a partir da mitocôndria inibe a ativação das isoformas da PKC bem como a formação de AGEs e sorbitol (Nishikawa *et al.*, 2000). Estes resultados corroboraram resultados anteriores de outros grupos de pesquisa que ligavam a hiperglicemia ao desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo no diabetes (Ceriello *et al.*, 1993; Wolf *et al.*, 1991).

Em um estado hiperglicêmico, há elevado influxo celular de glicose. Esse excesso de glicose é oxidado, gerando elevadas concentrações de coenzimas reduzidas, sobrecarregando a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, o que deve comprometer o transporte de elétrons através do complexo III. Espera-se,

conseqüentemente, aumento do vazamento de elétrons ao nível da coenzima Q e, a partir daí, redução unieletrônica da molécula de oxigênio ao $O_2^{\bullet-}$ (Korshunov *et al.*, 1997).

Estes dados permitiram conectar a ocorrência de elevadas concentrações do $O_2^{\bullet-}$ com as quatro hipóteses. Du e colab. (2000) reportaram que o aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ acarreta diminuição da atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima da via glicolítica. Sabe-se que esta enzima pode ser inativada por H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ através da oxidação de grupos sulfidrilas presentes em seu sitio ativo (Brodie e Reed, 1987). Como esta inativação é reversível, este evento não se encaixaria bem no modelo proposto para hiperglicemia/estresse oxidativo. Garcia Soriano e colab. (2001) demonstraram que a hiperglicemia, através da elevada geração de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e oxigênio (EROs), ativa a poli(ADP) ribose polimerase (PARP), uma enzima reparadora de DNA. Considerando que: (i) uma vez ativada, a PARP cliva o NAD^+ em ácido nicotínico e ADP-ribose, cujo polímero é capaz de se ligar a proteínas contidas no núcleo, inativando-as (Love *et al.*, 1999; de Murcia *et al.*, 1997) e (ii) há translocação bidirecional da enzima GAPDH para o núcleo (Schmidt *et al.*, 2003; Sawa *et al.*, 1997), foi proposto por Brownlee (2005) que a ativação da PARP pela elevada concentração de espécies reativas, com conseqüente ligação dos polímeros de ADP-ribose à GAPDH, seria o ponto de cruzamento entre as quatro hipóteses (Esquema 1).

Esquema 1: Conexões metabólicas entre hiperglicemia e estresse oxidativo em diabetes. A superprodução de O₂^{•-} e a inibição da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase ativam as quatro principais vias de danos causados pela hiperglicemia (Modificado de Brownlee, 2005).

Neste contexto, é importante mencionar que, Du e colab. (2003) haviam demonstrado que ratos nocautes para a PARP, quando submetidos à hiperglicemia (30 mM de glicose), não apresentavam a enzima GAPDH com os polímeros de ADP-ribose. Porém, os animais não nocauteados para PARP, em estado de hiperglicemia, tinham um aumento da ADP-ribosilação da enzima. Dessa maneira, a princípio, fica claro que a GAPDH constitui um ponto crucial no circuito metabólico do diabetes e pode ser um fator chave para a elucidação de novas drogas e terapias contra o diabetes.

1.2 – α -Aminocetonas, α -oxoaldeídos e aminoxidases

Um aumento na produção de EROs e ERNs no organismo acarreta danos oxidativos a lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA, promovendo o aparecimento de compostos carbonílicos reativos que muitas vezes instalam um estado patológico (Ellis, 2007). Doenças como o diabetes estão agora sendo associadas a um acúmulo destes compostos carbonílicos reativos, caracterizando-se um estado metabólico freqüentemente denominado de “estresse carbonílico” (Duran-Jimenez *et al.*, 2009; Turk, 2009; Ceriello e Motz, 2004). Metilglioxal (Yao e Brownlee, 2009; Duran-Jimenez, 2009), 4-hidroxi-2-nonenal (produto da peroxidação lipídica) (LoPachin *et al.*, 2009), 3-deoxiglucosona (Nakayama *et al.*, 2008) e a aminoacetona (Sartori *et al.*; 2008, Dhar *et al.*; 2008) são exemplos de catabolitos associados ao estresse carbonílico no diabetes.

α -Aminocetonas (ex., aminoacetona e ácido 5-aminolevulínico) e α -hidroxicetonas (ex., dihidroxiacetona fosfato), na forma dienólica, comportam-se como polifenóis (ex., 6-hidroxi-dopamina e divicina), ao doar um elétron ao oxigênio molecular gerando $O_2^{\bullet-}$, principalmente se o meio for ligeiramente alcalino ($> \text{pH } 7,4$) e contiver íons fosfato, que atua como catalisador da enolização (Bechara *et al.*, 2006). Além de espécies reativas de oxigênio, a oxidação aeróbica de α -aminocetonas produz α -oxoaldeídos, reconhecidos há muitas décadas como moléculas capazes de reagir com DNA e resíduos sulfidril de cisteína e amino de arginina e lisina (Takahashi, 1977; Sartorelli *et al.*, 1965; Schubert, 1935, 1936).

O estudo de α -aminocetonas pelo grupo do Prof. Etelvino Bechara começou com o ácido 5-aminolevulínico, ALA, (Hermes-Lima *et al.*, 1992; Monteiro *et al.*, 1989), precursor da síntese do grupo heme. Acúmulo de ALA no sangue e tecidos (principalmente cérebro e fígado) foi constatado em pacientes de porfíria aguda intermitente hereditária e intoxicação por chumbo, uma porfíria adquirida (Costa *et al.*, 1997; Demasi *et al.*, 1996; Bechara, 1996; Hindmarsh, 1993; Conley e Chisholm, 1979). Os produtos de oxidação do ALA são H_2O_2 , NH_4^+ e o ácido 4,5-dioxovalérico, este último um catabolito potencialmente genotóxico, pois foi capaz de promover *in vitro* a formação de adutos cíclicos em resíduos de guanina e adenina (Douki *et al.*, 1998a). Demonstrou-se *in vitro* e *in vivo* que a oxidação do ALA gera radicais hidroxila (Timmins *et al.*, 1999; Douki *et al.*, 1998b) e produz danos a mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Vercesi *et al.*, 1994) e de ratos tratados intraperitonalmente com ALA (Pereira *et al.*, 1992).

Similarmente ao ALA, duas outras α -aminocetonas – a aminoacetona, um catabolito de treonina e glicina inicialmente investigada por Dutra e colab. (2001) e estudada nesta tese no que toca às suas propriedades tóxicas a células *beta* e a 1,4-diamino-2-butanona (DAB), um análogo da putrescina responsável por inibir a proliferação de *Trypanosoma cruzi* (Vannier-Santos *et al.*, 2008), também se revelaram como fontes de EROs e α -oxoaldeídos em meio aerado. Todas elas – aminoacetona, ALA e DAB - possuem um amino grupo vicinal à carbonila. Esta característica estrutural torna esta molécula passível de enolização catalisada por fosfato, com subsequente oxidação pelo oxigênio na presença de Fe(II) ou Cu(II), produzindo um α -oxoaldeído

(metilglioxal, no caso de aminoacetona), H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NH_4^+ (Bechara *et al.*, 2006)

(Esquema 2).

Esquema 2: Mecanismo de oxidação aeróbica não enzimática de α -aminoacetonas (Reproduzido de Bechara e colab. 2006).

Metabólitos de natureza α -hidroxicarbonílica, como aldoses, aldiminas e dihidroxiacetona (DHAP), também são passíveis de enolização a enedióis, cujo potencial de redução também é negativo o suficiente para transferir elétron para o oxigênio formando $\text{O}_2^{\bullet-}$ e radical enoila como demonstrado por Mashino e Fridovich, (1987) para a DHAP. Neste caso, o produto final é o hidroxipiruváldéido, também altamente reativo frente a nucleófilos como resíduos de cisteína e lisina de proteínas.

Segundo Mátyus e colab. (2004) e outros autores, aminoacetona também pode sofrer oxidação enzimática catalisada por uma aminoxidase sensível a semicarbazida (SSAO), promovida por um cofator redox da classe das quinonas, denominado TOPA (6-hidróxidopa: 2,4,5-trihidróxifenilalanina), e por isso é inibida via adição de Michael

por moléculas que possuem um grupo nucleofílico, como derivados de hidrazina e de propargilamina. As SSAOs são capazes de catalisar a oxidação aeróbica de aminas primárias, endógenas ou xenobióticas, gerando seus aldeídos correspondentes, H_2O_2 e NH_4^+ (Obata, 2006) (Equação 1). Dessa maneira, Xiao e Yu, (2009) explicam a participação de SSAOs no desenvolvimento do diabetes.

Equação 1 - Desaminação oxidativa de aminas primárias por SSAO.

As SSAOs distinguem-se das monoamina oxidases, pelo fato de estas não serem inibidas por semicarbazida. A denominação SSAO não é totalmente correta, pois outras amino oxidases também são inibidas por semicarbazida, incluindo diamino oxidases, também classificadas como lisil oxidases (Smith-Mungo e Kagan, 1998), as quais se diferem por utilizarem uma lisinatirósilquinona, ao invés do TOPA, como cofator (Wang *et al.*, 1997).

Na maioria dos mamíferos, as SSAOs existem sob duas isoformas - ligada a tecidos ou solúveis (plasma) - hipoteticamente relacionadas com o diabetes (Obata, 2006). Há variações na atividade da SSAO em plasma e tecidos de mamíferos (Boomsma *et al.*, 2000). Elevadas atividades de SSAO são associadas a células cardiovasculares do músculo liso, tecido adiposo, pulmão e cartilagem (Hernandez *et al.*, 2006). São ausentes em nervos e células gliais do cérebro, mas presentes nos microvasos cerebrais (Castillo, 1997). Vale ressaltar que alguns estudos não conseguiram demonstrar atividade de SSAO na região endócrina do pâncreas de humanos (Ramonet *et al.*, 2003; Andrés *et al.*, 2001) e outros demonstraram que há

uma atividade de SSAO em pâncreas e ilhotas de ratos (Abella *et al.*, 2003; Hayes e Clarke, 1990).

Recentes estudos revelaram a participação de SSAO em desordens relacionadas ao déficit de atenção (Roessner *et al.*, 2006), a estados de falha renal crônica (Nemcsik *et al.*, 2007), à ativação de receptores GLUT-4 em conjunto com MAO, com concomitante captação de glicose (McDonald *et al.*, 2007; Abella *et al.*, 2003), a doenças neurodegenerativas como o mal de Alzheimer (Jiang *et al.*, 2008; Unzeta *et al.*, 2007), ao aumento do tecido branco adiposo de ratos (Carpéné *et al.*, 2008), e, destacadamente, a danos vasculares (Gokturk *et al.*, 2007).

Diante desse quadro, torna-se difícil definir uma função metabólica para as SSAOs, principalmente porque os produtos gerados pelas reações catalisadas por estas enzimas – EROs, metilglioxal e NH_4^+ (Esquema 3) são potencialmente mais tóxicos que os próprios substratos (O'Sullivan *et al.*, 2004).

Esquema 3 – Oxidação química e enzimática da aminoacetona (AA), gerando metilglioxal (MG), H_2O_2 e NH_4^+ (Sartori *et al.*, 2008).

Há ainda uma terceira via de oxidação da aminoacetona segundo Hiraku e colab. (1999), os quais afirmam que, em altas concentrações (não citadas no artigo), duas moléculas de aminoacetona se condensam resultando na formação da 2,5-dimetilpirazina. Segundo os mesmos autores, tanto a via de formação da 2,5-dimetilpirazina quanto a do metilglioxal, só acontecem na presença de Cu(II) e ambas têm H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ como produto final e intermediário (Esquema 4).

A elevada formação de AGEs e possivelmente de aminoacetona e metilglioxal estão relacionadas a um aumento nas concentrações de glicose (Kalapos, 2008). Em especial, o estudo do papel do metilglioxal em diabetes tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois se trata de um potente agente modificador de proteínas e DNA (Synold *et al.*, 2008; Frischmann *et al.*, 2005), possivelmente associado à neuropatia, nefropatia, retinopatia e arteriosclerose típicas de diabetes (Kalapos, 2008; Ahmed e Thornalley, 2007). A concentração plasmática de metilglioxal em sujeitos normais está em torno de 500 nM, podendo ser elevada de 5 a 6 vezes em pacientes de diabetes tipo 1 e de 2 a 3 vezes em pacientes de diabetes tipo 2 (Thornalley, 1996). A variabilidade nas concentrações detectadas de metilglioxal em plasma de pacientes diabéticos deve estar relacionada à alta reatividade da molécula e aos diferentes métodos utilizados para analisar metilglioxal em amostras biológicas (Dhar *et al.*, 2009).

Estudos com linhagens de células produtoras de insulina derivadas de células *beta* (NIT-1 e RINm5f), desafiadas com metilglioxal ou H_2O_2 (Nakamura *et al.*, 2006; Sheader *et al.*, 2001), mostraram que ambos os metabólitos induzem apoptose a estas linhagens. O processo de morte celular promovido por estas moléculas pode estar ligado a danos a mitocôndrias, a DNA e ao aumento intracelular da concentração de

íons cálcio e de íons de metais de transição (Fe(II) e Cu(I)), como sugerido por estudos com células *beta* e linhagens delas derivadas (Lee *et al.*, 2009; Synold *et al.*, 2008; Hamelin *et al.*, 2007; Hamada *et al.*, 2005; Wittmann *et al.*, 2001). Outros estudos também apontam para um papel sinalizador do H₂O₂ na produção de insulina por células *beta* (Pi *et al.*, 2007), o que poderia estar associado à baixa atividade antioxidante detectada nestas células (Lenzen, 2008).

Além da oxidação da aminoacetona via catabolismo da treonina, o metilglioxal é gerado também endogenamente a partir das trioses fosfatos (via glicolítica) e acetona (oxidada pelo citocromo P₄₅₀) (Esquema 5), sendo que a via de detoxificação do metilglioxal utiliza o sistema das glioxalases (Kalapos, 1999a). Esta via, dependente de GSH, foi estudada pelo Prêmio Nobel Szent-Györgyi (1967), quando postulou que o metilglioxal (retina) atua como agente bloqueador da proliferação celular, em que a glioxalase II (promina) agiria como um desbloqueador através da retirada do metilglioxal do sistema, tendo como produto final o ácido *D*-lático (Kalapos, 1999a; Kalapos, 1994).

Assim, durante um estado de privação nutricional, como no diabetes, onde a razão acetil-CoA/CoASH aumenta, a enzima produziria principalmente aminoacetona (House *et al.*, 2001) (Esquema 6).

Outros estudos demonstraram que a atividade da enzima treonina desidrogenase, responsável pela oxidação de treonina a glicina e acetil-CoA (Guerranti *et al.*, 2001) são altas no fígado e pâncreas de porcos (Le Floc'h *et al.*, 1997) e que em ratos esta via corresponde a 87% do catabolismo da treonina (Bird e Nunn, 1983). Mais recentemente Wang e colab. (2009) mostraram que células-tronco embrionárias de camundongo possuem elevados níveis de mRNA, proteína e atividade da enzima treonina desidrogenase. Em humanos, o catabolismo da treonina através da treonina

desidrogenase ainda é controverso. Zhao e colab. (1986) e Darling e colab. (2000) mostraram que, em humanos, a treonina desidrogenase responde por apenas 7-11% do catabolismo da treonina e que a rota principal de oxidação da treonina é a catalisada por L-serina/treonina desidratase, enquanto, resultados de *Northern blotting* de homogenatos de pâncreas humano mostraram que há expressão gênica para o mRNA da 2-amino 3-cetobutirato coenzima A ligase, a segunda enzima na conversão de treonina em glicina e acetil CoA (Edgar e Polak, 2000). Os próprios autores, porém, sugerem que mais estudos sejam realizados a fim de se estabelecer com segurança qual rota de oxidação da treonina é a principal em humanos e, não sendo via treonina desidrogenase, o porquê da diferença em outros animais.

Deve-se ressaltar, contudo, que estudos *in vitro* revelaram que a aminoacetona é um pró-oxidante poderoso promotor de danos oxidativos em biomoléculas e organelas celulares: (i) na presença de Cu(II), promove danos ao DNA de células leucêmicas promielocíticas humanas (HL60) (Hiraku *et al.*, 1999); (ii) consome oxigênio na presença de ferritina, induzindo a liberação de ferro, além de causar perda da atividade ferroxidásica da apoproteína, bem como de sua capacidade de captação de Fe(III) (Dutra *et al.*, 2003); (iii) induz permeabilização mitocondrial através da abertura de poros sensíveis a ciclosporina-A e dependentes de cálcio, acarretando inchamento mitocondrial (Dutra e Bechara, 2004); e (iv) induz agregação de proteína, liberação de cobre e diminuição da atividade ferroxidásica da ceruloplasmina (Dutra *et al.*, 2005), uma proteína estocadora de cobre, cuja concentração em diabéticos é bastante elevada (Daimon *et al.*, 1998).

Esquema 4: Mecanismos propostos por Hiraku e colab. (1999) para explicar danos em DNA promovidos por aminoacetona. **(A)** Via de formação de metilglioxal e H_2O_2 através da oxidação química da aminoacetona. **(B)** Via de formação da 2,5–dimetilpirazina e H_2O_2 através da condensação de duas moléculas de aminoacetona (Modificado de Hiraku e colab. (1999)).

Esquema 5 - Rotas metabólicas de formação do metilglioxal (Sartori *et al.*, 2008)

Esquema 6 – Metabolismo da Treonina (Reproduzido da Tese de Doutorado do Dr. Fernando Dutra – 2003).

Diante do exposto acima e considerando o papel de EROs e ERNs no envelhecimento e morte celular é pertinente questionar se aminoacetona, como agente

agregador de proteínas, em virtude de seus grupos funcionais amínico e carbonílico, ou se seus produtos de oxidação por oxigênio (radicais de oxigênio, H_2O_2), poderia contribuir com metilglioxal na indução de morte de células pancreáticas produtoras de insulina.

2 – OBJETIVOS

Objetivo central: Demonstrar que a aminoacetona, um catabólito de treonina e glicina putativamente acumulado em diabetes, contribui para danos a biomoléculas e estruturas celulares e eventualmente morte de células *beta*, através da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e metilglioxal durante sua oxidação aeróbica não enzimática, respondendo assim, pelo menos parcialmente, pelas manifestações clínicas desta devastadora doença.

Justificativas: Embora SSAO seja uma amino oxidase amplamente distribuída no organismo, localizada na membrana plasmática e no plasma (Obata, 2006), ela não é específica para aminoacetona. Seu substrato mais reativo é a benzilamina, um xenobiótico (Mátyus *et al.*, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2004). Ekblom (1998) relatou que as concentrações de aminoacetona no plasma de pacientes com diabetes são elevadas, entretanto as concentrações fisiológicas deste metabólito permanecem desconhecidas. Sabe-se que a aminoacetona é um metabólito mitocondrial (Guerranti *et al.*, 2001) e trabalhos anteriores de Bechara e colaboradores revelaram que a oxidação química da aminoacetona, catalisada por metal, é propagada por $O_2^{\bullet-}$ e produz metilglioxal (Dutra *et al.*, 2001), e que tais espécies promovem danos oxidativos a mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Dutra e Bechara, 2004), ferritina e mioglobina (Dutra *et al.*, 2003; Dutra *et al.*, 2001) e ceruloplasmina (Dutra *et al.*, 2005). Propôs-se que, uma vez produzida na matriz mitocondrial de células *beta*, a aminoacetona migre até o

citoplasma onde ocorrem sua oxidação e danos oxidativos às células. Segundo Zheng e colab. (2008), Turk e colab. (2006) e Wrede e colab. (2006), as concentrações de metilglioxal, íons Fe(II) e íons Cu(II) estão aumentadas no diabetes *mellitus*, e, segundo Lenzen (2008), células *beta* possuem proteção antioxidante muito baixa comparada às demais células do organismo. Estes achados reforçam a hipótese de que aminoacetona pode atuar como uma toxina endógena em diabetes.

