

# RADICAIS LIVRES DE OXIGÉNIO E COMPLICAÇÕES DA DIABETES

MARIA S. AZEVEDO, CARLOS MANSO

Instituto de Química Fisiológica. Faculdade de Medicina. Lisboa.

## RESUMO

Faz-se um resumo da evidência em que se baseia a hipótese actual de que a hiperglicemia é o principal causador das complicações crónicas da diabetes, através da indução de um stress oxidativo.

## SUMMARY

### Oxygen free radicals and diabetes complications

The Author makes a summary of the evidence which is the basis of the hypothesis that hyperglycemia is the main cause of chronic diabetic complications, due to the induction of an oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

No organismo humano existem células sensíveis à insulina e células insensíveis. No primeiro grupo temos o adipócito e a célula muscular estriada. Nestas a insulina activa a entrada de glucose e também diversas vias metabólicas, fosforilação da glucose, síntese do glicogénio, glicólise, vias das fosfopentoses, ciclo de Krebs, síntese de ácidos gordos, de ácidos nucleicos e proteínas. Antes da insulina estar disponível era a falência destes processos que estava na base da hiperglicemia, da cetonemia e da acidose.

O advento da insulina veio diminuir a frequência da morte em cetacidose. Contudo a doentes diabéticos passaram a sofrer de complicações crónicas de outra natureza, à medida que a sua duração de vida aumentava. Eram precisamente os tecidos com células insulino independentes os mais afectados. Nestas células a glucose penetra livremente e o excedente não fosforilado entra na via dos poliois:

A formação de sorbitol tinha como consequência o aumento de pressão osmótica intracelular, a que se seguia a entrada de água e o inchaço celular, de que resultava a degenerescência e lesões dos vasos sanguíneos, do rim, da retina, do cristalino e do sistema nervoso, no fundo os principais órgãos afectados pelas complicações crónicas da diabetes. A utilização de inibidores da aldose redutase teve efeitos benéficos, pelo menos na diabetes experimental. Explicava-se a sua acção através da menor produção de sorbitol<sup>1-3</sup>.

Contudo cedo se verificou que o problema não estava esclarecido. Por um lado a acção da aldoserredutase era acompanhada da oxidação do coenzima II, o que impedia a redução do glutatião oxidado, ao passo que da acção da desidrogenase do sorbitol resultava a formação de frutose, um potente oxidante, com acções metabólicas variadas (hipoglicemia, etc). Por outro lado os inibidores da aldose redutase eram potentes neutralizadores de radicais livres e a sua acção terapêutica poderia ser devida a este facto<sup>4</sup>.

A importância da vida dos poliois como causadora das complicações crónicas da diabetes estava assim posta em dúvida, tanto mais que o próprio sorbitol é um bom captador de radicais livres.

Em 1988 Azevedo et al. demonstraram que os compostos de Amadori obtidos através da glicosilação não enzimática de aminoácidos e de péptidos gravam radical superóxido e emitiram a hipótese de que a glucose livre intracelular iria glicosilar proteínas e que seria a geração de radicais livres

pelos proteínas glicosiladas intracelulares a verdadeira causa das complicações crónicas da diabetes<sup>5,6</sup>. Esta geração de radicais era inibida por compostos como formato, salicilato e ibuprofen<sup>7</sup>. Foram feitos em seguida estudos sobre a capacidade de diversos açúcares, aminoácidos e polipéptidos na geração de radical superóxido, verificando-se que a ribose era o açúcar mais potente, sendo bastante activa a frutose e pouco a glucose e a galactose<sup>8</sup>.

Estes estudos foram confirmados por outros Autores<sup>9,10</sup> e iniciaram o interesse pela geração de radicais livres como causadores das complicações crónicas da diabetes.

Porém não é apenas no capítulo das complicações crónicas da diabetes que interferem radicais livres. Na própria etiologia da doença se admite a existência de um stress oxidativo. Este está bem demonstrado na diabetes experimental pela aloxana ou pela estreptozotocina (STZ) e é sugerido na diabetes humana. O nosso objectivo neste trabalho é rever a literatura que relaciona a geração de radicais livres tanto com as complicações crónicas da diabetes como com a sua indução experimental ou no ser humano.

**A formação de Compostos de Maillard** — Em 1912 Louis Camille Maillard aquecia 1 parte de glicina e 4 partes de glucose em água. Ao fim de 10 minutos surge uma cor amarelada e depois castanha. Ao mesmo tempo forma-se CO<sub>2</sub>. O mesmo sucede incubando outros aminoácidos (a alanina é o mais activo) com outros açúcares (a xilose e arabinose reagem instantaneamente, a frutose, galactose, glucose, manose reagem depressa, a lactose e a maltose lentamente, a sacarose não reage durante horas). Maillard sugeriu a hipótese de que os açúcares destroem os aminoácidos, cuja excreção é aumentada na diabetes. Mais tarde verificou-se que as proteínas dos alimentos armazenados na presença de açúcares redutores sofrem um processo de envelhecimento, caracterizado pelo aparecimento de cor castanha e formação de ligações cruzadas, que afectam a sua actividade biológica<sup>11</sup>. Eram iniciadores da reacção de Maillard aldoses, cetoses e ainda outros compostos quimicamente relacionados, como o ascorbato, hexosaminas, etc, que reagem com moléculas contendo grupos amina livres (proteínas, aminoácidos, aminas, ácidos nucleicos, fosfolípidos)<sup>1</sup>. Com o tempo veio a verificar-se que estas reacções tinham uma sequência de etapas (Fig. 1).

1 — condensação de aldeído ou cetona com grupo amina livre, formando uma base de Schiff reversível.

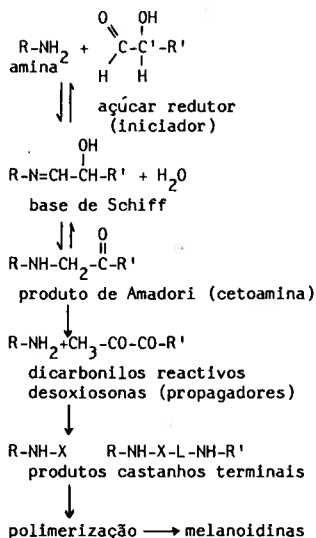


Fig. 1 — Esquema geral da reacção de Maillard.

- 2 — rearranjo de Amadori irreversível em cetoamina.
- 3 — degradação em dicarbonilos, mais reactivos, que actuam como propagadores (as desoxiglucononas).
- 4 — formação de ligações cruzadas e polimerização em melanoidinas de cor acastanhada.

As desoxiglucononas (1 ou 3) são extremamente reactivas. Podem originar formações de anéis, enolização, desidratação, fissão de ligações de carbono, etc<sup>12</sup>.

Os compostos desoxi podem assim formar furfuraldeído, piranonas, pirrois, piridinas, pirrolinonas, que no seu conjunto são compostos castanhos fluorescentes, que polimerizam em melanoidinas (provavelmente não in vivo). Produtos de Maillard são absorvidos diariamente com os alimentos e influenciam as funções das proteínas<sup>12</sup>.

Também se formam produtos de Maillard na preparação dos alimentos, em especial nos assados. O espectro de compostos aromáticos depende da relação açúcar/aminas, da temperatura e do meio de reacção (condimentos). Os principais produtos formados nestas condições são furanos, furanonas, piranonas, carbonilos alifáticos e cíclicos, etc<sup>13</sup>.

Por outro lado a reacção de Maillard em alimentos preservados origina a perda de aminoácidos essenciais, a destruição de vitaminas (B<sub>1</sub>, B<sub>7</sub>, B<sub>12</sub>, ac. pantoténico). Isto é essencialmente importante em alimentos para crianças<sup>14</sup>.

**A glicosilação não enzimática de proteínas no diabético** — In vivo a glucose condensa lentamente com o grupo amina de proteínas, formando uma base de Schiff reversível que sofre um rearranjo de Amadori irreversível formando cetoamina. Esta degrada-se em  $\alpha$ -cetoaldeídos (as 1- ou 3-desoxiglucononas) mais reactivos para as proteínas que os monossacaridos, dando origem a ligações cruzadas e a adutos corados ou fluorescentes, os AGE (advanced glycation end products) que dão cor acastanhada às proteínas (Fig. 2)<sup>15,16</sup>.