Abordagens experimentais: Linhagens de células produtoras de insulina (RINm5f) (Gazdar et al., 1980) foram desafiadas com aminoacetona, com o intuito de se verificar a viabilidade celular frente aos intermediários reativos (EROs) e produto principal (metilglioxal) oriundos da oxidação de aminoacetona. Através do método clássico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), que monitora a viabilidade celular, constatamos a toxicidade da aminoacetona às células produtoras de insulina. Adicionando-se antioxidantes (SOD, catalase, *N*-acetilcisteína (NAC), batocuproína) ou íons de Fe(II) e Cu(II) como catalisadores ao meio de cultura, buscamos confirmar a participação de EROs nos danos causados pela aminoacetona às células. Medidas de expressão gênica (Bax, Bcl-2, iNOS, CuZnSOD, MnSOD, catalase, GPx, GRd), níveis de Ca^{2+} intracelular, produção de NO, atividade das enzimas antioxidantes, fragmentação de DNA e medidas de níveis de GSH foram realizadas para esclarecer os mecanismos moleculares que conduziam as células à morte quando desafiadas por aminoacetona.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou Merck. Piridina, anidrido acético, etanol e éter dietílico utilizados na síntese da aminoacetona foram purificados conforme descrito por Armarego e Perrin (1998). Todos os tampões utilizados nos experimentos foram previamente tratados com CHELEX.

Linhagens de células produtoras de insulina (RINm5f) e, para comparação, de fibroblastos (NIH – 3T3), bem como todo material utilizado para as culturas destas células foram fornecidos pela Prof^a Mari Cleide Sogayar (IQUSP). Isto inclui o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) e os meios “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI-1640) e Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) contendo 2,0 mg/mL (11.1 mM) e 1,0 mg/mL (5,55 mM) de glicose respectivamente, 100 unidades/mL de penicilina e 100 unidades/mL de estreptomicina acrescidos ou não com 10% de soro fetal bovino, (Kumazawa *et al.*, 2007; Akiba *et al.*, 2004), tripsina/EDTA e dimetilsulfóxido (DMSO), utilizados para as análises de viabilidade celular no leitor de microplacas ELISA e congelamento de estoque de células, além do espaço para a manipulação das culturas.

3.2 – Métodos

3.2.1 - Preparação de aminoacetona – Aminoacetona foi preparada como descrito por Hepworth (1976), onde uma mistura de glicina (1,0 mol), piridina (6,0 mol) e anidrido acético (12,0 mol) foi aquecida até o refluxo do solvente e deixada sob agitação por 6 h. Decorrido este tempo, os excessos de piridina, anidrido acético e ácido acético foram rotoevaporados à pressão reduzida, porém sem aquecimento. O resíduo, um óleo escuro, foi destilado à pressão reduzida (~0,5 mmHg). O produto, acetoamidoacetona, tem aparência oleosa e cor amarelada.

A acetoamidoacetona assim obtida foi dissolvida em 350 mL de HCl 6 M. A mistura foi aquecida até a ebulição por 6 h, sob atmosfera de N₂. A solução resultante foi concentrada em rotoevaporador, sem que a temperatura do banho chegasse a 60°C, até que toda a água, HCl e ácido acético (formado na reação) fossem eliminados. O produto obtido é um óleo castanho que foi dissolvido em etanol superseco e, após adição de éter anidro, submetido à recristalização do produto (relação etanol:éter 2:8). Por ser muito higroscópica, a aminoacetona resultante foi filtrada em *atmosbag*, sob atmosfera de N₂, mantida em dessecador sobre pentóxido de fósforo por várias horas, pesada em vários frascos de penicilina, selados sob nitrogênio e armazenados em congelador (-20°C).

3.2.2 – Caracterização química da acetoamidoacetona e aminoacetona – A aminoacetona foi caracterizada por análise elementar na Central Analítica do IQ-USP

utilizando o aparelho: Elementar Analyzer CHN modelo 2400 da Perkin Elmer, que permite a determinação de porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio, com erro absoluto entre 0,3 e 0,5.

A caracterização química da acetoamidoacetona e da aminoacetona foi realizada por ^1H RMN (Ressonância Magnética Nuclear de Prótons) no aparelho modelo Bruker AC 200 MHz (Central Analítica IQ-USP) em solução de CDCl_3 e D_2O , respectivamente.

3.2.3 – Consumo de O_2 por aminoacetona no meio de cultura RPMi-1640 – Os experimentos para a caracterização de consumo de O_2 pela aminoacetona (1,0 – 10 mM), com ou sem Cu(II) e Fe(II)(EDTA) 100 μM no meio de cultura RPMi-1640, na ausência ou presença de soro fetal bovino 10%, foram realizados em um oxígrafo da Hansatech Instruments, o qual contém, um eletrodo de Clark, seletivo de oxigênio molecular, durante 30 a 60 min a 37°C .

3.2.4 – Testes de viabilidade celular - O método utilizado para a verificação da viabilidade celular baseia-se no MTT, (Mosmann, 1983), um substrato de desidrogenases de mitocondriais de células viáveis, as quais catalisam a redução do MTT à sua formazana, um sal colorido e insolúvel em água.

Anterior ao tratamento com as drogas, as placas (10^4 células/poço) com 200 μL de meio de cultura em cada poço, foram mantidas durante 48 h em estufa a 37°C , em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , com o intuito de que, no momento de adição da droga, as células estivessem em fase exponencial de crescimento.

Após o período de tratamento, o meio de cultura contendo a droga foi substituído por meio de cultura (na ausência ou presença de soro) contendo MTT (0,5 mg/mL). Após 4 h de tratamento com o MTT, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se DMSO a fim de solubilizar a formazana. Os valores de viabilidade celular foram medidos através de um leitor de microplacas ELISA da Molecular Devices modelo spectramax M2^e, a 570 nm e normalizados em relação ao controle. Os testes tiveram período de exposição às drogas de 24 h. Este procedimento foi utilizado para todos os testes de viabilidade celular.

3.2.4.a – Medidas de viabilidade celular pós-adição da aminoacetona -

Aminoacetona foi adicionada às células em meios de cultura, na ausência ou presença de soro fetal bovino, em concentrações variando de 2,0 μ M a 10 mM, na presença ou ausência de Cu(II)_(aq) (5,0-100 μ M) e soluções estoque na razão 1:1,2 de Fe(II)(EDTA) (30-300 μ M), Fe(II)(citrato) e Fe(III)EDTA (300 μ M). Para verificar se os produtos de oxidação da aminoacetona eram os agentes promotores da morte celular foram utilizados catalase (5,0 μ M), SOD (50 U/mL) e NAC (5,0 mM) como antioxidantes em experimentos contendo apenas aminoacetona (5,0 mM) ou aminoacetona (1,0 mM) na presença de Cu(II) 100 μ M. Também se utilizou o quelante batocuproína (0,10 mM), que apresenta coloração alaranjada quando coordenada a Cu(I), com o intuito de se verificar um ciclo redox Cu(II)-Cu(I) no sistema, como postulado anteriormente por Hiraku e colab. (1999). Os testes foram realizados na ausência de soro.

3.2.4.b – Testes com metilglioxal – Metilglioxal (0,50 –10 mM) foi adicionado ao meio de cultura (com soro), com o objetivo de comprovar e comparar os efeitos citotóxicos do metilglioxal às células produtoras de insulina, como descrito previamente por Sheader e colab. (2001) e por Cook e colab. (1998). Uma solução estoque de metilglioxal foi preparada em água e a concentração foi calculada de sua absorção a 286 nm ($\epsilon = 32 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) depois de sua derivatização com cloridato de semicarbazida (Rodrigues *et al.*, 2006).

3.2.4.c – Testes com peróxido de hidrogênio – Peróxido de hidrogênio, (5,0 – 200 μM), quantificado pelo método de Cotton e Dunford, (1973), foi adicionado ao meio de cultura, com o objetivo de comprovar e comparar os efeitos citotóxicos de H_2O_2 às células produtoras de insulina, como descrito por Tiedge e colab. (1997, 1999).

3.2.4.c.1 – Determinação de peróxido de hidrogênio (método de Cotton e Dunford)

– Em uma cubeta, contendo 3,0 mL de uma solução 0,05 M de KI, em tampão acetato (pH = 3,8, 10 mM) adicionou-se 10 μL de solução estoque de H_2O_2 diluída de 10 a 1000 vezes em água. Em seguida, adicionou-se 10^{-8} M HRP (peroxidase de raiz forte) na mesma cubeta e mediu-se a absorbância do íon I_3^- em 353 nm ($\epsilon = 2.55 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para calcular-se a concentração de H_2O_2 . Antes de realizar os experimentos, a

concentração do H_2O_2 foi verificada lendo-se a absorbância de uma solução de H_2O_2 em água a 240 nm ($\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Beers e Sizer, 1952).

3.2.4.d - Efeito do soro fetal bovino na viabilidade celular – O soro, comumente usado em culturas de células (no caso, 10^4 células/poço, placa de 96 poços), pode apresentar efeito protetor em sistemas dependentes de EROs ou ERNs, atribuível a componentes antioxidantes do soro que se comportam como alvos mais susceptíveis ao ataque da espécies reativas do que as células. Assim foi comparada a viabilidade de linhagens submetidas ao tratamento com aminoacetona em meios de cultura na presença ou ausência de soro. Como o MTT constitui um método que também permite comparar a população de células sob diferentes tratamentos, realizou-se experimento de proliferação celular nas mesmas condições utilizadas para o teste de viabilidade.

3.2.4.e – Testes com fibroblastos – Fibroblastos, (NHI – 3T3) em meio DMEM, foram desafiados com aminoacetona (0,1–10 mM), com o objetivo de verificar se culturas diferentes de células oriundas do tecido pancreático são de fato mais resistentes ao estresse oxidativo, conforme indicado na literatura (Grankvist *et al.*, 1981; Tiedge *et al.*, 1997). Os experimentos com fibroblastos foram realizados em meio de cultura suplementado com 10% de soro.

3.2.5 – Fragmentação de DNA celular - Células RINm5f (10^5 células/poço, placas de 12 poços) foram tratadas com 1,0 mM de aminoacetona na ausência ou presença de 100 μ M de Cu(II) e sem soro durante 24 h. Após este período, o meio foi retirado e as células lavadas 2 vezes com PBS e tripsinizadas. As células foram centrifugadas durante 3 min a 1000 g, o meio com tripsina retirado, sendo então lisadas em tampão hipotônico, pH 7,4, contendo: 50 μ L/mL de iodeto de propídeo (IP) (Invitrogen), 0,1% m/v de citrato de sódio e 0,1% m/v de Triton X-100. A fragmentação do DNA celular foi medida de acordo com Formichi e colab. (2006).

3.2.6 – Medidas de fluxo de cálcio intracelular por citometria de fluxo – Células RINm5f (10^5 células/poço, placas de 12 poços) foram expostas a aminoacetona (0,50-1,0 mM) na presença ou ausência de Cu(II) (100 μ M) e na ausência de soro, durante 4 h. Foi utilizada a sonda Fluo-4 AM (acetoximetil) ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$), $K_d(\text{Ca}^{2+}) = 325 \text{ nM}$ (Gee *et al.*, 2000). Após 4 h, o meio foi retirado, e as células lavadas 2 vezes com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1,0 mL de meio fresco (sem soro). Antes das medidas no citômetro, os meios contendo as células foram mantidos por 45 min no escuro em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C na presença de 100 nM de Fluo-4 AM (solução estoque 1,0 mM em DMSO). Fluo-4 AM é permeável à membrana plasmática sendo hidrolisado por esterases presentes no citoplasma. A forma livre do reagente se torna fluorescente quando ligada aos íons de cálcio. O equipamento utilizado foi o citômetro de fluxo (Beckman Coulter, modelo cytomics FC 500 MPL) da Central Analítica do IQ-USP.

3.2.7 – Expressão gênica de proteínas antioxidantes (catalase, CuZnSOD, MnSOD, GRd e GPx), Pró- (Bax) e anti- (Bcl-2) apoptóticas e iNOS.

Enzimas antioxidantes - Células RINm5f (10^5 células/poço, placas de 12 poços) foram tratadas com 0,50-1,0 mM de aminoacetona na ausência ou presença de 50 μ M de Cu(II), por 2 h, sem soro. Decorrido este tempo, o meio foi retirado, as células lavadas 2 vezes com PBS e meio fresco contendo 10% de soro foi adicionado por mais 22 h. O meio foi então retirado, as células lavadas 2 vezes com PBS e tripsinizadas. A Tabela 1 apresenta os *primers* gene-específicos utilizados no PCR para as enzimas antioxidantes. A menor concentração de Cu(II) utilizada (50 μ M) e o tempo reduzido de exposição 2 h em relação aos outros tratamentos foram escolhidos com o intuito de promover apenas um efeito indutor, pré-condicionante da expressão das enzimas antioxidantes, sem que houvesse queda de viabilidade celular significativa.

Tabela 1: *Primers* Gene-Específicos utilizados no PCR para Enzimas Antioxidantes

Gene	Seqüências	
	Senso	Antisenso
<u>Catalase</u>	<u>ATTGCCGTCCGATTCTCC</u>	<u>CCAGTTACCATCTTCAGTGTAG</u>
<u>GPx</u>	<u>GTTCGGACATCAGGAGAATGG</u>	<u>GGGTTTCGATGTCGATGGTGC</u>
<u>MnSOD</u>	<u>GACCTGCCTTACGACTATG</u>	<u>TACTTCTCCTCGGTGACG</u>
<u>CuZnSOD</u>	<u>CCAGCGGATGAAGAGAGG</u>	<u>CCAATCACACCACAAGCC</u>
<u>GRd</u>	<u>CGGAAGTCAACGGGAAGAAG</u>	<u>CCACCCGTGGCGATCA</u>

Bax e Bcl-2 - Células RINm5f (10^5 células/poço, placas de 12 poços) foram tratadas com aminoacetona (1,0 mM) na presença de Cu(II) 100 μ M durante 24 h, porém na ausência de soro. Depois, o meio foi retirado e as células lavadas 2 vezes com PBS e tripsinizadas. A Tabela 2 apresenta os *primers* gene-específicos utilizados no PCR para Bax e Bcl-2.

Tabela 2: *Primers* Gene-Específicos utilizados no PCR para Proteínas Pro- e Anti-Apoptóticas

Gene	Seqüências	
	Senso	Antisenso
Bax	<u>CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC</u>	<u>GAAGTTGCCGTCTGCAAACA</u>
Bcl-2	<u>CTGGGATGCCTTTGTGGAA</u>	<u>CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA</u>

iNOS - Para a leitura da expressão da NO sintase, foi elaborada uma curva com células RINm5f cultivadas em placas de 6 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço), com tempos de tratamento de 10 min e 1, 2 e 24 h. As culturas, ficaram expostas a aminoacetona 1,0 mM na ausência ou presença de Cu(II) 50 μ M por no máximo de 2 h em meio RPMi sem soro. Quanto ao tratamento de 24 horas, o tempo de incubação em meio sem soro na presença de aminoacetona e Cu(II) foi de 2 h acrescido por mais 22 h em meio suplementado com 10% de soro. Para este último tratamento (24 h) as culturas foram lavadas 2 vezes com PBS antes da adição do meio suplementado com 10% de soro. A Tabela 3 apresenta os *primers* gene-específicos utilizados no PCR para a iNOS.

Tabela 3: *Primers* Gene-Específicos utilizados no PCR para iNOS

Gene	Seqüências	
	Senso	Antisenso
iNOS	<u>GCTGAAGATTTGGAAAAGGTGT</u>	<u>ACAGAGGGCCACAATGTGAT</u>

Para todos os experimentos, as células tiveram o RNA total extraído usando Trizol® (Invitrogen, Carisoad, CA). A qualidade do RNA foi verificada através da razão obtida dos espectros UV-Vis dos RNAs a 280/260 e 230/260 nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 2,0 µg do RNA total utilizando o kit SuperScript III Reverse Transcriptase, (Invitrogen), com uma mistura randômica de *primers* OligodT. Desse modo foi possível à análise da expressão gênica das proteínas citadas acima através de PCR quantitativo em tempo real (RT – PCR) utilizando o Sybr®Green Master Mix (Applied Biosystems), com o detector de seqüências ABI PRISM 5700 (Perkin-Elmer/Applied Biosystems). Os *primers* gene-específicos utilizados no PCR, são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3. Foi usado um protocolo em dois passos, com uma temperatura desnaturante a 95°C e uma temperatura de anelamento-extensão de 60°C. Os níveis de expressão relativa dos genes foram calculados através da fórmula: $2^{-(\Delta Ct - \Delta \Delta Ct)}$ (McKay *et al.*, 2006).

3.2.8 – Medidas da atividade da SOD total (CuZnSOD + MnSOD), catalase, GRd e GPx – Células RINm5f (2,5x10⁵ células/poço, placas de 6 poços) foram tratadas com 1,0 mM de aminoacetona na ausência ou presença de 50 µM de Cu(II), por 2 h sem soro. Decorrido este tempo, o meio foi retirado, as células lavadas 2 vezes com PBS e meio fresco suplementado com 10% de soro foi adicionado por mais 22 h. Após este

tempo, o meio foi retirado e as células lavadas 2 vezes com PBS e tripsinizadas. O procedimento para a extração das proteínas foi o seguinte: Após a tripsinização, as células foram centrifugadas por 5 min a 1000 rpm em meio de cultura sem soro. O pellet foi ressuscitado em tampão fosfato 50 mM (pH = 7,8), contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich), diluído 1000 vezes, os tubos foram colocados no gelo e as células sofreram sonicação em equipamento Sonics vibra cell, com amplitude de 20%, em intervalos de 15 s, contabilizando um minuto no total. Os homogenatos foram centrifugados por 40 min a 35.000 g e o sobrenadante aliqotado em amostras de 200 uL e estocado a -20°C até a análise. As análises para todas as enzimas antioxidantes foram realizadas em espectrofotômetro da marca Varian modelo Cary 50 Bio.

O inibidor de proteases é um coquetel de drogas que garante a inibição de serina-, cisteína- e metalo-proteases. O coquetel é formado por: fluoreto de 4-(2-amino etil) benzenosulfonila (AEBSF), (2S,3S)-3-(N-((S)-1-[N-(4-guanidino butil)carbamoil]3-metil-butyl)carbamoil)oxirano-2-ácido carboxílico (E-64), bestatina, leupeptina, aprotinina e EDTA.

Superóxido Dismutase - A atividade total da SOD foi medida pelo monitoramento da redução do ferricitocromo c na presença de xantina/xantina oxidase como fonte de superóxido, segundo McCord e Fridovich (1969).

O meio reacional foi preparado com 25 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, contendo 0,10 mM de ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA), 10 mL de solução 10 mM de NaOH, 0,76 mg de xantina e 6,2 mg de ferricitocromo c. Preparou-se, à parte, uma solução 0,50 U/mL de xantina oxidase (25 U/mL). Como esta enzima degrada

muito facilmente, é necessário, primeiramente, verificar a sua atividade. Para tanto, adicionam-se volumes diferentes da solução descrita de xantina oxidase a 700 μL de meio de reação e monitora-se a variação da absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3 min. O volume de xantina oxidase que se deve utilizar no ensaio é aquele que fornece uma reta de coeficiente angular em torno de $0,025 \text{ min}^{-1}$. O volume final foi sempre de 1,0 mL.

O ensaio de SOD é efetuado adicionando-se a uma cubeta, contendo 700 μL de meio reacional e 50 μL de amostra, o volume de xantina oxidase encontrado no teste anterior. O volume final foi sempre 1,0 mL. Monitorou-se a absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3 min. A atividade de SOD foi obtida através da determinação das inclinações das retas com e sem amostra. Calculou-se a inibição percentual através da relação $100(1-k_{\text{inb}}/k)$ e, finalmente, determinou-se a atividade de SOD através do valor em 50% de inibição, multiplicando-se pelo fator de diluição do homogenato. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade necessária para inibir a redução do ferricitocromo c em 50 % (Flohé e Otting, 1984).

Catalase - A atividade de catalase foi avaliada pelo monitoramento do consumo de H_2O_2 a 240 nm, durante 1 min a 25°C. O meio reacional constitui-se de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, com DTPA 0,50 mM. Utilizou-se $\varepsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular a concentração de H_2O_2 (Aebi, 1984; Beers e Sizer, 1952).

Glutathione Redutase - A atividade da GRd foi realizada em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,6 com DTPA 0,50 mM. Primeiro, durante 10 min a 30°C, preparou-se o meio de

reação, que contém glutathiona oxidada (GSSG) 1,0 mM e NADPH 0,10 mM em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,6. O meio de reação (900 µL) foi então pipetado em uma cubeta de quartzo juntamente com 100 µL de lisado de células. O consumo do NADPH na redução da GSSG a GSH, catalisada pela GRd, foi medido a 340 nm a 30°C (Carlberg e Mannervik, 1975).

Glutathiona Peroxidase - A atividade de glutathiona peroxidase (GPx) foi medida em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,0, contendo DTPA 1,0 mM. Durante 10 min e a 37°C, incubou-se a mistura de reação: 500 µL de tampão fosfato 0,10 M, pH 7,0, 100 µL de lisado de células, GRd 0,24 U/mL e GSH 1,0 mM. Depois, adicionou-se NADPH 0,15 mM preparado em solução de NaHCO₃ 0,10% m/v ao meio de reação. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo e durante 2,5 min verificou-se se havia decaimento do NADPH a 340 nm e a 37°C. Permanecendo estável, adicionava-se então o oxidante *terc*-butil hidroperóxido (t-ButOOH) 1,2 mM. A atividade da GPx é calculada do consumo de NADPH medido a 340 nm, gasto na redução da GSSG catalisada pela GRd, gerando mais GSH para a reação da GPx. Os cálculos para a obtenção da atividade da enzima foram os utilizados por Flohé e Günzler (1984).

Em todos os experimentos de medida de atividade enzimática (SOD, catalase, GRd e GPx), a concentração total de proteína nos lisados foi medida pelo método de Bradford, utilizando um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50 Bio. A concentração de proteína total em cada experimento variou de 1,0 a 5,0 µg/mL.

3.2.9 – Quantificação de GSH – Os procedimentos de cultivo e tratamento das culturas de células RINm5f com aminoacetona, na presença ou ausência de Cu(II), e a homogeneização dos meios contendo as células tripsinazadas são similares aos descritos no item 3.2.8 de Materiais e Métodos. Utilizou-se tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, para a homogeneização e : *N*-etilmaleimida (NEM) (100 mM) como derivatizante adicionado ao tampão contendo as células para evitar perda de GSH por oxidação.

A determinação de GSH foi realizada em HPLC/MS do tipo híbrido triplo quádruplo/ion-trap linear, marca Applied Biosystems modelo 3200 QTrap. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna com preenchimento de C-18 (Luna, 250 x 4,6 mm, 5 µm) da marca Phenomenex®, com fase móvel A: metanol/água (65:35), 5,0 mM de acetato de amônio e 0,10% de ácido fórmico e fase móvel B: água com 5,0 mM de acetato de amônio e 0,10 % de ácido fórmico. O fluxo usado foi de 0,90 mL/min, com gradiente de solventes de: 100% de B por 30 s, de 30 s a 2 min 0% de B, condição que foi mantida até 5 min, voltando para a condição inicial após 5 min. A corrida cromatográfica teve duração total de 12 min. A análise por espectrometria de massas foi feita utilizando o método “multiple reaction monitoring (MRM)” em que após a ionização da amostra na fonte de ionização, filtram-se no primeiro quadrupolo do equipamento apenas os íons de massa/carga correspondentes aos analitos de interesse. No caso, usando para glutathiona reduzida as transições: 433,1/355,2 (glutathiona reduzida + *N*-etilmaleimida + H⁺). Portanto, apenas este íon passa do primeiro quadrupolo para o segundo, onde será fragmentado, e os fragmentos gerados serão filtrados no terceiro quadrupolo para que apenas os fragmentos específicos do analito cheguem ao detector que gera o sinal no equipamento. Esta metodologia, ainda

não publicada, foi desenvolvida no laboratório do Prof. Dr. Pio Colepicolo (IQ-USP), onde foram feitas as análises. Foi realizada uma curva padrão com GSH autêntica pré-tratada com NEM previamente a medida das amostras. Os valores encontrados em ng/mL de GSH foram normalizados pela divisão da concentração de proteína mg/mL encontrada em cada tratamento. O método de Bradford foi o utilizado para a obtenção da concentração de proteína.

3.2.10 – Medidas da produção de NO por citometria de fluxo – Células RINm5f foram tratadas em meio sem soro com aminoacetona 1,0 mM na ausência ou presença de Cu(II) 50 μ M por 2 h ($2,5 \times 10^5$ células/poço, placas de 6 poços). Após esse período, o procedimento com as células percorreu dois caminhos distintos: a primeira metade dos tratamentos teve o meio retirado e a produção de NO foi medida após 2 h de tratamento; já para a segunda metade das culturas, o meio foi retirado e adicionou-se meio suplementado com 10% de soro por mais 22 h, e após esse período as leituras da produção de NO foram realizadas. Para ambos os experimentos, o tratamento das células anterior às leituras foi o mesmo: as células foram lavadas 2 vezes com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1,0 mL de meio fresco (sem soro). Antes das medidas no citômetro, (Beckman Coulter, modelo cytomics FC 500 MPL) da Central Analítica do IQ-USP, os meios contendo as células foram mantidos por 45 min no escuro em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C na presença de 100 nM de diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-FM) ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$) (solução estoque 1,0 mM em DMSO) (Nakatsubo *et al.*, 1998). A membrana plasmática é permeável a DAF-FM o qual é desacetilado por esterases intracelulares à 4,5-diamino

fluoresceína (DAF-2). Entretanto, DAF-2, é não fluorescente até reagir com o NO na presença de O₂, formando a molécula fluorescente triazolo-fluoresceína.

3.2.11 - Análise estatística dos dados - Todos os gráficos foram obtidos através do programa Origin, versões 6.1 e 8.0, e Graph Pad Prism, versão 4.02, sendo a análise estatística realizada pelo Student's test-*t* (para a comparação de 2 grupos) com o programa Microsoft Excel e pelo Bonferroni test através do programa Graph Pad Prism (para a análise de três ou mais grupos). Probabilidade de $p < 0,05$ foi utilizada como critério de significância estatística. Cada valor de *n* amostras representa a média de pelo menos uma triplicata obtida de determinações independentes.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Otimização da síntese da aminoacetona

A preparação e caracterização química da aminoacetona, apesar de publicadas no rigoroso *Organic Synthesis* (Hepworth, 1976), apresentaram dificuldades provavelmente em virtude de sua fácil oxidação pelo O_2 , e por isso não é comercializada. Daí a necessidade de se re-estudar sua síntese.

Aminoacetona foi preparada a partir de anidrido acético e glicina, através de duas etapas, segundo as indicações de Hepworth (1976) (Esquema 7). O primeiro passo da síntese é a preparação de acetoamidoacetona na sua forma *N*-acetilada (Figura 1). Este composto foi identificado por 1H RMN na Central Analítica do IQUSP como a acetoamidoacetona *N*-acetilada.

Esquema 7: Rota de síntese da aminoacetona.

Figura 1: Fórmula da acetoamidoacetona.

^1H RMN, CDCl_3/TMS ; $\delta(\text{ppm})$: 2,24 (3H, s, H_1); 2,36 (6H, s, H_3); 4,55 (2H, s, H_2).

O rendimento de preparação foi de 62%, um pouco abaixo ao relatado na literatura (70 a 78%) (Hepworth, 1976).

A reação seguinte visa obter o cloridrato de aminoacetona, através da hidrólise ácida da acetoamidoacetona. Esta reação foi realizada em atmosfera de N_2 em vidraria limpa de íons metálicos contaminantes, pois foi previamente lavada com água MilliQ e tratada com Chelex. O cloridrato de aminoacetona foi obtido com rendimento de 34%, considerado satisfatório. O produto foi caracterizado por ^1H RMN e análise elementar.

Figura 2: Aminoacetona (o pK_a de aminoacetona foi determinado por Dutra *et al.*, 2001).

^1H RMN, D_2O ; δ (ppm): 2,08 (3H, s, H_1); 3,88 (4H, s, H_2)

Devido à facilidade de a aminoacetona ser oxidada pelo O_2 atmosférico, os resultados obtidos da análise elementar (Tabela 4), estão próximos ao erro absoluto tolerável: 0,3 a 0,5 de diferença entre os valores calculados e os obtidos.

Tabela 4: Resultados da primeira análise elementar da aminoacetona.

<u>Átomo</u>	<u>Valor Calculado (%)</u>	<u>Valor Obtido (%)</u>
<u>Carbono (C)</u>	<u>32,88</u>	<u>32,46</u>
<u>Hidrogênio (H)</u>	<u>7,30</u>	<u>6,73</u>
<u>Nitrogênio (N)</u>	<u>12,78</u>	<u>12,05</u>

A diferença entre o valor calculado e o obtido pode ser devida à alta oxidação da aminoacetona, a qual foi manipulada por alguns segundos na presença do O_2 atmosférico. Com a intenção de verificar o efeito da rápida oxidação da aminoacetona frente ao O_2 atmosférico, foi realizada uma segunda análise elementar nos 5 min após a primeira. O resultado é apresentado na Tabela 5:

Tabela 5: Segunda Análise Elementar da aminoacetona.

<u>Átomo</u>	<u>Valor Calculado (%)</u>	<u>Valor Obtido (%)</u>
<u>Carbono (C)</u>	<u>32,88</u>	<u>32,06</u>
<u>Hidrogênio (H)</u>	<u>7,30</u>	<u>6,69</u>
<u>Nitrogênio (N)</u>	<u>12,78</u>	<u>11,85</u>

Estes dados evidenciam a facilidade com que a aminoacetona se decompõe sob O₂ atmosférico no intervalo de minutos (processo de pesar e inserir o composto no aparelho para análise). O espectro de ¹H RMN e a análise elementar atestam pureza satisfatória da amostra de aminoacetona.

4.2 – Consumo de oxigênio por aminoacetona presente no meio de cultura RPMi 1640, na ausência e presença de soro fetal bovino

Foi acompanhado o consumo de oxigênio por aminoacetona dissolvida no meio de cultura, na presença ou ausência de soro, monitorado pelo eletrodo de Clark (Figura 3):

Figura 3: Consumo de O₂ por aminoacetona (AA) no meio de cultura RPMi 1640, suplementado com soro 10%, a 37°C. Este resultado é representativo de ao menos 3 experimentos independentes.

Dessa maneira, pôde-se constatar que ocorre a oxidação da aminoacetona pelo oxigênio dissolvido em meio de cultura RPMi 1640 suplementado com soro 10%. O resultado é similar aos obtidos por Dutra e colab. (2001) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, o que permite supor que no meio de cultura há também a produção de espécies reativas de oxigênio e que a aminoacetona poderia ser tóxica às células RINm5f.

4.3 – Ação citotóxica de metilglioxal às células RINm5f

Como já mencionado na Introdução, o metilglioxal é um agente gerador de produtos de glicação avançada (AGEs) (Gawlowski *et al.*, 2007; Ramasamy *et al.*, 2006), que têm sua concentração elevada no plasma em estados clínicos como o do *diabetes*

mellitus (Cantero *et al.*, 2007). Apesar da importância patológica de AGEs, a literatura envolvendo metilglioxal e células produtoras de insulina é ainda incipiente (MacDonald *et al.*, 2006; Sheader *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 1998). Sabe-se, porém, que o metilglioxal é tóxico a estas células, causando diminuição da produção de insulina (MacDonald *et al.*, 2006) e promoção de danos químicos à própria estrutura da insulina (Jia *et al.*, 2006).

De posse destas informações, buscamos comprovar o efeito citotóxico do metilglioxal às culturas de células RINm5f (Figura 4).

Figura 4: Efeito citotóxico do metilglioxal (MG) às células RINm5f produtoras de insulina. Concentrações de metilglioxal indicadas no histograma. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento foi realizado pelo menos em quadruplicata. * $p < 0,05$

Este resultado corrobora os relatos na literatura, onde o metilglioxal começa a ter um efeito significativo a partir de 1,0 mM (MacDonald *et al.*, 2006; Sheader *et al.*, 2001). Trabalhos anteriores demonstraram que a partir de 5,0 mM da aminoacetona, apenas 200 μ M de metilglioxal são formados (limitação pelo oxigênio dissolvido, em torno de 200 μ M) (Dutra *et al.*, 2001), de modo que os efeitos de concentração da

aminoacetona sobre as células produtoras de insulina podem estar subestimados. De qualquer modo, fica claro que o metilglioxal é um agente citotóxico a linhagem RINm5f, e como o metilglioxal é um produto da oxidação da aminoacetona, este resultado apóia nossa hipótese de que aminoacetona possa exercer uma ação citotóxicas às células produtoras de insulina.

4.4 – Ação citotóxica de H_2O_2 às células RINm5f

Como H_2O_2 tem baixa atividade redox na ausência de íons de metal de transição, praticamente nenhuma oxidação ocorre quando DNA, lipídeos e proteínas simples são incubados com H_2O_2 durante várias horas. Peróxido de hidrogênio pode atravessar a membrana celular rapidamente e, uma vez dentro da célula, pode reagir com íons de ferro e cobre e gerar, através da reação de Fenton, espécies deletérias como o radical hidroxila ($OH^\bullet$) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Como H_2O_2 é um dos produtos da oxidação química da aminoacetona, vale considerar que H_2O_2 possa estar relacionado a uma provável ação citotóxica da aminoacetona às células RINm5f. Esta hipótese é sustentada por trabalhos de Tiedge e colab. (1999, 1997) que relataram ação citotóxica de H_2O_2 as células RINm5f. Reproduzimos estes resultados com culturas de RINm5f submetidas ao tratamento com H_2O_2 na faixa de 5,0 a 200 μM (Figura 5).

O resultado apresentado na Figura 5 demonstra que, de fato, H_2O_2 é citotóxico às células produtoras de insulina, provavelmente por poder atravessar a membrana plasmática e, no meio intracelular, em contato com íons de metais de transição, especialmente íons de ferro e cobre promover reações nocivas às células. Desse modo, nossa hipótese de mecanismo radicalar para a ação citotóxica da aminoacetona sobre as células em estudo é sustentada pelos resultados até então, bem como os dados de literatura que apontam o H_2O_2 como um agente capaz de promover danos e apoptose as culturas de células *beta* (Lee *et al.*, 2009; Roma *et al.*, 2009). Como a aminoacetona é continuamente gerada na mitocôndria, através do catabolismo da treonina e de acetilCoA mais glicina, é tentador propor que, em pacientes com diabetes, a aminoacetona possa contribuir para a perda de função e morte de células *beta* do pâncreas.

Figura 5: Efeito citotóxico de H_2O_2 sobre células RINm5f produtoras de insulina. Concentrações de H_2O_2 indicadas no histograma. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$.

4.5 – Ação citotóxica da aminoacetona às células RINm5f em cultura

Desafiando as linhagens RINm5f com uma larga faixa de concentração da aminoacetona (2,0 μ M–10 mM), durante 24 h de tratamento, determinou-se que uma faixa ótima de trabalho seria entre 1,0–5,0 mM de aminoacetona. Uma porcentagem significativa ($p < 0,05$) de queda da viabilidade celular foi encontrada para aminoacetona em concentração de 5,0 mM: $20 \pm 6\%$ ($n = 3$), enquanto, concentrações abaixo de 3,0 mM não causaram dano significativo às células. Ressaltamos novamente que a velocidade de oxidação de aminoacetona é limitada pela concentração de oxigênio dissolvido, em torno de 200 μ M.

Figura 6: Efeito citotóxico da aminoacetona (AA) sobre células RINm5f produtoras de insulina. Concentrações da aminoacetona indicadas no histograma. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$.

Analisando os resultados obtidos na faixa de 1,0 a 5,0 mM (figura 6) foi calculado o valor de EC_{50} durante 24 h de tratamento: $3,92 \pm 0,13$ mM ($n = 3$). Este valor é provavelmente exageradamente alto para as condições fisiológicas. Porém, considerando-se que a produção de aminoacetona ocorre na matriz mitocondrial, é provável que em estados de diabetes, onde elevada degradação de proteínas e lesões a mitocôndrias é relatada (Wiederkehr e Wollheim, 2006; Kang e Hamasaki, 2005), a concentração de aminoacetona no interior das células seja maior que os níveis circulantes. Embora a produção mitocondrial diária de aminoacetona possa ser na faixa nano ou micromolar nas células *beta*, ela deve ser mais elevada em diabéticos, a julgar das altas concentrações detectadas de metilglioxal e, ao longo do tempo, poderia conduzir a efeitos citotóxicos crônicos, cumulativos, próximos aos encontrados neste trabalho.

4.6 – Efeito protetor de soro fetal bovino adicionado as culturas de RINm5f

Com resultado da seção anterior fica a pergunta: Antioxidantes presentes no soro colaboraram para um efeito protetor às culturas contra a ação oxidante da aminoacetona? Para isso bastaria apenas um teste de viabilidade celular de células tratadas com aminoacetona na presença e ausência de soro, porém, surge uma segunda pergunta: Células RINm5f conseguem sobreviver em meio sem soro por longos períodos, por exemplo, 24 h? Mizuno e colab. (1998) mostraram que células da linhagem RINm5f mantêm alta viabilidade celular até 24 h de tratamento. Já Chow e

colab. (2008) demonstraram que os efeitos citotóxicos de protoporfirinas em glioblastomas foram inibidos pela adição de soro e albumina ao meio de cultura, mesmo resultado alcançado por Kiaer e Thams (2009) que demonstraram que a adição de albumina inibe os efeitos citotóxicos do H_2O_2 e de uma mistura de citocinas (IL-1 β , IFN-gama e TNF- α) em culturas de células *beta* (INS-1E). Diante desse quadro, experimentos de viabilidade celular e proliferação celular foram realizados em meio sem soro e, por comparação, com soro (Figuras 7A e 7B):

Figura 7: (A) Viabilidade celular de células RINm5f na presença e ausência de soro. **(B)** Proliferação Celular de células RINm5f na presença e ausência de soro. Todos os valores representam a média de ao menos 4 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$ em relação às células tratadas em meio com 10% de soro.

As figuras 7A e 7B mostram que a viabilidade celular praticamente não se altera ao longo de 24 h na ausência de soro, em relação às células que estão em meio com 10% de soro. Na ausência de soro, há aumento na proliferação celular, mais lento se comparado às células em meio com 10% de soro. Afinal, o soro é rico em fatores de crescimento, necessários para uma proliferação celular mais acelerada.

Esses resultados mostram que, de fato, é possível realizar experimentos na ausência de soro num período de 24 h e, desse modo, obter resultados mais condizentes com a situação real de ação deletéria da aminoacetona às células RINm5f.

Atestando a possibilidade de realização de experimentos sem soro, fez-se o teste de viabilidade celular adicionando-se aminoacetona 2,5 mM e aminoacetona 1,0 mM na presença e ausência de Cu(II) 100 μ M (Figuras 8A e 8B).

Nota-se que o soro exerce um efeito protetor, já que células tratadas com AA 2,5 mM em meio com soro não apresentaram queda da viabilidade celular, ao contrário das células tratadas nas mesmas condições, na ausência de soro, que apresentaram uma queda de aproximadamente 60% em sua viabilidade.

O mesmo resultado foi obtido quando células tratadas com aminoacetona 1,0 mM na presença de Cu(II) 100 μ M, em meio suplementado com soro, apresentavam queda de viabilidade de aproximadamente 20%. Na ausência de soro, apresentaram queda de viabilidade superior a 80%.