A reacção de glucose com lisina de proteínas origina a formação de frutose-lisina, que se decompõe em ácido eritrónico e carboximetil-lisina ou, na alternativa, formação de furosina (Fig. 3).

A carboximetil-lisina acumula com a idade no cristalino e no colagénio. Na urina de diabéticos a concentração de frutose-lisina correlaciona com a concentração de hemoglobina glicosilada no sangue<sup>17</sup>.

**A geração de radicais livres na glicosilação não enzimática de proteínas** — Os açúcares do tipo  $\alpha$ -hidroxialdeído,

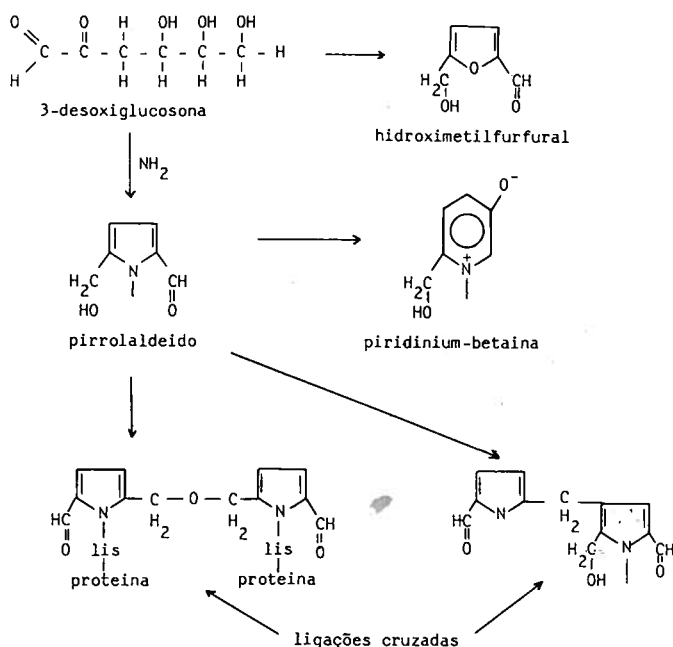


Fig. 2 — Transformações conhecidas da 3-desoxigluconona.

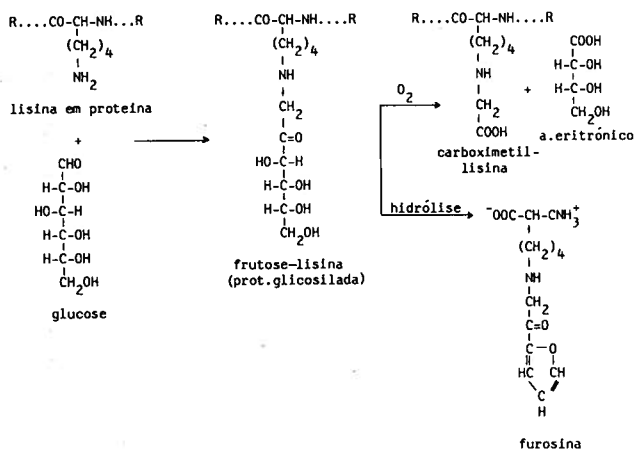


Fig. 3 — Reacção de glucose com lisina.

como a glucose, podem enolizar e reduzir o dióxigénio na presença de metais de transição, gerando  $\alpha$ -cetoaldeídos (dicarbonilos) e intermediários oxidantes. Neste processo geram-se radicais livres e peróxido de hidrogénio que podem contribuir para lesões proteicas (Fig. 4).

O  $\alpha$ -ceto-aldeído, tal como o hidroxialdeído pode reagir com proteínas e autooxidar dum modo semelhante ao hidroxialdeído, na presença de metais de transição.

**Autooxidação do gliceraldeído** — Outros monossacaridos também autooxidam em condições fisiológicas, formando dicarbonilos e peróxido de hidrogénio, que estimula a oxidação da oxihemoglobina em cerca de 20 vezes. Ele autooxida, consumindo oxigénio e gerando materiais que reagem com o sistema das glicoxalases<sup>18-20</sup>. Verificámos que a adição de 50mM de gliceraldeído a um sistema tamponado originava um elevado consumo de oxigénio, que era inibido por quelantes de metais (DETAPAC). O gliceraldeído inibia a ATPase total dos eritrocitos, assim como a NA/K-ATPase

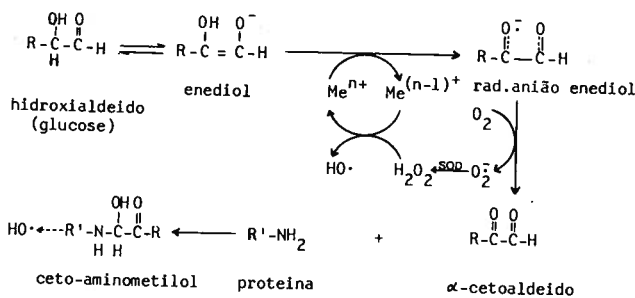


Fig. 4 — Geração de radicais livres por  $\alpha$ -hidroxialdeídos.

em 50% e a Mg-ATPase numa percentagem superior, o que era evitado por reagentes protectores de grupos SH (Fig. 5 a e b). Daí concluímos que havia oxidação de um grupo tiólico do centro/activo das ATPases<sup>21</sup>.

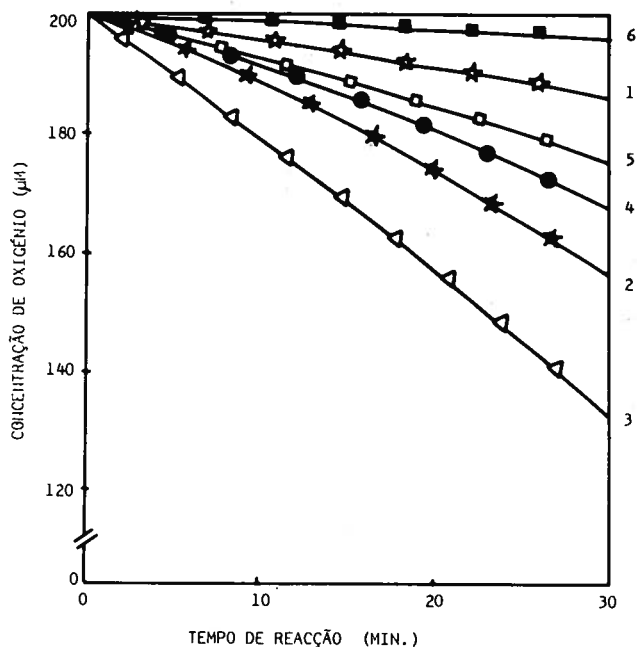


Fig. 5A — Consumo de  $\text{O}_2$  durante a autoxidação de 10mM de DL-gliceraldeído em 25mM (1), 50mM (2) e 100mM de tampão imidazol glicil-glicina. Efeito de SOD (4), Catalase (5) e DETAPAC (6), um quelante do ferro. Mira, Martinho, Azevedo, Manso: Bioch Bioph Acta, 1991; 1060: 257-261.

**Complicações da diabetes** — A glicosilação não enzimática de proteínas desempenha um papel de relevo nas complicações da diabetes. Ela origina oxidação de grupos tiólicos, formação de ligações cruzadas entre macromoléculas, alterações de imunogenicidade, das funções enzimáticas captação celular de macromoléculas<sup>22</sup>. Contudo não é só a glucose a responsável, pois outros açúcares podem glicosilar proteínas. É o caso da frutose, que incubada com albumina se liga a grupos amina de lisinas. Porém 85% liga-se à proteína pelo carbono 2 e o restante pelo carbono 1. Com a glucose apenas o carbono 1 se liga a grupos amina. Nas proteínas do cristalino 10 a 20% da glicosilação faz-se pelo  $\text{C}_2$  do açúcar, provavelmente, a partir de frutose endógena<sup>23</sup> (Fig. 6).