Torna-se necessário verificar se de fato aminoacetona e aminoacetona/Cu(II) são oxidadas mais rapidamente na ausência de soro ou, se no meio de cultura suplementado com soro, o efeito protetor é devido ao fato de os produtos de oxidação da aminoacetona reagirem primeiramente com as biomoléculas do soro, conferindo

assim efeito protetor ao soro. A Figura 9 apresenta a o consumo de oxigênio da aminoacetona em meio de cultura RPMi na ausência e presença de soro.

Figura 8: Efeito protetor do soro fetal bovino (SFB) em células tratadas com aminoacetona (AA) na presença ou ausência de Cu(II). **(A)** Culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona na presença e ausência de soro. **(B)** Culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona com ou sem de íons de Cu(II) na presença ou ausência de soro. As concentrações dos reagentes são apresentadas nos histogramas. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$ em relação às células-controle.

A Figura 9 revela que a velocidade de oxidação da aminoacetona no meio de cultura suplementado com soro é menor em comparação ao meio sem soro. Trabalhos na literatura apontam para o soro utilizado em meios de cultura como fator protetor as culturas contra EROs, por possuírem elevada concentração de albumina. Esta proteína se mostrou eficiente na inibição dos efeitos do H_2O_2 e citocinas a células *beta* e de EROs a células tubulares renais e macrófagos (Kiaer e Thams, 2009; Iglesias *et al.*, 1999) e Wagner e colab. (2007) demonstraram que o soro possui atividade

peroxidásica. Estes resultados alertam para a necessidade de se considerar o efeito protetor de soro em ensaios sobre a toxicidade de drogas produtoras de EROs ou ERNs a células em cultura. É bem provável que o soro contenha proteínas antioxidantes e que alguns constituintes do soro sejam alvos mais susceptíveis à ação deletéria de pró-oxidantes adicionados exogenamente do que as próprias células.

Figura 9: Consumo de O₂ por aminoacetona (AA) no meio de cultura RPMi 1640 na presença ou ausência de soro 10%. As concentrações utilizadas são apresentadas nas figuras. O experimento foi realizado a 37°C durante 30 min. O resultado apresentado é uma amostra de ao menos 3 experimentos independentes.

4.7 – Efeitos da adição de Fe(II), Fe(III) e Cu(II) a culturas de RINm5f tratadas com aminoacetona

Dentre os metais de transição, ferro e cobre desempenham um papel central na geração de EROs, pois o ciclo redox de seus íons promove a reação de Fenton com produção do radical OH[•]. Sabe-se que há sobrecarga destes metais “livres”, ativos, no

organismo, associáveis com as manifestações patológicas do diabetes (Zheng *et al.*, 2008; Swanimathan *et al.*, 2007).

A utilização de íons de Fe(II) e Fe(III) como catalisadores dos experimentos realizados exige o emprego de quelantes, uma vez que íons férricos ou ferrosos se precipitam na forma de hidróxido em pH fisiológico, enquanto Cu(II), plenamente solúvel, foi adicionado na forma livre. Primeiramente foram realizados experimentos de oximetria para verificar a eficiência catalítica destes íons na oxidação da aminoacetona no meio de cultura suplementado ou não com soro. O resultado é apresentado na Figura 10:

Como previsto, o consumo de O₂ na oxidação da aminoacetona na presença de íons de Cu(II) em meio suplementado com 10% de soro foi menor (Figura 10), reforçando o resultado obtido de índice de viabilidade celular para culturas tratadas com aminoacetona/Cu(II) que foi menor em meio de cultura suplementado com soro (Figura 8B). Curiosamente a adição de íons de Fe(II) e Fe(III) quelados a EDTA e citrato (dados não apresentados) a meios de cultura contendo aminoacetona não alterou a viabilidade celular das culturas das células RINm5f. Estes íons não se apresentaram como catalisadores (pelo menos nos testes de viabilidade), contrariando, apesar de serem condições totalmente diferentes, os resultados de estudos *in vitro* do consumo de oxigênio por aminoacetona realizados por Dutra e colab. (2001) e os expostos na figura 10. Não compreendemos ainda a ineficácia aparente dos íons de ferro para catalisar a oxidação da aminoacetona nos experimentos de viabilidade celular. Neste sentido, é importante notar que Kicic e colab. (2001) demonstraram que a membrana plasmática não é totalmente permeável a complexos de íons de Fe(II) e Fe(III) com EDTA.

Figura 10: Consumo de O₂ por aminoacetona (AA) na presença ou ausência de íons de Fe(II) e Cu(II). **(A)** Consumo de O₂ por aminoacetona em meio de cultura RPMi 1640 suplementado com 10% de soro. **(B)** Consumo de O₂ por aminoacetona em meio de cultura RPMi 1640 sem soro. As concentrações utilizadas estão indicadas na figura. O experimento foi realizado a 37°C durante 30 min. O resultado apresentado é uma amostra de ao menos 3 experimentos independentes.

A alternativa foi explorar a eficácia de Cu(II) como promotor coadjuvante de morte celular. Sua adição ao meio de cultura aumentou o poder pró-oxidante da aminoacetona contra as culturas de células RINm5f. Estabelecido que no meio de cultura apenas Cu(II) catalisa a oxidação da aminoacetona, foram realizados novamente experimentos, desta vez na ausência de soro, estabelecendo uma relação dose-dependência entre aminoacetona e Cu(II) (Figura 11A e 11B).

As concentrações de aminoacetona e Cu(II) que levam a queda de viabilidade celular foram menores do que as empregadas em meios suplementados com soro: aminoacetona 0,10-1,0 mM e Cu(II) 100 μM (Figura 11A) ou aminoacetona 1,0 mM e Cu(II) 5,0-100 μM (Figura 11B). Ainda na Figura 11, é apresentado um controle do íons de Cu(II) quando adicionados as culturas de células RINm5f na ausência da aminoacetona (figura 11C). Como a atividade pró-oxidante do sistema

aminoacetona/Cu(II) é dependente de concentração, pode-se propor que, no diabetes, uma continua exposição das células produtoras de insulina e até mesmo das Ilhotas de Langerhans a baixas concentrações da aminoacetona e Cu(II) possa causar efeito similar ao apresentado *in vitro*, prejudicando as funções destas células.

O mecanismo mais provável da oxidação da aminoacetona catalisada por Cu(II) é o proposto por Hiraku e colab. (1999), diferentemente do mecanismo proposto para a oxidação da aminoacetona por íons de Fe(II) (Dutra *et al.*, 2001). Neste caso, íons de Cu(II) podem gerar ânion radical superóxido ao reagir com a aminoacetona e o oxigênio molecular e, dessa maneira, propagar a formação de radical enoil e H₂O₂ (Esquema 4). Na presença de Cu(II), a aminoacetona seria primeiramente oxidada pelo Cu(II), gerando o radical enoil e Cu(I). O oxigênio pode ser reduzido ao ânion radical superóxido por Cu(I) ou via dois elétrons, um oriundo do Cu(I) e outro do radical enoil, gerando H₂O₂. No primeiro caso, o ânion radical superóxido formado propagará a oxidação da aminoacetona até seus produtos finais, enquanto no segundo, o H₂O₂ formado provavelmente realizará a reação de Fenton com os íons de Cu(I) presentes na reação, gerando um oxidante muito forte: o radical hidroxila.

Figura 11: Efeito da concentração da aminoacetona (AA) na presença de Cu(II). **(A)** Células RINm5f tratadas com aminoacetona 0,10-1,0 mM na presença ou ausência de Cu(II) 100 μ M. **(B)** Células RINm5f tratadas com aminoacetona 1,0 mM na presença ou ausência de Cu(II) 5,0-100 μ M **(C)** Controles de células RINm5f tratadas somente com íons de Cu(II) 5,0-100 μ M. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$ em relação às células controle e # $p < 0,05$ em relação às células tratadas apenas com aminoacetona.

4.8 - Testes com antioxidantes em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona na ausência de soro fetal bovino

Íons de Cu(II) e Fe(III) podem oxidar $O_2^{\bullet-}$ a O_2 , gerando desta maneira íons Cu(I) e Fe(II) que, juntamente com o H_2O_2 , irão amplificar a reação de Fenton. Por isso, espera-se que a adição de SOD e catalase iniba a morte celular induzida por aminoacetona. Já a *N*-acetilcisteína (NAC) é muito utilizada em diversos experimentos como antioxidante, pois pode se difundir através da membrana celular e seqüestrar várias espécies oxidantes como: HOCl, ONOOH, $RO_2^{\bullet}$, $OH^{\bullet}$ e H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2007). NAC é reconhecidamente um inibidor da oxidação de tióis, além de ser um precursor do antioxidante endógeno glutathiona (GSH) (Cotgreave, 1997).

De posse destas informações, células RINm5f foram incubadas com aminoacetona 5,0 mM na presença de SOD (50 U/mL), catalase (5,0 μ M) e NAC (5,0 mM) e também incubadas com aminoacetona 1,0 mM na ausência ou presença de Cu(II) 100 μ M, e dos antioxidantes já citados, além do quelante de íons de Cu(I) batocuproína (Laggner et al., 2006), com o objetivo de verificar a intermediação de EROs na viabilidade celular (Figura 12):

Como apresentado nas figuras 12A e 12B, catalase foi o antioxidante mais eficiente, pois em ambos os casos, células tratadas apenas com aminoacetona 5,0 mM ou tratadas com aminoacetona 1,0 mM na presença de Cu(II) 100 μ M, houve total proteção, enquanto que SOD e NAC promoveram proteção significativa apenas em células tratadas somente com aminoacetona.

Nossos resultados estão de acordo com os apresentados na literatura, onde a oxidação química ou enzimática da aminoacetona produz espécies reativas, as quais levam a danos oxidativos em proteínas, mitocôndrias, DNA e lipídios (Dutra *et al.*, 2005; Dutra e Bechara, 2004; Dutra *et al.*, 2003; Hiraku *et al.*, 1999).

Quando se usou o sistema aminoacetona/Cu(II), a catalase eliminou o H₂O₂ gerado, impedindo dessa maneira a reação de Fenton com Cu(I). Batocuproína, um quelante para íons Cu(I) (Laggner *et al.*, 2006), mostrou-se eficaz, inibindo a ação deletéria da aminoacetona ao, provavelmente, impedir que íons Cu(I) reagissem com H₂O₂, gerando radicais hidroxila. Este experimento mostra que a formação de íons Cu(I) no sistema é primordial para a exacerbação do efeito pró-oxidante da aminoacetona sobre as culturas de células produtoras de insulina. Interessante notar que o efeito específico da batocuproína pode ser apreciado visualmente, pois quando Cu(I) é quelado pela batocuproína o meio reacional fica alaranjado. Ao final do experimento de 24 h, os meios de cultura onde se encontravam batocuproína, aminoacetona e Cu(II) tornaram-se alaranjados.

Quanto à ineficácia da SOD, pode-se pensar que houve alta produção de radical hidroxila, o qual pode inativar a atividade da SOD (Sato *et al.*, 1992). Quanto à NAC, a molécula tem sido apontada como um promissor agente anticarcinogênico e antígeno tóxico (Jayalakshmi *et al.*, 2005; Agarwal *et al.*, 2004), em virtude de sua alta capacidade de seqüestrar radicais hidroxila (Morley *et al.*, 2003). Na presença de Cu(II), porém, a NAC agiu como um pró-oxidante. Outros trabalhos, como Oikawa e colab. (1999) e Su e colab. (2006) também observaram um efeito pró-oxidante de NAC na presença de íons de metais de transição. Assim como o proposto para a reação entre íons de Cu(II) e cisteína (Munday *et al.*, 2003; Kachur *et al.*, 1998), propõe-se que a

NAC na presença de metais de transição, principalmente Cu(II), possa gerar $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $OH^{\bullet}$ e radical tiila. NAC reage com Cu(II) através de um mecanismo parecido com o do ascorbato, onde Cu(II) receberia um elétron da molécula de NAC, sendo reciclado a seu estado reduzido Cu(I), e o radical tiila de NAC formaria dímeros dissulfeto. Conseqüentemente o íon Cu(I) poderia gerar radicais hidroxila através da reação de Fenton com o H_2O_2 (Esquema 8). Há controvérsias quanto a este mecanismo, pois Kachur e colab. (1998) demonstraram que a reação entre NAC e Cu(II) é iniciada por pelo complexo de Cu(II) com o ânion mercapteto da NAC (Esquema 9), tendo como produtos finais H_2O_2 e ácido sulfônico da NAC (representado por RSO_3H no Esquema 9). Essa proposta acontece em duas fases distintas relativas ao consumo de oxigênio molecular e produção de radical hidroxila: na primeira a velocidade de consumo de oxigênio é constante e a produção de radical hidroxila é baixa, enquanto na segunda fase há uma diminuição na velocidade de consumo de oxigênio, porém gerando maior concentração de radical hidroxila. Essa proposta foi verificada e aceita mais tarde (Munday *et al.*, 2003). Em qualquer caso, entretanto, há produção de íons de Cu(I), $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $OH^{\bullet}$.

Estes resultados reforçam nossa proposta de que, na condição diabética, onde a descarga de ferro e cobre “livres” é elevada (Zheng *et al.*, 2008), a produção da aminoacetona é elevada, com concomitante aumento da atividade de SSAO (Boomsma *et al.*, 2005), e a mobilização de aminoácidos gerando maior concentração de metilglioxal também é exacerbada (Thornalley, 1996), a combinação da aminoacetona com íons de metal de transição pode conduzir a um efeito citotóxico de aminoacetona

às células produtoras de insulina. Novamente enfatizamos que as concentrações de reagentes utilizadas nestes experimentos estão certamente muito acima das fisiológicas, porém deve-se levar em conta que a reação é limitada pela concentração local de oxigênio molecular e conseqüentemente do fluxo de radicais hidroxilas que lesam as células devido à competição com outras moléculas redutoras presentes no meio de cultura, como glicose, vitaminas, albumina e globulinas.

Figura 12: Viabilidade de células RINm5f em cultura, tratadas com aminoacetona (AA) na ausência ou presença de Cu(II). **(A)** Culturas de células tratadas com aminoacetona 5,0 mM na ausência ou presença de antioxidantes. Concentrações indicadas no histograma. **(B)** Culturas de células tratadas com aminoacetona (1,0 mM), Cu(II) (100 μM) e com o sistema aminoacetona/Cu(II), na presença ou ausência de antioxidantes. Concentrações são indicadas no histograma. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$ em relação às células controle e # $p < 0,05$ em relação às células tratadas com o sistema aminoacetona/Cu(II).

Esquema 8: Mecanismo proposto para o efeito pró-oxidante de NAC na presença de íons de metal de transição. Adaptado de Oikawa e colab. (1999).

Esquema 9: Mecanismo proposto para a catálise de Cu(II) na oxidação de NAC. 1° fase (linhas sólidas), 2° fase (linhas tracejadas). (Reproduzido de Kachuer *et al.*, 1998). As porcentagens de 40 e 60% correspondem ao total de oxigênio consumido em cada fase.

4.9 – Ensaio comparativo da ação citotóxica da aminoacetona em culturas de células *beta* (RINm5f) e fibroblastos (NIH-3T3)

Reconhecidamente células *beta* e ilhotas pancreáticas possuem os níveis de defesas antioxidantes mais baixos que os de outras células (Lenzen, 2008; Tiedge *et al.*, 1997; Grankvist *et al.*, 1981) e por isso, a região endócrina do pâncreas deve ser um tecido altamente susceptível ao estresse oxidativo. Com o intuito de comparar a susceptibilidade de células RINm5f com a de fibroblastos (linhagem NIH-3T3), realizou-se um experimento onde fibroblastos e células *beta* foram desafiados paralelamente por aminoacetona durante 24 h de tratamento (Figura 13).

Os resultados confirmam que de fato, células produtoras de insulina são mais sensíveis ao ataque de radicais livres, em comparação as culturas de fibroblastos estudados nesta tese, pois a adição da aminoacetona 5,0 mM promoveu um decréscimo da viabilidade celular em torno de 80% para as linhagens RINm5f, enquanto, a mesma concentração promoveu aos fibroblastos um decréscimo da viabilidade celular em torno de 40%.

Este resultado sugere que embora a atividade de SSAO e talvez a produção da aminoacetona num estado clínico como o diabetes sejam mais elevadas em outros tecidos, é no pâncreas que a produção da aminoacetona provavelmente surtirá um efeito mais prejudicial.

Figura 13: Tratamento de fibroblastos (NIH-3T3) e células *beta* (RINm5f) com aminoacetona (AA) 5,0 mM durante 24 h. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma quadruplicata. * $p < 0,05$ em relação às células-controle.

4.10 – Medidas da expressão gênica de enzimas antioxidantes (catalase, CuZnSOD, MnSOD, GRd e GPx) de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

Resultados anteriores mostraram que H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e outros radicais como o radical enoila são gerados durante a oxidação aeróbica da aminoacetona (Dutra *et al.*, 2001). Dessa maneira, era esperado que células RINm5f tratadas com aminoacetona/Cu(II) em concentrações de Cu(II) abaixo das utilizadas nos experimentos de viabilidade celular, durante um curto tempo de exposição, fossem induzidas a um aumento da expressão de enzimas antioxidantes.

As figuras (14a-14e) apresentam os níveis de expressão das enzimas antioxidantes catalase, CuZnSOD, MnSOD, GRd e GPx, em relação às células-controle, não tratadas. Vale ressaltar que, apesar de a catalase não apresentar um aumento significativo de expressão em relação ao controle, até mesmo no tratamento mais agudo, a GPx apresentou um aumento de aproximadamente 50 vezes, o que demonstra fortemente a participação de H_2O_2 na morte celular, já discutida nos experimentos de adição de antioxidantes exógenos. Está fartamente documentado na literatura que a GPx é primeira fonte de defesa da célula contra o H_2O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2007; Röhrdanz *et al.*, 2001).

Vale também destacar que as expressões de CuZnSOD e de MnSOD foram aumentadas, o que sugere a participação de $O_2^{\bullet-}$ e uma maior produção de radicais livres pela mitocôndria, o que levaria a uma hiperpolarização da membrana mitocondrial provavelmente devido a uma resposta da mitocôndria às condições de estresse a que as células foram submetidas, como apresentado por Choi e colab. (2009) onde neuroblastomas apresentaram um aumento de espécies reativas oriundas da mitocôndria e conseqüentemente hiperpolarização da membrana mitocondrial após serem tratados com H_2O_2 .

Esses dados reforçam a hipótese de que a aminoacetona, gerada na mitocôndria, age como uma toxina endógena, sendo capaz de, mesmo não enzimaticamente, promover danos oxidativos às biomoléculas e organelas das células produtoras de insulina.

Figura 14: Expressão do mRNA de enzimas antioxidantes (catalase, CuZnSOD, MnSOD, GRd e GPx) em células RINm5f tratadas com aminoacetona (AA) e Cu(II) em meio sem soro. **(A)** catalase, **(B)** CuZnSOD, **(C)** MnSOD, **(D)** GRd e **(E)** GPx. As concentrações utilizadas são apresentadas nos histogramas. As condições do experimento estão descritas na seção 3.2.7 de Materiais e Métodos. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação às células controle.

4.11 – Medidas da atividade da catalase, SOD (CuZnSOD + MnSOD), GRd e GPx de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

As células *beta* são reconhecidamente pobres em relação à proteção antioxidante (Lenzen, 2008). Trabalhos envolvendo a super-expressão gênica e atividade das proteínas antioxidantes em células *beta* são de grande importância para entender até que ponto estas células, aparentemente tão frágeis do ponto de vista das defesas antioxidantes são susceptíveis ao estresse oxidativo (Sigfrid *et al.*, 2004; Lortz e Tiedge, 2003).

No item anterior foi mostrado que as expressões das enzimas antioxidantes aumentavam quando as células eram submetidas ao tratamento com o sistema aminoacetona/Cu(II). É importante também avaliar proteínas totais e atividade para verificar se houve tradução do mRNA e ativação da proteína. Desse modo foram realizadas as medidas de atividade da catalase, SOD (CuZnSOD + MnSOD), GRd e GPx. O resultado é apresentado na Figura 15:

Figura 15: Medidas da atividade de catalase, SOD (CuZnSOD + MnSOD), GRd e GPx em lisados de células RINm5f tratadas com aminoacetona AA – **(A)** catalase, **(B)** SOD total (CuZnSOD + MnSOD), **(C)** GRd e **(D)** GPx. O procedimento para obtenção dos resultados está descrito na seção 3.2.8 de Materiais Métodos. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma triplicata. * $p < 0,05$ em relação às células-controle.