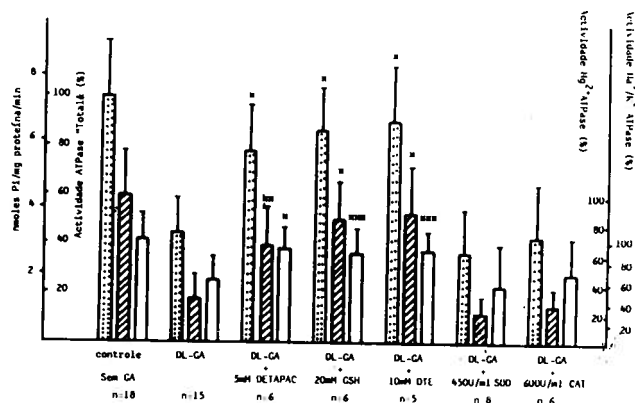


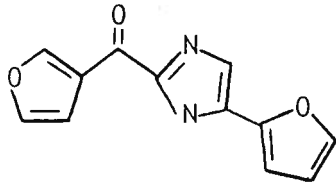
Fig. 5B — Efeitos do DETAPAC, GSH, ditioeritról, SOD e Catalase sobre as actividades ATPase de membranas incubadas com 10mM gliceraldeído ATPase total  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Mira, Martinho, Azevedo, Manso: Bioch Bioph Acta, 1991; 1060: 257-261.

É possível que a escolha da glucose como principal combustível metabólico não seja obra do acaso. Com efeito, medindo a velocidade de condensação de vários monossacáridos com grupos amina de hemoglobina verificou-se que a reactividade de cada açúcar depende da extensão em que ele existe na forma aberta (carbonilo) e não em anel (hemiacetal). De 15 monossacáridos testados, as aldoses tem maior reactividade que as cetoses, sendo a glucose a menos reactiva aldohexose. Justifica a escolha da glucose como combustível metabólico a grande estabilidade do anel, que limita a glicosilação não enzimática de proteínas<sup>24</sup> (Fig. 7).

A glicosilação não enzimática de lipoproteínas tem consequências adversas. As LDL glicosiladas são dificilmente reconhecidas por receptores, diminuindo a velocidade da sua depuração. Porém nalguns doentes há um aumento paradoxal da depuração, o que é devido à presença no plasma de anticorpos contra LDL glicosiladas. Estes anticorpos tem reacções cruzadas contra outras proteínas glicosiladas, pois reconhecem o epitopo glucose-lisina<sup>25</sup>.

Em proteínas com glicosilação avançada detectam-se pirrois entre os quais a E-caproil-pirralina que funciona como hapteno. Ligada à polilisina e injectada em coelhos origina a formação de elevados títulos de anticorpos. Admite-se que os pirrois derivados da glucose desempenham um papel na neuropatia diabética<sup>26</sup>. A glicosilação das HDL inibe a união de alta afinidade a células em cultura, o que interfere com o efluxo de colesterol. Nestas condições a HDL glicosilada tem menos capacidade para remover o colesterol das células. As HDL glicosiladas pode contribuir para acelerar o aparecimento de aterosclerose<sup>27</sup>. Certos enzimas são inactivados pela glucose. Entre estes encontra-se a superóxido dismutase que tem lisinas (Lis<sup>122</sup> e Lis<sup>128</sup>) junto ao centro activo. A sua glicosilação é acompanhada de inactivação gradual da SOD<sup>28</sup>. Pessoalmente verificámos que as glioxalases importantes na degradação de  $\alpha$ -cetoaldeídos, também são inactivadas na diabetes experimental, possivelmente pela mesma razão<sup>29</sup>. Vemos pois que na diabetes existe stress oxidativo e estão afectados os meios de o combater. A evidência de stress oxidativo na diabetes é diversa. Por exemplo o aumento de lipoperoxidação das membranas dos eritrocitos de diabéticos. Esta lipoperoxidação está correlacionada com a concentração de hemoglobina glicosilada. Ela resulta da enolização da glucose, que reduz o oxigênio a superóxido e forma cetoaldeídos e radical hidroxilo<sup>30</sup>. Também existe diminuição de ascorbato no plasma de ratos diabéticos por





glucose 2 lisinas glucose

Fig. 9 — Furoil-furanil-imidazol (FFI).