4.11.a – Catalase - Foi mostrado que algumas enzimas antioxidantes têm suas expressões gênicas aumentadas devido ao tratamento com aminoacetona/Cu(II). Considerando-se que no caso da catalase apenas houve uma tendência ao aumento da

expressão gênica das células tratadas com aminoacetona/Cu(II) em relação ao controle, de fato não se esperava aumento na atividade da catalase nas culturas.

Trabalhos na literatura mostram que células *beta* submetidas a estresse oxidativo, têm sua viabilidade aumentada quando catalase é super-expressa (Lortz e Tiedge, 2003) e ratos resistentes à administração de aloxano possuem atividades mais altas da catalase se comparado a ratos mais susceptíveis à droga (Behr *et al.*, 2008). Estes dados conferem importante papel da enzima como mecanismo de defesa celular contra EROs.

Como apresentado na figura 15(A), não há aumento na atividade de catalase nos lisados de células submetidas ao tratamento com aminoacetona/Cu(II), tal como foi reportado para as medidas de expressão gênica para catalase, talvez por estar localizada em uma organela subcelular (peroxissomo) (Halliwell e Gutteridge, 2007) e dessa maneira participar de uma forma menos efetiva frente à adição da aminoacetona/Cu(II) as culturas. Porém catalase adicionada exogenamente conferiu proteção a estas células, o que sugere que apesar de não “participar” na proteção as culturas quando desafiadas por aminoacetona, a super-expressão de catalase no citoplasma, promoveria significativo efeito protetor, tal como demonstrado por Lortz e Tiedge (2003).

4.11.b – Superóxido Dismutase (CuZnSOD + MnSOD) - As células tratadas com aminoacetona/Cu(II), além de expressarem mais CuZnSOD e MnSOD em relação às

células-controle, apresentam atividade de SOD total maior. Isto é interessante, pois podemos ligar este resultado com a produção aumentada de $O_2^{\bullet-}$ na célula *beta*.

Sabe-se que, em estado de hiperglicemia, o potencial de membrana mitocondrial é aumentado devido à elevada concentração de doadores de elétrons (NADH e $FADH_2$) que são produzidos e/ou transportados até a mitocôndria, gerando dessa forma alta concentração de ATP, proporcionando dessa forma uma hiperpolarização da membrana desta organela (Brownlee, 2001).

Há relatos de que H_2O_2 e metilglioxal são responsáveis por danificar mitocôndrias de células produtoras de insulina (Maechler *et al.*, 1999; Cook *et al.*; 1998), e já se mencionou que aminoacetona também é lesiva a mitocôndrias isoladas de fígado de rato (Dutra e Bechara, 2004). Os níveis de expressão gênica da MnSOD, aumentados em cerca de 10 vezes, indicam que o tratamento das culturas com aminoacetona/Cu(II) de alguma forma afeta a mitocôndria e o aumento de atividade total da SOD pode estar ligado a uma grande contribuição da MnSOD. É relevante citar que muitos trabalhos da literatura demonstram que, de fato, as mitocôndrias de células produtoras de insulina são os principais alvos da hiperglicemia no diabetes (Rolo e Palmeira, 2006; Maechler e de Andrade, 2006) e que a disfunção destas organelas levaria a uma inibição da produção de insulina (Maechler *et al.*; 2006).

Por outro lado, sabe-se que o produto de oxidação da aminoacetona, o metilglioxal, além de ser um agente de glicação, também estimula a produção de espécies reativas, dentre elas o $O_2^{\bullet-}$, através da formação das AGEs (Tan *et al.*, 2007).

Além disso, estudos recentes apontam para a ativação da NADPH oxidase pelo metilglioxal e H_2O_2 em células endoteliais e células mesangiais renais, respectivamente

(Ho *et al.*, 2007; Coyle *et al.*; 2006). Dessa maneira supõe-se que uma vez administrada aminoacetona/Cu(II) às culturas, além do $O_2^{\bullet-}$ gerado na oxidação da aminoacetona, metilglioxal e H_2O_2 possam ativar a NADPH oxidase e assim exacerbar a produção de $O_2^{\bullet-}$ intracelularmente. Além disso, pode-se aventar que o radical enoila de aminoacetona possa ser um doador de elétrons ao citocromo *c*, promovendo hiperpolarização da membrana mitocondrial. Assim grande fluxo de $O_2^{\bullet-}$ é estimulado, proporcionando elevada expressão gênica da CuZnSOD e MnSOD e ativação destas enzimas.

4.11.c – Glutathione Redutase - Sabe-se que glutathione reduzida atua como antioxidante biológico (van Haaften *et al.*, 2003) e que há uma importante participação da GRd na proteção às células *beta* (Zhu *et al.*, 2007; Nagaoka *et al.*, 2004). No estudo de expressão gênica de GRd, observou-se aumento significativo quando as células foram desafiadas por aminoacetona/Cu(II). No entanto, os resultados de atividade enzimática quase inalterada sugere que o sistema aminoacetona/Cu(II) pode induzir inibição da tradução e/ou atividade da GRd. Trabalhos na literatura mostram que $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e MG causam a depleção de GSH (Han *et al.*, 2008; Baigi *et al.*, 2008; Beard *et al.*, 2003; Braun *et al.*, 1994), o que poderia estar relacionado a uma inibição da tradução/atividade da GRd (Vander Jagt *et al.*, 1997). A diversidade de produtos do tratamento das culturas com aminoacetona/Cu(II) pode estar implicada no mecanismo de produção de GSH e, por consequência, na expressão gênica e atividade da GRd.

4.11.d – Glutathione Peroxidase - A GPx teve a maior expressão gênica observada em relação ao controle, cerca de 50 vezes entre as todas as enzimas antioxidantes medidas nas culturas de células RINm5f desafiadas por aminoacetona/Cu(II). Este resultado aponta para a GPx como responsável pelo principal mecanismo de defesa antioxidante contra a ação deletéria de aminoacetona/Cu(II), provavelmente por eliminar o H_2O_2 gerado, impossibilitando assim a formação do $OH^\bullet$, além de eliminar os peróxidos lipídicos (Robertson e Harmon, 2007).

Alguns estudos elegeram a GPx como um dos principais alvos relacionados a mecanismos de proteção antioxidante de células *beta* (Moriscot *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2002).

Paralelamente, observou-se que a atividade da GPx praticamente dobra nas células tratadas em relação ao controle, corroborando os resultados anteriores de expressão gênica.

Em resumo, os resultados apresentados de atividade da SOD (CuZnSOD + MnSOD), catalase, GRd e GPx nas células desafiadas com aminoacetona/Cu(II) revelaram não apenas aumento da expressão gênica de suas defesas antioxidantes, mas também requereram, principalmente, SOD e GPx em níveis pós-tradução, sugerindo que a indução de morte celular (provavelmente por apoptose) deve-se a um alto grau de estresse oxidativo ocasionado pelo sistema AA/Cu(II).

4.12 - Quantificação de GSH em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

Há consenso na literatura de que o metilglioxal seja detoxificado pelo ciclo das glioxalases (Kalapos, 1999b), o qual consome GSH. Além disso, o metilglioxal vem sendo associado à inibição da GRd e GPx (Wang *et al.*, 2004; Vander Jagt *et al.*, 1997). Devido ao aumento observado de expressão gênica e atividades das enzimas antioxidantes, foi importante medir concentrações de GSH nas culturas tratadas com aminoacetona/Cu(II) (Figura 16).

Consistentemente com a literatura que apontam o metilglioxal e H₂O₂ como agentes depletores de GSH, notou-se que o nível mais baixo de GSH foi observado nos tratamentos das culturas com aminoacetona/Cu(II) e Cu(II). Apesar de a aminoacetona 1,0 mM não causar decréscimo na viabilidade celular, resultou em alterações no metabolismo envolvendo a produção e consumo de GSH, evidenciados pela maior expressão gênica (relativo ao controle) de GRd e GPx em células submetidas ao mesmo tratamento.

Outro resultado interessante, embora esperado, é a depleção de GSH em culturas tratadas somente com Cu(II). Como apresentado nos esquemas 8 e 9, íons de Cu(II) na presença de *N*-acetilcisteína podem gerar O₂^{•-} e serem reduzidos a Cu(I) que na presença de H₂O₂, realiza a reação de Fenton. Essa reação também ocorre com GSH que, na presença de íons Cu(II), é oxidada a GSSG e gera O₂^{•-} (Roy *et al.*, 2009). Além disso, alguns trabalhos na literatura demonstram a toxicidade de íons de cobre a

células neuronais e fibroblastos, ativando a proteína supressora de tumor, p53, e a células HepG2, ativando a NFκB (McElwee *et al.*, 2009; Du *et al.*, 2008). Ratos tratados com estreptozozina e íons de cobre sofreram aumento de hemoglobina glicada, peroxidação lipídica, níveis de AGEs e depleção dos níveis de GSH (Civelek *et al.*, 2009). Estudos mais antigos demonstraram que GSH pode quelar íons de cobre em células hepáticas (Freedman *et al.*, 1989).

Figura 16: Níveis de GSH em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona (AA) na presença ou ausência de Cu(II). As concentrações aminoacetona e Cu(II) estão indicadas na figura. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma triplicata. * $p < 0,05$ em relação às células controle e # $p < 0,05$ em relação ao tratamento com AA 1,0 mM.

Nossos dados e a literatura citada podem, assim, explicar um baixo nível de GSH nas células tratadas com Cu(II) (50 µM) e demonstrar que cobre não apenas atua como catalisador da oxidação de aminoacetona a intermediários e produtos citotóxicos, mas também atua diretamente como sequestrador de poder redutor na forma de GSH.

4.13 – Medidas da produção de NO por citometria de fluxo de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

Sabe-se hoje que, em situações de acúmulo de glicose, células *beta* produzem mais $O_2^{\bullet-}$ tanto pelo complexo (III) da mitocôndria (Brownlee, 2005), quanto através da ativação da NADPH oxidase (Newsholme *et al.*, 2007). É, portanto provável que haja subsequente formação instantânea do ânion peroxinitrito, um agente mais oxidante do que NO e $O_2^{\bullet-}$, através da reação de ambos os radicais ($k = (6,9 - 19) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), (Kissner *et al.*, 1997; Huie e Padmaja, 1993).

Trabalhos na literatura associavam o NO com os danos a ilhotas e células *beta* tratadas com citocinas (Nakata *et al.*, 1999). Estes resultados estão agora sendo revistos e atribuídos à formação do peroxinitrito no sistema (Lakey *et al.*, 2001; Suarez-Pinzon *et al.*, 2001). Hohmeier e colab. (1998) relataram proteção das células *beta* propiciada por citocinas, através da superexpressão da MnSOD, e Sousa e colab. (2008) observaram citoproteção quando células *beta* são tratadas com citocinas pró-inflamatórias associada com o aumento da expressão da MnSOD em relação ao controle.

O aumento observado nesta tese da expressão do mRNA da MnSOD e da atividade da SOD (CuZnSOD + MnSOD) no tratamento das células RINm5f com aminoacetona/Cu(II) (itens 4.10-4.11), sugere que um dos alvos dos produtos de oxidação da aminoacetona, inclusive do radical enoila deste catabolito, é a mitocôndria.

Com o aumento do consumo de oxigênio e conseqüente produção de $O_2^{\bullet-}$, e sendo a NADPH oxidase ativada por H_2O_2 e MG (Ho *et al.*, 2007; Coyle *et al.*, 2006), é muito provável a produção concomitante de peroxinitrito em culturas de células tratadas com aminoacetona.

Os resultados relativos à produção de NO pelas células tratadas com aminoacetona são apresentados na Figura 17. Foi demonstrado que aminoacetona/Cu(II) aumenta a produção de NO e, portanto, participação do peroxinitrito nos danos causados por aminoacetona às células RINm5f e às células *beta* pancreáticas não pode ser descartada. Restava verificar se o aumento observado de NO no tratamento com aminoacetona/Cu(II) deveu-se a uma ativação pós-traducional da NO sintase ou se houve de fato um aumento da expressão gênica desta proteína com/sem tradução.

Figura 17: Produção de NO por células RINm5f tratadas com aminoacetona (AA) na ausência ou presença de Cu(II). **(A)** Produção de NO após 2 horas de tratamento na ausência de soro. **(B)** Produção de NO após 2 horas de tratamento em meio de cultura sem soro mais 22 horas em meio de cultura suplementado com soro. Nos histogramas: **(a)** controle, **(b)** Cu(II) 100 μ M, **(c)** aminoacetona 1,0 mM e **(d)** aminoacetona 1,0 mM/Cu(II) 100 μ M. Os histogramas são representativos de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma triplicata.

4.14 – Medidas da expressão gênica da iNOS em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

Diante do já exposto no item anterior, realizou-se medidas da expressão gênica da iNOS em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona na ausência ou presença de íons Cu(II). O resultado obtido é apresentado na figura 18.

Figura 18: Medidas da expressão gênica da iNOS em culturas de células RINm5f tratadas com AA – **(A)** 10 minutos de tratamento, **(B)** 1 hora de tratamento, **(C)** 2 horas de tratamento e **(D)** 24 horas de tratamento. O procedimento para obtenção dos resultados está descrito na seção 3.2.7 de Materiais e Métodos. As concentrações utilizadas são indicadas na figura. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. Cada experimento representa ao menos uma triplicata. * $p < 0,05$ em relação às células controle.

Nota-se que, em apenas 10 min de exposição das culturas ao sistema aminoacetona/Cu(II), houve um aumento considerável da expressão gênica da iNOS, em torno de 50 vezes, mas que diminuiu rapidamente até ficar abaixo da expressão do controle. Em 24 h já aparecia relativamente maior. Este resultado é, em parte, coerente com o de aumento de NO mostrado no item anterior e com a indução da expressão da iNOS em culturas de células de aorta vasculares de músculo liso tratadas com aminoacetona, relatada por Dhar e colab. (2008).

O mais surpreendente foi a expressão gênica da iNOS em apenas 10 min de exposição das células RINm5f à aminoacetona. Tal resposta de expressão gênica da iNOS em tão poucos minutos aparentemente não tem precedentes na literatura, porém Kolodziejski e colab. (2004) demonstraram que o tempo de meia-vida desta enzima é relativamente baixo, em torno de 1,6 h, o que poderia explicar a queda na expressão gênica e provável utilização da enzima pós tradução.

Segundo Aktan (2004), a ativação do fator de transcrição NF- κ B reflete a expressão gênica da iNOS em respostas imunes e inflamatórias. Sabendo-se que tanto H₂O₂ como Cu(II) são capazes de ativar NF- κ B (McElwee *et al.*, 2009, Bowie e O'Neill, 2000) e assim ativar a expressão gênica da iNOS, poder-se-ia explicar assim o aumento de expressão gênica de Cu(II), aminoacetona e aminoacetona/Cu(II) no tempo de 24 h (Figura 18D).

É interessante notar que culturas tratadas com Cu(II) tiveram significativo aumento da expressão gênica da iNOS ao longo do tempo, enquanto culturas tratadas exclusivamente com aminoacetona e com o sistema aminoacetona/Cu(II) tiveram o mesmo comportamento. A resposta de expressão gênica foi suprimida nas células tratadas com aminoacetona em 2 h de tratamento e com aminoacetona/Cu(II) em uma

hora de tratamento, encaixando-se, portanto, dentro do tempo de meia-vida da enzima (1,6 h; Kolodziejewski *et al.*, 2004) e de acordo com a possível inibição da expressão gênica da iNOS associada ao acúmulo de NO (Conelly *et al.*, 2001).

Depois de 24 h houve aumento da expressão gênica em ambos os tratamentos. Deve-se notar que, após 2 h de tratamento as culturas têm de ser transferidas para um meio suplementado com soro. Nestas condições, detectou-se baixa a atividade da SOD, GPx e GRd em relação à expressão gênica e a expressão gênica da iNOS, após 24 h (mesmo significativamente acima do controle) foi baixa em relação ao mesmo tratamento em 10 minutos. Estas oscilações podem estar sinalizando que as células sobreviventes ao estresse oxidativo se restabeleceram, porém com estoques maiores do RNA mensageiro para enzimas antioxidantes e menores para iNOS.

Contudo pode-se estabelecer uma relação entre a produção de NO (Figura 17) e a expressão gênica da iNOS (Figura 18), embora não se compreenda é o aumento de expressão gênica em 10 minutos de tratamento. Qual via de sinalização a aminoacetona/Cu(II) dispara para que a iNOS tenha seu RNA mensageiro expresso em tão pouco tempo e por quê as culturas têm a expressão gênica da iNOS inibida em 1 h (aminoacetona apenas) e 2 h (aminoacetona/Cu(II)) para depois voltarem a expressar o mRNA para iNOS passadas 24 h de tratamento? Para responder estas perguntas seriam necessários outros experimentos como, por exemplo, *Western blotting* de iNOS, para verificar se há proteína traduzida nos tempos estudados para a expressão gênica, bem como testes de expressão gênica do NF- κ B e estudos a níveis pré- e pós-traducionais da expressão gênica da iNOS.

4.15 – Expressão gênica de proteínas pró- (Bax) e anti- (Bcl-2) apoptóticas em culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

Segundo a literatura metilglioxal ou H_2O_2 podem desencadear processos necróticos ou apoptóticos (Nakamura *et al.*, 2006; Sheader *et al.*, 2001). Como aminoacetona é geradora destes dois metabolitos, torna-se importante discriminar o tipo de morte celular que ocorre às células RINm5f tratadas com este composto, na ausência ou presença de Cu(II).

Para tanto, realizou-se medidas da expressão do mRNA de proteínas anti- (Bcl-2) e pró-apoptóticas (Bax) em células RINm5f tratadas com aminoacetona e com o sistema aminoacetona/Cu(II). A razão de expressão gênica destas proteínas poderia determinar a sobrevivência das células, pois um aumento da expressão gênica de Bax em relação à Bcl-2 acarretaria em morte celular (Yuen *et al.*, 2001).

Apoptose ou morte celular programada é um evento disparado por sinais químicos ou estimulado por agentes internos (Zamzami *et al.*, 1997). Em ambos os casos, a apoptose ocorre através de uma ordenada cascata de reações enzimáticas iniciada pelos membros da família de proteínas Bcl-2 (Tsujimoto e Shimizu, 2000). Alguns membros desta família como a proteína Bcl-2 e a proteína Bcl-xL, inibem a apoptose, no entanto outra proteína desta mesma família, Bax, acelera o processo apoptótico (Yuen *et al.*, 2001). A proteína Bax é localizada no citoplasma, mas durante o processo apoptótico, sofre oligomerização e se insere na membrana interna da mitocôndria liberando o citocromo *c* no espaço intermembranas, seguido de ativação de caspases e por último morte celular (Lalier *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 1999).

As células tratadas com o sistema aminoacetona (1,0 mM)/Cu(II) (100 μ M), durante 24 h apresentaram um aumento da expressão de Bax quase que 10 vezes maior do que Bcl-2 (Figura 19). Na verdade, a expressão do mRNA da Bcl-2 pareceu ser suprimida neste caso, ao se comparar os resultados obtidos com as células controle. Vale notar ainda que, no tratamento com apenas aminoacetona, houve um aumento considerável da expressão do mRNA de ambas as proteínas, mostrando que, apesar de nestas condições não haver morte celular significativa, a célula gasta energia para sua proteção, ativando sua maquinaria de defesa, levando a um aumento da expressão do mRNA de Bcl-2 e também de algumas enzimas antioxidantes como GRd e GPx. Vale ressaltar que experimentos relatados na literatura mostram que a super-expressão de Bcl-2 em culturas de células NT-2 (teratocarcinoma) e SK-N-MC (neuroblastoma) impediram a morte celular promovida por EROs e ERNs (Lee *et al.*, 2001). Quanto à supressão da expressão gênica da proteína Bcl-2 em células tratadas com aminoacetona/Cu(II), foi demonstrado que o mesmo ocorre com células H460 (células epiteliais de pulmão humano) quando desafiadas com cisplatina, um agente terapêutico gerador de EROs, utilizado no tratamento de vários tipos de câncer (Wang *et al.*, 2008). A supressão da expressão gênica da Bcl-2 foi evitada super-expressando GPx ou tratando as culturas com catalase exógena, o que confirma a participação do H₂O₂ como agente causador da supressão da expressão gênica da Bcl-2 nestas culturas.

Pode-se então levantar a hipótese de que as células *beta* de um indivíduo diabético, gerando doses pequenas, porém diárias da aminoacetona, sofrerão desgaste oxidativo e, mais tarde, a perda de função e morte. Assim, este experimento sugeriu que aminoacetona, na presença de Cu(II), resulta na apoptose das células RINm5f.

Figura 19: Expressão do mRNA de proteínas pró (Bax)- e anti (Bcl-2)-apoptóticas em células RINm5f tratadas com aminoacetona (AA) (1,0 mM) na ausência ou presença de Cu(II) (100 µM). O tempo do tratamento foi de 24 h. O mRNA foi medido por RT-PCR quantitativo e expresso em número de vezes em relação ao controle. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação à expressão do mRNA de Bcl-2.

4.16 – Fragmentação do DNA de culturas de células RINm5f induzida pelo tratamento com aminoacetona

Nos experimentos de fragmentação do DNA, foi utilizada uma sonda - o iodeto de propídeo (IP) - que pode se inserir entre as bases do DNA modulando a intensidade de fluorescência de acordo com sua concentração (Arndt-Jovin e Jovin, 1989). Pouca fragmentação atesta que o DNA está intacto, pois maior intensidade de fluorescência indica que há mais IP acumulado. Similarmente aos resultados apresentados por Hiraku e colab. (1999), foi demonstrado que células HL60 tratadas com aminoacetona/Cu(II) sofrem fragmentação do DNA, células RINm5f tratadas com aminoacetona (1,0

mM)/Cu(II) (100 μ M) também apresentaram quatro vezes mais fragmentação ($34 \pm 5\%$) do que as células-controle ($8 \pm 1\%$) e, significativamente, maior índice de fragmentação

Figura 20: Fragmentação do DNA de células RINm5f tratadas com aminoacetona (AA)/Cu(II) na ausência de soro. O tratamento foi de 24 h e as concentrações estão indicadas nos gráficos. **(A)** Histogramas representando a intensidade de fluorescência do IP em células tratadas com aminoacetona na ausência ou presença de Cu(II). **(B)** Gráfico de barras, apresentando os níveis de fragmentação (número de vezes em relação ao controle) dos resultados apresentados na figura 20A. Todos os valores representam a média de ao menos 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação aos resultados das células controle.

do DNA se comparado às células tratadas exclusivamente com Cu(II) ($10 \pm 4\%$) e aminoacetona ($13 \pm 7\%$), Figura 20, confirmando assim os resultados apresentados no item anterior. Por fim, estes achados são consistentes com a literatura, quando descreve que espécies reativas de oxigênio e metilglioxal causam danos ao DNA, levando à apoptose (Su *et al.*, 2006; Kim e Kang, 2006; Kang, 2003).

4.17 – Medidas do fluxo intracelular de cálcio de culturas de células RINm5f tratadas com aminoacetona

A homeostase do cálcio intracelular é controlada pelo influxo/efluxo do íon através da membrana plasmática e pela capacidade de as organelas o seqüestrarem e estocá-lo. Uma delicada perturbação neste balanço pode levar a um aumento considerável da concentração do cálcio intracelular, conduzindo à fragmentação do DNA e morte celular (Orrenius *et al.*, 1989). As espécies reativas geradas na oxidação da aminoacetona como metilglioxal e H_2O_2 são conhecidas por promover poros a membrana plasmática, favorecendo assim um aumento abrupto do influxo de íons cálcio (Nakazaki *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 1998).

Assim, células RINm5f ficaram expostas a aminoacetona (0,50-1,0 mM), na presença ou ausência de Cu(II) (100 μ M), em meio sem soro por 4 h e depois de tripsinizadas e ressuspensas em meio fresco (sem soro), foram incubadas com a sonda Fluo-4 AM por 45 min, no escuro e a 37°C, antes de se realizar as leituras de concentração de íons cálcio nas células tratadas.

As figuras 21A-21C mostram a variação do cálcio intracelular. Apenas a presença de Cu(II) (figura 21A) ou de aminoacetona (figura 21B) já foi suficiente para um acúmulo de íons cálcio no interior das células, porém sem a ocorrência de morte celular. Best e Thornalley (1999) sugerem que o metilglioxal pode causar despolarização da membrana plasmática, pois através de sua detoxificação pelo ciclo das glioxalases (Kalapos, 1999a) gera o ânion lactato, o qual abriria os canais de ânions, acarretando a despolarização da membrana e a abertura de canais para íons sódio e cálcio. Além disso, metilglioxal e H_2O_2 poderiam causar danos oxidativos às organelas que estocam os íons cálcio presentes nas células (ex: retículo endoplasmático), não causando, entretanto morte celular imediata. Porém, uma vez danificadas estas organelas, íons de cálcio seriam liberados no citoplasma, aumentando desta maneira o acúmulo de cálcio livre (Zhao *et al.*, 2008). Além disso, Krippeit-Drews e colab. (1999) confirmaram que H_2O_2 adicionado a ilhotas de ratos também levam ao aumento de cálcio intracelular através das duas vias citadas: danos oxidativos às organelas estocadoras de íons cálcio e abertura de canais de cálcio na membrana plasmática.

Na presença de Cu(II), aminoacetona (figura 21C) induziu considerável aumento interno da concentração de íons cálcio. É bem provável a participação de radicais hidroxilas oriundos da reação de Fenton entre o H_2O_2 e o Cu(I), gerados durante a oxidação da aminoacetona, o que deve levar à oxidação de proteínas e lipídeos de membrana, permitindo assim a abertura irreversível de poros. A permeabilização de mitocôndrias isoladas de fígado de rato por aminoacetona já havia sido demonstrada pelo acompanhamento espectrofotométrico de inchamento mitocondrial (Dutra e Bechara, 2004). Enfim, sabe-se que o aumento de íons cálcio interno pode levar à

apoptose, pois íons de cálcio são sobejamente conhecidos como sinalizadores de tais processos (Rizzuto e Pozzan, 2003).

Figura 21: Aumento do cálcio intracelular em células RINm5f promovido por aminoacetona na presença ou ausência de Cu(II). **(A)** (a) controle e (b) Cu(II) 100 µM; **(B)** (a) controle, (b) aminoacetona 0,50 mM e (c) aminoacetona 1,0 mM; **(C)** (a) controle e (b) aminoacetona 0,50 mM + Cu(II) 100 µM. A concentração final de Fluo-04 foi 100 nM. O procedimento de tratamento, incubação com a sonda e leitura das células está descrito em materiais e métodos. Todas as figuras são representativas de ao menos 4 experimentos independentes.

5 – CONCLUSÕES

Na ausência de soro fetal bovino, aminoacetona exibiu expressiva ação citotóxica sobre RINm5f em concentrações menores que as encontradas em outros experimentos, onde o soro foi adicionado ao meio de cultura. Acreditamos que o soro contenha biomoléculas que atuam como antioxidantes ou quelantes de metais de transição, inibindo a ação pró-oxidante da aminoacetona. Além disso, estes constituintes do soro podem constituir alvos mais susceptíveis a danos oxidativos promovidos por aminoacetona do que as próprias células.

Aminoacetona teve seu efeito pró-oxidante exacerbado com a adição de íons de cobre, porém a adição de íons de ferro não causou efeito algum as culturas de células, apesar de ambos os metais catalisarem a oxidação da aminoacetona no meio de cultura, em testes realizados no oxígrafo. Estes resultados remetem à literatura sobre diabetes, onde se descreve descarga tecidual de ferro e cobre (Rajpathak *et al.*, 2009; Hamada *et al.*, 2005).

Aminoacetona na presença de Cu(II) exhibe relação dose-resposta quanto à viabilidade celular. É, portanto, possível que as células produtoras de insulina de um indivíduo exposto a doses diárias e contínuas da aminoacetona e Cu(II), mesmo que muito pequenas, ao longo do tempo poderá sofrer danos celulares como os descritos nesta tese. Catalase e batocuproína foram os únicos antioxidantes que, adicionados ao meio de cultura, apresentaram significativa proteção às células expostas a aminoacetona/Cu(II), indicando que H₂O₂ e Cu(I) exercem papéis fulcrais nos danos às células tratadas com aminoacetona, provavelmente através da reação de Fenton onde

há produção do $\text{OH}^\bullet$. Como já discutido, SOD adicionada aos tratamentos com aminoacetona/Cu(II) não deu proteção significativa às células, talvez por ser inativada por $\text{OH}^\bullet$ ou porque, se tratar de dano causado por aminoacetona internalizada, a membrana celular constituiria uma barreira de permeabilidade a esta proteína, mas não a H_2O_2 o substrato da catalase. Já o NAC, um antioxidante tiólico, ampliou os danos às células em vez de reduzi-los, quando na presença de cobre, provavelmente devido à reciclagem de Cu(II)/Cu(I) pelos grupos tiólicos. Os resultados com antioxidantes, principalmente a batocuproína constituem um resultado importante na bioquímica do diabetes: acúmulo da concentração de íons de metais de transição no organismo e alta produção de radicais livres, como demonstrado por Hamada e colab. (2005), onde os níveis de metilglioxal e 3-deoxiglucosona foram significativamente contornados em pacientes diabéticos através da adição de um quelante de Cu(II), trientina.

Diante deste quadro, é razoável supor que células produtoras de insulina, cujos níveis de antioxidantes são muito baixos em relação aos encontrados em outros tecidos (Lenzen, 2008), sejam mais susceptíveis a danos promovidos pela combinação de íons de metais de transição e peróxidos em altas concentrações. Halliwell e Gutteridge (2007), ao comparar dados de literatura sobre a atividade antioxidante enzimática de vários tecidos humanos, indicam que homogenatos de pâncreas apresentam atividade antioxidante (CuZnSOD, MnSOD, catalase e GPx) menor se comparados a outros tecidos.

Sabe-se que células astrogliais e hepatócitos (Röhrdanz *et al.*, 2001; Röhrdanz e Kahl, 1998) sofrem indução oxidativa dos níveis de expressão do mRNA de enzimas antioxidantes, como o relatado para as células tratadas com aminoacetona.

Fragmentação de DNA, aumento da expressão de proteína pró-apoptótica (Bax) com supressão da expressão da proteína anti-apoptótica (Bcl-2), aumento do Ca^{2+} intracelular, depleção dos níveis de GSH e aumento da expressão gênica de iNOS e produção de NO são, até o momento, os eventos observados em nosso modelo de estudo. Vale ressaltar que o aumento da atividade antioxidante não foi correspondente ao aumento da expressão gênica das enzimas antioxidantes em grande parte pelas condições do experimento onde as culturas já estavam em meio com soro e sem aminoacetona por 22 h, o que pode ter minimizado a necessidade de as células se protegerem.

O aumento da expressão gênica da MnSOD e da atividade da SOD total, associado a maior expressão gênica da Bax, fragmentação do DNA celular e aumento no influxo de íons de cálcio, apontam a apoptose como o caminho mais provável de morte celular disparada pela aminoacetona, tendo como alvo primordial as mitocôndrias, também danificadas em células *beta* submetidas a hiperglicemia no diabetes (Rolo e Palmeira, 2006; Maechler e de Andrade, 2006).

O aumento observado da expressão gênica da iNOS e da produção de NO levamos a acreditar que talvez peroxinitrito seja gerado no nosso modelo de estudo, onde além da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ através da oxidação da aminoacetona, sabe-se que os outros produtos de oxidação - H_2O_2 e metilglioxal - são capazes de ativar a NADPH oxidase e exacerbar a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ no interior da célula (Ho *et al.*, 2007, Coyle *et al.*, 2006).

A concentração da aminoacetona no plasma de diabéticos não é ainda conhecida com segurança. Encontram-se como únicos parâmetros as atividades de SSAO e concentração do metilglioxal, como formas indiretas de se inferir a presença da

aminoacetona no plasma destes pacientes. Recentemente foi descrito um método via HPLC, supostamente capaz de detectar níveis confiáveis da aminoacetona em amostras biológicas (Kazachkov e Yu, 2005). Foram também relatados dados obtidos de ratos tratados com injeções peritonias de aminoacetona, revelando aumento da concentração de metilglioxal na urina dos animais (Deng *et al.*, 1998). O valor do Km da SSAO para a aminoacetona foi estimado em 126 μ M em homogenatos de artéria umbilical humana (Deng e Yu, 1999) e de 19 μ M em frações de membrana de homogenatos de aorta de ratos (Lyles e Chalmers, 1995). É importante notar que a presença da SSAO na região endócrina do pâncreas não está ainda confirmada (Ramonet *et al.*, 2003; Andrés *et al.*, 2001; Hayes e Clark, 1990). Além disso, a enzima deve estar localizada no plasma ou ancorada na face externa da membrana das células endoteliais. Essas informações de literatura e os resultados descritos nesta tese sustentam nossa hipótese de que, uma vez sintetizada na matriz mitocondrial de células *beta* pancreáticas, a aminoacetona é exportada para o citoplasma, onde, na presença de íons “livres” de metais de transição e/ou metaloproteínas como ferritina, transferrina e ceruloplasmina, aminoacetona, é oxidada por oxigênio molecular gerando produtos deletérios às células *beta*.

Falta adicionar que o papel da treonina desidrogenase, enzima que catalisa a oxidação da treonina a glicina e acetil CoA na mitocôndria, tem sido bastante discutido na literatura, principalmente no que se refere a humanos. Em fígado e pâncreas de porcos a atividade desta enzima é relativamente alta (Le Floc'h *et al.*, 1997), enquanto em ratos, estima-se que a via treonina desidrogenase corresponda a 87% do catabolismo da treonina (Bird e Nunn, 1983). Em humanos situa-se em torno de 7-11% (Zhao *et al.*, 1986; Darling *et al.*, 2000). Propõe-se que a rota principal de oxidação da

treonina em humanos é a catalisada por L-serina/treonina desidratase, porém os próprios autores clamam por mais estudos sobre a treonina desidrogenase em humanos. Ressaltamos que mesmo considerando que apenas 7-11% da treonina é oxidado em humanos via treonina desidrogenase, o fato relevante é que a aminoacetona pode ser produzida e contribuir para o mau funcionamento de células *beta* no diabetes, uma vez que constitui uma fonte de radicais livres iniciadores de reações em cadeia, potencialmente deletérias às células. Além disso, experimentos de *Northern blotting* relatados por Edgar e Polak (2000) revelaram que há expressão gênica do mRNA da 2-amino 3-cetobutirato coenzima A ligase, a segunda enzima na conversão de treonina em glicina e acetil CoA, em homogenatos de pâncreas humano.

Em conclusão, nossos dados sugerem que a aminoacetona exerce um papel, mesmo que coadjuvante nos mecanismos de danos oxidativos em células produtoras de insulina, comprometendo a produção de insulina em diabéticos ou mesmo aniquilando-as. Reconhecemos a necessidade de pesquisas sobre a viabilidade mitocondrial bem como as atividades de treonina desidrogenase e SSAO nestas células para clarificar o papel da aminoacetona na putativa citotoxicidade às células *beta*. Há também escassez de trabalhos com ilhotas humanas em meio com alta/baixa concentração de glicose para avaliar parâmetros referentes à treonina desidrogenase em ilhotas humanas.

6 – REFERÊNCIAS

- Abella A, Marti L, Camps M, Claret M, Fernández-Alvarez J, Gomis R, Gumà A, Viguerie N, Carpené C, Palacín M, Testar X, Zorzano A. Semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 activity exerts an antidiabetic action in Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 2003;52:1004-13.

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.

- Agarwal A, Munoz-Najar U, Kleh U, Shih S, Cafley KP. *N*-acetyl-cysteine promotes angiostatin production and vascular collapse in an orthotopic model of breast cancer. *Am J Pathol* 2004;164:1683-96.

- Ahmed N, Thornalley PJ. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes Metab* 2007;9:233-45.

- Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, Hibi T. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:219-25.

- Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75:639-53.

- Andrés N, Lizcano JM, Rodríguez MJ, Romera M, Unzeta M, Mahy N. Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase. *J Histochem Cytochem* 2001;49:209-17.

- Armarego WLF, Perrin DD. *Purification of Laboratory Chemicals*. 4th ed. London: Butterworth Hernemann; 1998.

- Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol* 1989;30:417-48.

- Baigi MG, Brault L, Néguesque A, Beley M, Hilali RE, Gaüzère F, Bagrel D. Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione. *Toxicol In Vitro* 2008;22:1547-54.

- Beard KM, Shangari N, Wu B, O'Brien PJ. Metabolism, not autoxidation, plays a role in alpha-oxoaldehyde- and reducing sugar-induced erythrocyte GSH depletion: relevance for diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem* 2003;252:331-8.

- Bechara EJ, Dutra F, Cardoso VE, Sartori A, Olympio KP, Penatti CA, Adhikari A, Assunção NA. The dual face of endogenous α -aminoketones: Pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006;146:88-110.

- Bechara EJ. Oxidative stress in acute intermittent porphyria and lead poisoning may be triggered by 5-aminolevulinic acid. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:841-51.

- Beers Jr RF, Sizer JWA. Spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 1952;195:133-40.

- Behr GA, da Silva EG, Ferreira AR, Cerski CT, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Pancreas beta-cells morphology, liver antioxidant enzymes and liver oxidative parameters in alloxan-resistant and alloxan-susceptible Wistar rats: a viable model system for the study of concepts into reactive oxygen species. *Fundam Clin Pharmacol* 2008;22:657-66.

- Bertera S, Crawford ML, Alexander AM, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Trucco M. Gene transfer of manganese superoxide dismutase extends islet graft function in a mouse model of autoimmune diabetes. *Diabetes* 2003;52:387-93.

- Best L, Thornalley PJ. Trioses and related substances: tools for the study of pancreatic beta-cell function. *Biochem Pharmacol* 1999;57:583-8.

- Bird MI, Nunn PB. Metabolic homeostasis of L-threonine in the normally-fed rat. Importance of liver threonine dehydrogenase activity. *Biochem J* 1983;214:687-94.

- Boomsma F, Hut H, Bagghoe U, van der Houwen A, van den Meiracker A. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): from cell to circulation. *Med Sci Monit* 2005;11:RA122-6.

- Boomsma F, van Dijk J, Bhaggoe UM, Bouhuizen AM, van den Meiracker AH. Variation in semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in plasma and tissues of mammals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2000;126:69-78.

- Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000;59:13-23.
- Braun L, Garzó T, Riba P, Mandl J, Kalapos MP. Methylglyoxal and cell viability. *Int J Biochem* 1994;26:987-90.
- Brodie AE, Reed DJ. Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:120-5.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
- Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005;54:1615-25.
- Cantero AV, Portero-Otin M, Ayala V, Auge N, Sanson M, Elbaz M, Thiers JC, Pamplona R, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor- β : implications for diabetic atherosclerosis. *FASEB J* 2007;21:3096-106.
- Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 1975;250:5475-80.
- Carpené C, Abello V, Iffiú-Soltész Z, Mercier N, Fève B, Valet P. Limitation of adipose tissue enlargement in rats chronically treated with semicarbazide-sensitive amine oxidase and monoamine oxidase inhibitors. *Pharmacol Res* 2008;57:426-34.
- Castillo V, Lizcano JM, Unzeta M. Presence of SSAO in human and bovine meninges and microvessels. *Neurobiology* 1999;7:263-72.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.

- Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D. Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycaemia through oxidative stress. *Diabetologia* 1993;36:265-6.

- Cernea S, Raz I, Herold KC, Hirshberg B, Roep BO, Schatz DA, Fleming GA, Pozzilli P, Little R, Schloot NC, Leslie RD, Skyler JS, Palmer JP. Challenges in developing endpoints for type 1 diabetes intervention studies. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25:694-704.

- Choi K, Kim J, Kim GW, Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res* 2009;6:213-22.

- Chow JM, Huang GC, Lin HY, Shen SC, Yang LY, Chen YC. Cytotoxic effects of metal protoporphyrins in glioblastoma cells: Roles of albumin, reactive oxygen species, and heme oxygenase-1. *Toxicol Lett* 2008;177:97-107.

- Civelek S, Gelişgen R, Andican G, Seven A, Küçük SH, Özdoğan M, Burçak G. Advanced glycation end products and antioxidant status in nondiabetic and streptozotocin induced diabetic rats: effects of copper treatment. *Biometals* 2009;[Epub ahead of print].

- Conley CL, Chisholm JJ Jr. Recovery from hepatic decompensation in protoporphyria. *Johns Hopkins Med J* 1979;145:237-40.

- Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro-and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 2001;166:3873-81.

- Cook LJ, Davies J, Yates AP, Elliott AC, Lovell J, Joule JA, Pemberton P, Thornalley PJ, Best L. Effects of methylglyoxal on rat pancreatic beta-cells. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1361-7.

- Corrêa-Giannella ML, Raposo do Amaral AS. Pancreatic islet transplantation. *Diabetol Metab Syndr* 2009;1:9-15.

- Costa CA, Trivelato GC, Pinto AM, Bechara EJ. Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin Chem* 1997;43:1196-202.

- Cotgreave IA. *N*-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 1997;38:205-27.

- Cotton ML, Dunford HB. Studies on Horseradish Peroxidase. XI. On the Nature of Compounds I and II as Determined from the Kinetics of the Oxidation of Ferrocyanide. *Can J Chem* 1973;51:582-87.

- Couri CE, Voltarelli JC. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. *Diabetol Metab Syndr* 2009;16:19-23.

- Coyle CH, Martinez LJ, Coleman MC, Spitz DR, Weintraub NL, Kader KN. Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2206-13.

- Daimon M, Susa S, Yamatani K, Manaka H, Hama K, Kimura M, Ohnuma H, Kato T. Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:1525-8.

- Darling PB, Grunow J, Rafii M, Brookes S, Ball RO, Pencharz PB. Threonine dehydrogenase is a minor degradative pathway of threonine catabolism in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E877-84.

- Das Evcimen N, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 2007;55:498-510.

- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7303-7.

- Demasi M, Penatti CA, DeLucia R, Bechara EJ. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. *Free Radic Biol Med* 1996;20:291-9.

- Deng Y, Boomsma F, Yu PH. Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. *Life Sci* 1998;63:2049-58.

- Deng Y, Yu PH. Assessment of the deamination of aminoacetone, an endogenous substrate for semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Anal Biochem* 1999;270:97-102.

- Dhar A, Desai K, Kazachmov M, Yu P, Wu L. Methylglyoxal production in vascular smooth muscle cells from different metabolic precursors. *Metabolism* 2008;57:1211-20.

- Dhar A, Desai K, Liu J, Wu L. Methylglyoxal, protein binding and biological samples: are we getting the true measure? *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:1093-100.

- Douki T, Onuki J, Medeiros MH, Bechara EJ, Cadet J, Di Mascio P. DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem Res Toxicol* 1998a;11:150-7.

- Douki T, Onuki J, Medeiros MH, Bechara EJ, Cadet J, Di Mascio P. Hydroxyl radicals are involved in the oxidation of isolated and cellular DNA bases by 5-aminolevulinic acid. *FEBS Lett* 1998b;428:93-6.

- Du T, Ciccotosto GD, Cranston GA, Kocak G, Masters CL, Crouch PJ, Cappai R, White AR. Neurotoxicity from glutathione depletion is mediated by Cu-dependent p53 activation. *Free Radic Biol Med* 2008;44:44-55.

- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest* 2003;112:1049-57.

- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12222-6.

- Duran-Jimenez B, Dobler D, Moffatt S, Rabbani N, Streuli CH, Thornalley PJ, Tomlinson DR, Gardiner NJ. Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes* 2009;58:2893-903.

- Dutra F, Araki D, Bechara EJH. Aminoacetone induces loss of ferritin ferroxidase and iron uptake activities. *Free Rad Res* 2003;37:1113-21.

- Dutra F, Bechara EJ. Aminoacetone induces iron-mediated oxidative damage to isolated rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2004;430:284-9.
- Dutra F, Ciriolo MR, Calabrese L, Bechara EJH. Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin. *Chem Res Toxicol* 2005;18:755-60.
- Dutra F, Knudsen FS, Curi D, Bechara EJH. Aerobic oxidation of aminoacetone, a threonine catabolite: iron catalysis and coupled iron release from ferritin. *Chem Res Toxicol* 2001;14:1323-9.
- Dutra, F, Estudo mecanístico de lesões oxidativas em biomoléculas por aminoacetona; 2003. Doutorado [Dissertação em Química Orgânica] – Instituto de Química-USP.
- Edgar AJ, Polak JM. Molecular cloning of the human and murine 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase cDNAs. *Eur J Biochem* 2000;267:1805-12.
- Eklom J. Potential therapeutic value of drugs inhibiting semicarbazide-sensitive amine oxidase: vascular cytoprotection in diabetes mellitus. *Pharmacol Res* 1998;37:87-92.
- Eliaschewitz FG, Aita CA, Genzini T, Noronha IL, Lojudice FH, Labriola L, Krogh K, Oliveira EM, Silva IC, Mendonça Z, Franco D, Miranda MP, Noda E, de Castro LA, Andreolli M, Goldberg AC, Sogayar MC. First Brazilian pancreatic islet transplantation in a patient with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc* 2004;36:1117-8.
- Ellis EM. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 2007;115:13-24.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984;105:114-21.
- Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104.
- Formichi P, Radi E, Battisti C, Tarquini E, Leonini A, Di Stefano A, Federico A. Human fibroblasts undergo oxidative stress-induced apoptosis without internucleosomal DNA fragmentation. *J Cell Physiol* 2006;208:289-97.

- Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem* 1989;264:5598-605.
- Friederich M, Hansell P, Palm F. Diabetes, oxidative stress, nitric oxide and mitochondria function. *Curr Diabetes Rev* 2009;5:120-44.
- Frischmann M, Bidmon C, Angerer J, Pischetsrieder M. Identification of DNA adducts of methylglyoxal. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1586-92.
- Garcia Soriano F, Virág L, Jagtap P, Szabó E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabó C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat Med* 2001;7:108-13.
- Gawlowski T, Stratmann B, Stirban AO, Negrean M, Tschoepe D. AGEs and methylglyoxal induce apoptosis and expression of Mac-1 on neutrophils resulting in platelet-neutrophil aggregation. *Thromb Res* 2007;121:117-26.
- Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, Lauris V. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3519-23.
- Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 2000;27:97-106.
- Gokturk C, Sugimoto H, Blomgren B, Roomans GM, Forsoroerg-Nilsson K, Orelund L, Sjoquist M. Macrovascular changes in mice overexpressing human semicarbazide-sensitive amine oxidase in smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 2007;20:743-50.
- Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 1981;199:393-8.
- Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids* 2008;35:29-36.

- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13:1899-911.

- Guerranti R, Pagani R, Neri S, Errico SV, Leoncini R, Marinello E. Inhibition and regulation of rat liver L-threonine dehydrogenase by different fatty acids and their derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2001;1568:45-52.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.

- Hamada Y, Nakashima E, Naruse K, Nakae M, Naiki M, Fujisawa H, Oiso Y, Hotta N, Nakamura J. A copper chelating agent suppresses carbonyl stress in diabetic rat lenses. *J Diabetes Complicat* 2005;19:328-34.

- Hamelin M, Mary J, Vostry M, Friguet B, Bakala H. Glycation damage targets glutamate dehydrogenase in the rat liver mitochondrial matrix during aging. *FEBS J* 2007;274:5949-61.

- Han YH, Kim SZ, Kim SH, Park WH. Pyrogallol as a glutathione depletor induces apoptosis in HeLa cells. *Int J Mol Med* 2008;21:721-30.

- Hawa MI, Thivolet C, Mauricio D, Alemanno I, Cipponeri E, Collier D, Hunter S, Buzzetti R, de Leiva A, Pozzilli P, Leslie RD. Metabolic syndrome and autoimmune diabetes: action LADA 3. *Diabetes Care* 2009;32:160-4.

- Hayes BE, Clarke DE. Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in streptozotocin diabetic rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1990;69:71-83.

- Hepworth JD. Aminoacetone semicarbazone hydrochloride. *Org Synth* 1976;45:1-3.

- Hermes-Lima M, Castilho RF, Valle VG, Bechara EJ, Vercesi AE. Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. *Biochim Biophys Acta* 1992;1180:201-6.

- Hernandez M, Solé M, Boada M, Unzeta M. Soluble semicarbazide sensitive amine oxidase (SSAO) catalysis induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:164-73.

- Hindmarsh JT. Variable phenotypic expression of genotypic abnormalities in the porphyrias. *Clin Chim Acta* 1993;217:29-38.
- Hiraku Y, Sugimoto J, Yamaguchiand T, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by aminoacetone, an amino acid metabolite. *Arch Biochem Biophys* 1999;365:62-70.
- Ho C, Lee PH, Huang WJ, Hsu YC, Lin CL, Wang JY. Methylglyoxal-induced fibronectin gene expression through Ras-mediated NADPH oxidase activation in renal mesangial cells. *Nephrology (Carlton)* 2007;12:348-56.
- Hohmeier HE, Thigpen A, Tran VV, Davis R, Newgard CB. Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1beta-induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest* 1998;101:1811-20.
- House JD, Hall BN, Brosnan JT. Threonine metabolism in isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:1300-7.
- Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440:944-8.
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH. Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* 2009;284:547-55.
- Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993;18:195-9.
- Iglesias J, Abernethy VE, Wang Z, Lieberthal W, Koh JS, Levine JS. Albumin is a major serum survival factor for renal tubular cells and macrophages through scavenging of ROS. *Am J Physiol* 1999;277:F711-22.
- International Diabetes Federation. [Online] 2010 [acessado em 02 de Janeiro de 2010]; Disponível em:
URL: <http://da3.diabetesatlas.org/indexc97b.html>

- Israili ZH. Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. Am J Ther 2009;[Epub ahead of print].

- Jayalakshmi K, Sairam M, Singh SB, Sharma SK, Ilavazhagan G, Banerjee PK. Neuroprotective effect of *N*-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. Brain Res 2005;1046:97-104.

- Jia X, Olson DJ, Ross AR, Wu L. Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. FASEB J 2006;20:1555-7.

- Jiang ZJ, Richardson JS, Yu PH. The contribution of cerebral vascular semicarbazide-sensitive amine oxidase to cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. Neuropathol Appl Neurobiol 2008;34:194-204.

- Kachur AV, Koch CJ, Biaglow JE. Mechanism of copper-catalyzed oxidation of glutathione. Free Radic Res 1998;28:259-69.

- Kalapos MP. Methylglyoxal and glucose metabolism: a historical perspective and future avenues for research. Drug Metabol Drug Interact 2008;23:69-91.

- Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. Toxicol Lett 1999b;110:145-75.

- Kalapos MP. Methylglyoxal toxicity in mammals. Toxicol Lett 1994;73:3-24.

- Kalapos MP. On the promine/retine theory of cell division: now and then. Biochim Biophys Acta 1999a;1426:1-16.

- Kang D, Hamasaki N. Alterations of mitochondrial DNA in common diseases and disease states: aging, neurodegeneration, heart failure, diabetes, and cancer. Curr Med Chem 2005;2:429-41.

- Kang JH. Oxidative damage of DNA induced by methylglyoxal in vitro. Toxicol Lett 2003;145:181-7.

- Kazachkov M, Yu PH. Novel HPLC procedure for detection and quantification of aminoacetone, a precursor of methylglyoxal, in biological samples. *J Chromatogr* 2005;824:116-22.

- Kiaer C, Thams P. Serum albumin protects from cytokine-induced pancreatic beta cell death by a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *Endocrine* 2009;35:325-32.

- Kicic A, Chua AC, Baker E. Effect of iron chelators on proliferation and iron uptake in hepatoma cells. *Cancer* 2001;92:3093-110.

- Kim NH, Kang JH. Oxidative damage of DNA induced by the cytochrome c and hydrogen peroxide system. *J Biochem Mol Biol* 2006;39:452-6.

- Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol* 1997;10:1285-92.

- Kolodziejewski PJ, Koo JS, Eissa NT. Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:18141-6.

- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997;416:15-8.

- Krippeit-Drews P, Kramer C, Welker S, Lang F, Ammon HP, Drews G. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 1999; 514:471-81.

- Kumazawa T, Hiwasa T, Takiguchi M, Suzuki O, Sato K. Activation of Ras signaling pathways by pyrroloquinoline quinone in NIH3T3 mouse fibroblasts. *Int J Mol Med* 2007;19:765-70.

- Laggner H, Hermann M, Bernhard MKG, Kapiotis S. Cu²⁺ and Cu⁺ bathocuproine disulfonate oxidation of the ROS-detecting compound dichlorofluorescein (DCFH). *Anal Bioanal Chem* 2006;385:959-961.

- Lakey JR, Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Korbitt GS, Rajotte RV, Mabley JG, Szabó C, Rabinovitch A. Peroxynitrite is a mediator of cytokine-induced destruction of human pancreatic islet beta cells. *Lab Invest* 2001;81:1683-92.

- Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Burkhart B, Vallete FM. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:887-96.

- Le Floch N, Thibault JN, Sève B. Tissue localization of threonine oxidation in pigs. *Br J Nutr* 1997;77:593-603.

- Lee JW, Kim WH, Lim JH, Song EH, Song J, Choi KY, Jung MH. Mitochondrial dysfunction: glucokinase downregulation lowers interaction of glucokinase with mitochondria, resulting in apoptosis of pancreatic beta-cells. *Cell Signal* 2009;21:69-78.

- Lee M, Hyun DH, Marshall KA, Ellerby LM, Bredesen DE, Jenner P, Halliwell B. Effect of overexpression of BCL-2 on cellular oxidative damage, nitric oxide production, antioxidant defenses, and the proteasome. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1550-9.

- Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 2008;36:343-7.

- LoPachin RM, Gavin T, Petersen DR, Barber DS. Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. *Chem Res Toxicol* 2009;22:1499-508.

- Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:1-10.

- Lortz S, Tiedge M. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* 2003;34:683-8.

- Love S, Barber R, Wilcock GK. Increased poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain* 1999;122:247-53.

- Lyles GA, Chalmers J. Aminoacetone metabolism by semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat aorta. *Biochem Pharmacol* 1995;49:416-9.

- MacDonald MJ, Chaplen FW, Triplett CK, Gong Q, Drought H. Stimulation of insulin release by glyceraldehyde may not be similar to glucose. *Arch Biochem Biophys* 2006;447:18-26.
- Maechler P, Carobbio S, Rubi B. In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:696-709.
- Maechler P, de Andrade PB. Mitochondrial damages and the regulation of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 2006;34:824-7.
- Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 1999;274:27905-13.
- Mashino T, Fridovich I. Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. *Arch Biochem Biophys* 1987;254:547-51.
- Mátyus P, Dajka-Halasz B, Foldi A, Haider N, Barlocco D, Magyar K. Semicarbazide-sensitive amine oxidase: current status and perspectives. *Curr Med Chem* 2004;11:1285-98.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
- McDonald A, Tipton K, O'Sullivan J, Olivieri A, Davey G, Coonan AM, Fu W. Modelling the roles of MAO and SSAO in glucose transport. *J Neural Transm* 2007;114:783-6.
- McElwee MK, Song MO, Freedman JH. Copper activation of NF-kappaB signaling in HepG2 cells. *J Mol Biol* 2009;393:1013-21.
- McKay F, Schibeci S, Heard R, Stewart G, Booth D. Analysis of neutralizing antibodies to therapeutic interferon-beta in multiple sclerosis patients: a comparison of three methods in a large Australasian cohort. *J Immunol Meth* 2006;310:20-9.
- Ministério da Saúde-Brasil [Online]. 2009 [acessado em 02 de Dezembro de 2009]; Disponível em:
URL: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23617&janela=1/

- Mizuno N, Yoshitomi H, Ishida H, Kuromi H, Kawaki J, Seino Y, Seino S. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca^{2+} signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose-induced insulin secretion. *Endocrinology* 1998;139:1429-39.

- Monnier VM, Sell DR, Dai Z, Nemet I, Collard F, Zhang J. The role of the amadori product in the complications of diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2008;1126:81-8.

- Monteiro HP, Abdalla DS, Augusto O, Bechara EJ. Free radical generation during delta-aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch Biochem Biophys* 1989;271:206-16.

- Moriscot C, Richard MJ, Favrot MC, Benhamou PY. Protection of insulin-secreting INS-1 cells against oxidative stress through adenoviral-mediated glutathione peroxidase overexpression. *Diabetes Metab* 2003;29:145-51.

- Morley N, Curnow A, Salter L, Campbell S, Gould D. *N*-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. *J Photochem Photobiol B Biol* 2003;72:55-60.

- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.

- Munday R, Munday CM, Winterbourn CC. Inhibition of copper-catalyzed cysteine oxidation by nanomolar concentrations of iron salts. *Free Radic Biol Med* 2003;36:757-64.

- Munusamy S, MacMillan-Crow LA. Mitochondrial superoxide plays a crucial role in the development of mitochondrial dysfunction during high glucose exposure in rat renal proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med* 2009;46:1149-57.

- Nagaoka Y, Iuchi Y, Ikeda Y, Fujii J. Glutathione reductase is expressed at high levels in pancreatic islet cells. *Redox Rep* 2004;9:321-4.

- Nakamura U, Iwase M, Uchizono Y, Sonoki K, Sasaki N, Imoto H, Goto D, Iida M. Rapid intracellular acidification and cell death by H_2O_2 and alloxan in pancreatic beta cells. *Free Radic Biol Med* 2006;40:2047-55.

- Nakata M, Uto N, Maruyama I, Yada T. Nitric oxide induces apoptosis via Ca^{2+} -dependent processes in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Cell Struct Funct* 1999;24:451-5.

- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett* 1998;427:263-6.

- Nakayama K, Nakayama M, Iwabuchi M, Terawaki H, Sato T, Kohno M, Ito S. Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* 2008;28:871-8.

- Nakazaki M, Kakei M, Yaekura K, Koriyama N, Morimitsu S, Ichinari K, Yada T, Tei C. Diverse effects of hydrogen peroxide on cytosolic Ca^{2+} homeostasis in rat pancreatic beta-cells. *Cell Struct Funct* 2000;25:187-93.

- Narayan KM, Williamson DF. Prevention of Type 2 Diabetes: Risk Status, Clinic, and Community. *J Gen Intern Med* 2010;25:154-7.

- Nemcsik J, Szökő E, Soltész Z, Fodor E, Toth L, Egresits J, Tábi T, Magyar K, Kiss I. Alteration of serum semicarbazide-sensitive amine oxidase activity in chronic renal failure. *J Neural Transm* 2007;114:841-3.

- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 2007;583:9-24.

- Nishikawa T, Araki E. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:343-53.

- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.

- Obata T. Diabetes and semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity: A review. *Life Sci* 2006;79:417-22.

- Oikawa S, Yamada K, Yamashita N, Tada-Okawa S, Kawanishi S. *N*-acetylcysteine, a cancer chemopreventive agent, causes oxidative damage to cellular and isolated DNA. *Carcinogenesis* 1999;8:1485-90.

- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:281-5.

- O'Sullivan J, Unzeta M, Healy J, O'Sullivan MI, Davey G, Tipton KF. Semicarbazide-sensitive amine oxidases: enzymes with quite a lot to do. *Neurotoxicology* 2004;25:303-15.

- Pereira B, Curi R, Kokubun E, Bechara EJ. 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 1992;72:226-30.

- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2007;56:1783-91.

- Rajpathak SN, Crandall J, Wylie-Rosett J, Kabat GC, Rohan TE, Hu FB. The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:671-81.

- Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Methylglyoxal comes of AGE. *Cell* 2006;124:258-60.

- Ramonet D, Rodríguez M, Saura J, Lizcano JM, Romera M, Unzeta M, Finch C, Billett E, Mahy N. Localization of monoamine oxidase A and B and semicarbazide-sensitive amine oxidase in human peripheral tissues. *Inflammopharmacology* 2003;11:111-7.

- Rizzuto R, Pozzan T. When calcium goes wrong: genetic alterations of a ubiquitous signaling route. *Nat Genet* 2003;34:135-41.

- Robertson RP, Harmon JS. Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: The importance of glutathione peroxidase. *FEBS Lett* 2007;581:3743-8.

- Rodrigues AP, da Fonseca LM, de Faria Oliveira OM, Brunetti IL, Ximenes VF. Oxidation of acetylacetone catalyzed by horseradish peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:1755-61.

- Roessner V, Uebel H, Becker A, Beck G, Bleich S, Rothenberger A. Serum level of semicarbazide-sensitive amine oxidase in children with ADHD. *Behav Brain Funct* 2006;27:2-5.

- Röhrdanz E, Kahl R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1998;24:27-38.

- Röhrdanz E, Schmuck G, Ohler S, Tran-Thi QH, Kahl R. Changes in antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide in rat astroglial cells. *Arch Toxicol* 2001;75:150-8.

- Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:167-78.

- Roma LP, Bosqueiro JR, Cunha DA, Carneiro EM, Gurgul-Convey E, Lenzen S, Boschero AC, Souza KL. Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase overexpression. *Free Radic Biol Med* 2009;47:1386-93.

- Roy DN, Mandal S, Sen G, Biswas T. Superoxide anion mediated mitochondrial dysfunction leads to hepatocyte apoptosis preferentially in the periportal region during copper toxicity in rats. *Chem Biol Interact* 2009;182:136-47.

- Sanders LJ. From Thebes to Toronto and the 21st century: An incredible journey. *Diabetes Spectrum* 2002;15:56-60.

- Sartorelli AC, Iannotti AT, Booth BA, Schneider FH, Bertino JR, Johns DG. Complex formation with DNA and inhibition of nucleic acid synthesis by methylglyoxal bis(guanyldrazones). *Biochim Biophys Acta* 1965;103:174-6.

- Sartori A, Garay-Malpartida HM, Forni MF, Schumacher RI, Dutra F, Sogayar MC, Bechara EJ. Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells. *Chem Res Toxicol* 2008; 21:1841-50.

- Sato K, Akaike T, Kohno M, Ando M, Maeda H. Hydroxyl radical production by H_2O_2 plus Cu,Zn-superoxide dismutase reflects the activity of free copper released from the oxidatively damaged enzyme. *J Biol Chem* 1992;267:25371-7.

- Sawa A, Khan AA, Hester LD, Snyder SH. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:11669-74.

- Schiff M, Loublier S, Coulibaly A, Bénit P, Ogier de Baulny H, Rustin P. Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship? *J Inherit Metab Dis* 2009;32:684-98.

- Schmidt HD, Dutiné C, Bereiter-Hahn J. Exportin 1-independent nuclear export of GAPDH. *Cell Biol Int* 2003;27:511-7.

- Schubert MP. Combination of thiol acids with methylglyoxal. *J Biol Chem* 1935;111:671-8.

- Schubert MP. Compounds of thiol acids with aldehydes. *J Biol Chem* 1936;114:341-50.

- Sheader EA, Benson RS, Best L. Cytotoxic action of methylglyoxal on insulin-secreting cells. *Biochem Pharmacol* 2001;61:1381-6.

- Sigfrid LA, Cunningham JM, Beeharry N, Håkan Borg LA, Rosales Hernandez AL, Carlsson C, Bone AJ, Green IC. Antioxidant enzyme activity and mRNA expression in the islets of Langerhans from the BB/S rat model of type 1 diabetes and an insulin-producing cell line. *J Mol Med* 2004;82:325-35.

- Skyler JS. Prediction and prevention of type 1 diabetes: progress, problems, and prospects. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:768-71.

- Smith-Mungo LI, Kagan HM. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol* 1998;16:387-98.

- Souza KL, Gurgul-Convey E, Elsner M, Lenzen S. Interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in insulin-producing cells. *J Endocrinol* 2008;97:139-50.

- Su M, Yang Y, Yang G. Quantitative measurement of hydroxyl radical induced DNA double-strand breaks and the effect of *N*-acetyl-L-cysteine. *FEBS Lett* 2006;580:4136-42.

- Suarez-Pinzon WL, Mabley JG, Strynadka K, Power RF, Szabó C, Rabinovitch A. An inhibitor of inducible nitric oxide synthase and scavenger of peroxynitrite prevents diabetes development in NOD mice. *J Autoimmun* 2001;16:449-55.

- Swaminathan S, Fonseca VA, Alam MG, Shah SV. The role of iron in diabetes and its complications. *Diabetes Care* 2007;30:1926-33.

- Synold T, Xi B, Wuenschell GE, Tamae D, Figarola JL, Rahbar S, Termini J. Advanced glycation end products of DNA: quantification of N²-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 2008;21:2148-55.

- Szent-Gyorgyi A. On retine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967;57:1642-3.

- Takahashi K. The reactions of phenylglyoxal and related reagents with amino acids. *J Biochem* 1977;81:395-402.

- Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007;27:130-43.

- Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertson RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12363-8.

- Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen Pharmacol* 1996;27:565-73.

- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997;46:1733-42.

- Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia* 1999;42:849-55.

- Timmins GS, Liu KJ, Bechara EJ, Kotake Y, Swartz HM. Trapping of free radicals with direct in vivo EPR detection: a comparison of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide and 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide as spin traps for HO^{*} and SO₄^{*-}. *Free Radic Biol Med* 1999;27:329-33.

- Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* 2000;466:6-10.

- Tuchman A. Diabetes and the public's health. *Lancet* 2009;37:1140-1.

- Turk Z, Nemet I, Varga-Defteardarovic L, Car N. Elevated level of methylglyoxal during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes Metab* 2006;32:176-80.

- Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res* 2009;[Epub ahead of print].

- Unzeta M, Solé M, Boada M, Hernández M. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) and its possible contribution to vascular damage in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2007;114:857-62.

- van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metab Rev* 2003;35:215-53.

- Vander Jagt DL, Hunsaker LA, Vander Jagt TJ, Gomez MS, Gonzales DM, Deck LM, Royer RE. Inactivation of glutathione reductase by 4-hydroxynonenal and other endogenous aldehydes. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1133-40.

- Vannier-Santos MA, Menezes D, Oliveira MF, de Mello FG. The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology* 2008;154:3104-11.

- Vercesi AE, Castilho RF, Meinicke AR, Valle VG, Hermes-Lima M, Bechara EJ. Oxidative damage of mitochondria induced by 5-aminolevulinic acid: role of Ca²⁺ and membrane protein thiols. *Biochim Biophys Acta* 1994;1188:86-92.

- Wagner BA, Teesch LM, Buettner GR, Britigan BE, Burns CP, Reszka KJ. Inactivation of anthracyclines by serum heme proteins. *Chem Res Toxicol* 2007;20:920-6.
- Wang J, Alexander P, Wu L, Hammer R, Cleaver O, McKnight SL. Dependence of mouse embryonic stem cells on threonine catabolism. *Science* 2009;325:435-9.
- Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V, Rojanasakul Y. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 2008;73:119-27.
- Wang SX, Nakamura N, Mure M, Klinman JP, Sanders-Loehr J. Characterization of the native lysine tyrosylquinone cofactor in lysyl oxidase by Raman spectroscopy. *J Biol Chem* 1997;272:28841-4.
- Wang X, Desai K, Clausen JT, Wu L. Increased methylglyoxal and advanced glycation end products in kidney from spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int* 2004;66:2315-21.
- Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. The San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 1998;7:1167-72.
- Wiederkehr A, Wollheim CB. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* 2006;147:2643-9.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;5:1047-53.
- Wittmann I, Mazák I, Potó L, Wagner Z, Wagner L, Vas T, Kovács T, Belágyi J, Nagy J. Role of iron in the interaction of red blood cells with methylglyoxal. Modification of L-arginine by methylglyoxal is catalyzed by iron redox cycling. *Chem Biol Interact* 2001; 138:171-187.
- Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J Clin Invest* 1991;87:31-8.

- Wrede CE, Buettner R, Bollheimer LC, Scholmerich J, Palitzsch KD, Hellerbrand C. Association between serum ferritin and the insulin resistance syndrome in a representative population. *Eur J Endocrinol* 2006;154:333-40.

- Xiao S, Yu PH. A fluorometric high-performance liquid chromatography procedure for simultaneous determination of methylamine and aminoacetone in blood and tissues. *Anal Biochem* 2009;384:20-6.

- Yao D, Brownlee, M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of RAGE and RAGE ligands. *Diabetes* 2009;59:249-55.

- Yuen APW, Lam KY, Choy JTJ, Ho WK, Wei WI. The clinopathological significance of Bcl-2 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 2001; 26:129-33.

- Zamzami N, Hirsch T, Dallaporta, B, Petit PX, Kroemer G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembr* 1997; 29:185-93.

- Zhao XH, Wen ZM, Meredith CN, Matthews DE, Bier DM, Young VR. Threonine kinetics at graded threonine intakes in young men. *Am J Clin Nutr* 1986;43:795-802.

- Zhao Z, Walczysko P, Zhao M. Intracellular Ca^{2+} stores are essential for injury induced Ca^{2+} signaling and re-endothelialization. *J Cell Physiol* 2008;214:595-603.

- Zheng Y, Li XK, Wang Y, Cai L. The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators. *Hemoglobin* 2008;32:135-45.

- Zhu H, Zhang L, Trush MA, Li Y. Upregulation of endogenous glutathione system by 3H-1,2-dithiole-3-thione in pancreatic RINm5F beta-cells as a novel strategy for protecting against oxidative beta-cell injury. *Free Radic Res* 2007;41:242-50.

ANEXO A

Título: The dual face of endogenous α -aminoketones: Pro-oxidizing metabolic weapons.

Trabalho publicado na revista: Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology 146; 88-110.

Autoria: Bechara EJ, Dutra F, Cardoso VE, **Sartori A**, Olympio KP, Penatti CA, Adhikari A, Assunção NA (2006).

ANEXO B

Título: Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells.

Trabalho publicado na revista: Chemical Research in Toxicology 21; 1841-1850.

Autoria: Sartori A, Garay-Malpartida HM, Forni MF, Schumacher RI, Dutra F, Sogayar MC, Bechara EJ (2008).

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Adriano Sartori

Local e Data de Nascimento: São Paulo, SP, 02 de Agosto de 1978.

FORMAÇÃO

- Ensino médio - Colégio E.E.P.S.G Professora Rituco Mitani, Franco da Rocha, SP, 1996.
- Graduado em Química, Instituto de Química – Universidade de São Paulo, 2003.
- Graduado em Química – opção Biotecnológica – Universidade de São Paulo, 2003.
- Graduado em Química – opção Licenciatura – Universidade de São Paulo, 2004.
- Doutorado em Bioquímica, Instituto de Química – Universidade de São Paulo, 2010.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

- 2001-2003 – Iniciação Científica

Orientador: Profa. Dra. Alcía Juliana Kowaltowski, Departamento de Bioquímica, IQ-USP.

Título do Projeto: Efeito do pré-condicionamento sobre a função mitocondrial.

Suporte: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

- 2003 – Iniciação Científica

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, Departamento de Química Fundamental, IQ-USP.

Título do Projeto: Atividade catalítica de complexos metálicos com pesticidas como causa de estresse oxidativo.

Suporte: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

- 2005-2010 – Doutorado em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara, Departamento de Bioquímica, IQ-USP.

Título do Projeto: Toxicidade de aminoacetona a células produtoras de insulina.

Suporte: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2009 – 16th SFRBM – Sunrise Free Radical School (São Francisco, EUA).
- 2009 – 16th SFRBM – Pre-Meeting Workshop – Critical methods for redox biology: from the test tube to the clinic (São Francisco, EUA).
- 2009 – VI Meeting of SFRBM – South American Group – Free Radical School (Santiago, Chile).
- 2008 – 15th SFRBM – Sunrise Free School (Indianapolis, EUA).
- 2008 - 15th SFRBM – Pre-Meeting Workshop – Mass spectrometry in free radical research (Indianapolis, EUA).
- 2007 - V Meeting of SFRBM – South American Group – Free Radical School (Montevideu, Uruguai).
- 2007 - Monitoria – Disciplina: QBQ 101 – Bioquímica e Biologia Molecular para o Curso de Enfermagem, Professor Responsável: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales.
- 2006 – Monitoria – Disciplina: QBQ 2452 – Bioquímica Metabólica para o Curso de Química, Professor Responsável: Profa. Dra. Maria Teresa Machini de Miranda.
- 2005 – IV Meeting of SFRBM – South American Group – Sunrise Free Radical School (Águas de Lindóia, SP, Brasil).

PRÊMIOS

- 2008 - Poster premiado "SBBq Award" no XXXVII Encontro anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular SBBq.
- 2007 - Poster premiado na categoria Young Investigator Award, South American Group of The Society For Free Radical Biology and Medicine.
- 2002 - Mensão Honrosa no concurso de painéis na XIX Semana da Química – IQ-USP com o Título: Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H₂O₂ release and enhances K⁺ transport.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

- 2009 - 16th Annual Meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine (Indianapolis – EUA). Aminoacetone increases NO levels in Pancreatic beta-cell lineages and cytochrome c oxidative damage.
- 2009 - VI Meeting of the SFRBM - South American Group (Santiago - Chile). Oxidative damage to cytochrome c induced by aminoacetone.
- 2008 - XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Águas de Lindóia – SP- Brasil). Aminoacetone Impairs Production of Insulin by RINm5f Cells.
- 2008 - 15th Annual Meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine (Indianapolis – EUA). Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells.
- 2007 - XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Salvador – BA – Brasil). Aminoacetone Induces Copper-Mediated Oxidative Damage to Insulin-Producing Cells.
- 2007 - V Meeting of the SFRBM - South American Group (Montevideu – Uruguai). Effects of aminoacetone, a threonine metabolite, on insulin-producing cells.
- 2007 - Pancreatic β -cell: birth, life and death (Londres – Inglaterra). Does aminoacetone accumulation contribute to pancreatic beta-cell death in diabetes?
- 2006 - XXXV Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Águas de Lindóia – SP – Brasil). Oxidative Damage Caused by Aminoacetone on Insulin-Producing Cells.
- 2005 - IV Meeting of the SFRBM - South American Group (Águas de Lindóia – SP – Brasil) (ouvinte).
- 2003 – 11º simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – Evento de engenharia e Exatas (São Carlos – SP – Brasil). Atividade catalítica de complexos metálicos com pesticidas como causa de estresse oxidativo.

- 2003 - XXXII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Caxambú – MG – Brasil). Ischemic preconditioning inhibits mitochondrial respiration, increases H₂O₂ release and enhances K⁺ transport.

ARTIGOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

- 2008 - SARTORI, A.; Garay-Malpartida, H. M.; Forni, M.F.; Schumacher, R. I. ; Dutra F; Sogayar, M.C.; Bechara EJH. Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells. Chemical Research in Toxicology, v. 21, p. 1841-1850.
- 2006 - Bechara EJH; Dutra F; Cardoso VE; SARTORI, A.; Olympio KP; Penatti CA; Adhikari A; Assunção NA. The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 88-110.
- 2003 - da Silva MM; SARTORI, A.; Belisle E; Kowaltowski AJ. Ischemic Preconditioning Inhibits Mitochondrial Respiration, Increases H₂O₂ Release and Enhances K⁺ Transport. American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology, v. 285, p. H154-H162.

RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- 2003 – Sartori, A; Ferreira, AMC; Atividade catalítica de complexos metálicos com pesticidas como causa de estresse oxidativo - 11º simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP – Evento de engenharia e Exatas (São Carlos – SP – Brasil).
- 2003 - da Silva MM; SARTORI, A.; Belisle E; Kowaltowski AJ; Ischemic Preconditioning Inhibits Mitochondrial Respiration, Increases H₂O₂ Release and Enhances K⁺ Transport. XXXII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Caxambú – MG – Brasil).

- 2006 – Sartori, A; Dutra, F; Sogayar, MC; Santos, PB; Bechara EJJ; Oxidative Damage Caused by Aminoacetone on Insulin-Producing Cells. XXXV Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Águas de Lindóia – SP – Brasil). Livro do congress, resumo T-39, página 112.
- 2007 – Sartori, A; Dutra, F; Sogayar, MC; Bechara, EJJ; Aminoacetone Induces Copper-Mediated Oxidative Damage to Insulin-Producing Cells. XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Salvador – BA – Brasil). Livro do congress, resumo T-63, página 130.
- 2007 – Sartori, A; Mano, CM; Malpartida, HM; Sogayar, MC; Bechara, EJJ; Effects of aminoacetone, a threonine metabolite, on insulin-producing cells. V Meeting of the SFRBM - South American Group (Montevideu – Uruguai).
- 2007 – Sartori, A; Malaprtida, HM; Dutra, F; Sogayar, MC; Bechara, EJJ; Does aminoacetone accumulation contribute to pancreatic beta-cell death in diabetes? Pancreatic β -cell: birth, life and death (Londres – Inglaterra). Livro do Congresso, resumo p057, página 21.
- 2008 – Sartori, A; Malpartida, HM; Forni, MF; Shumacher, RI; Sogayar, MC; Bechara, EJJ; Aminoacetone, a putative endogenous source of methylglyoxal, causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells. 15th Annual Meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine (Indianapolis – EUA). Volume 45, supplement 1, 2008 – Free Radical in biology and Medicine, Resumo 426, página S156.
- 2008 – Sartori, A; Garay-Malpartida, HM; Forni, MF; Dutra, F; Sogayar, MC; Bechara, EJJ; Aminoacetone Impairs production of insulin by RINm5f cells. XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (Águas de Lindóia – SP- Brasil). Livro do Congresso, resumo T-71, página 126.
- 2009 – Bechara, EJJ; Sartori, A; Dutra, F; Sogayar, MC; Garay-Malpartida, HM; Forni, MF; Aminoacetone causes oxidative stress and death to insulin-producing RINm5f cells. 3rd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome - (Nice, França). Journal of Diabetes, volume 1, 2009, página A264.

- 2009 – Sartori, A; Mano, CM; Nantes, IL; Nascimento, OR; Bechara, EJH; Oxidative damage to cytochrome *c* induced by aminoacetone. VI Meeting of the SFRBM - South American Group (Santiago - Chile). Congress Book, resumo 098, página 104.
- 2009 – Sartori, A; Forni, MF; Mano, C; Lahos, R; Colepicolo, P; Sogayar, MC; Bechara, EJH; Aminoacetone increases NO levels in pancreatic beta-cell lineages and cytochrome *c* oxidative damage. 16th Annual Meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine (Indianapolis – EUA). Volume 47, supplement 1, 2009 – Free Radical in biology and Medicine, Resumo 227, página S88.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

- 2007 - II Curso de Verão de Bioquímica e Biologia Molecular no IQ-USP para alunos de graduação, com a orientação do Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres.
- 2009 – 1º Encontro dos Alunos de Pós-Graduação do IQ-USP, 13-14 de Agosto de 2009, com a orientação dos Professores Drs. Maurício da Silva Baptista e Josef Wilhelm Baader.

INFORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- 2005 - 2008 – Representante Discente no Conselho do Departamento de Bioquímica – IQ-USP.
- 2008 - 2009 – Representante Discente na Congregação do IQ-USP.