$H_2O_2$ , que é decomposto na presença de metais de transição, formando radical hidroxilo<sup>50</sup>.

A estreptozotocina também é um gerador de radicais livres (Fig. 11). Vemos assim que estas drogas, uma vez administradas ao animal de experiência, vão para o pâncreas e na célula B sofrem processos que levam à geração de radicais livres.

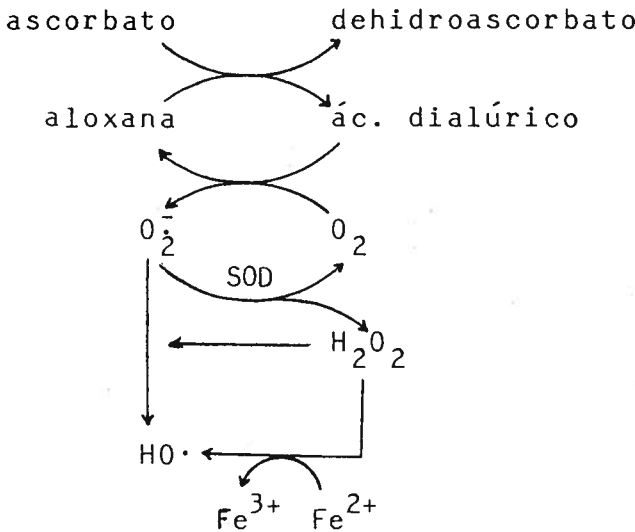


Fig. 10 — Aloxana.

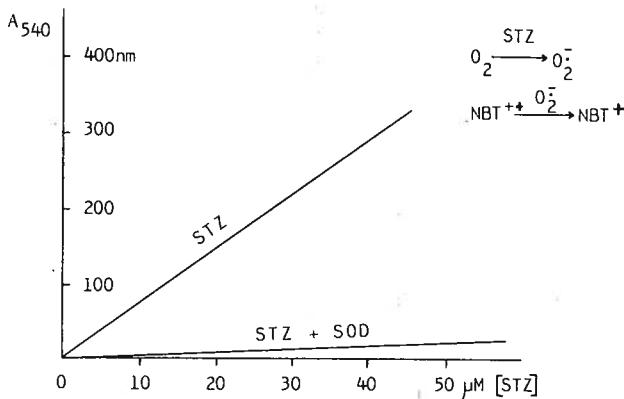


Fig. 11 — Estreptozotocina.

Uma prova indirecta da geração de radicais livres é o aumento local de histamina, que é libertada por acção do superóxido sobre as células<sup>51</sup>.

**Mecanismos de defesa** — Temos a considerar em primeiro lugar o conjunto de sistemas neutralizadores de radicais livres, superóxido dismutase, catalase, peroxidase do glutationo, carotenoides, tocoferois, ascorbato. Estes sistemas são altamente eficazes e inclusivamente protegem os embriões contra o aparecimento de malformação congénitas<sup>52</sup>.

Por outro lado temos os sistemas que removem dicarbonilos. Já referimos a aldeído desidrogenase do fígado. Contudo nos últimos tempos tem sido especialmente estudado o sistema das glioxalases I e II. Este sistema já é conhecido de longa data e tem sido estudado ultimamente por Thornalley, que se interessou pela sua importância na diabetes.

O nome glioxalases (glo) provem do facto de ter sido inicialmente demonstrada a sua acção sobre o dicarbonilo das trioses, o metilglioxal ( $CH_2CO-CHO$ ). Contudo elas são activas sobre dicarbonilos de maior peso molecular. Vejamos o seu modo de acção.

1 — dá-se a união do dicarbonilo com glutatião reduzido (GSH):

2 — a glioxalase I cataliza a formação de S-D-lactoilglutatião.

3 — a glioxilase II cataliza a hidrólise de S-D-lactoilglutatião, formando ácido láctico e recuperando o glutatião reduzido:

Vemos assim dois aspectos importantes: a transformação do metilglioxal tóxico em ácido láctico, facilmente metabolizável, e também a utilização de glutatião reduzido, que é recuperado no fim (Fig. 12).

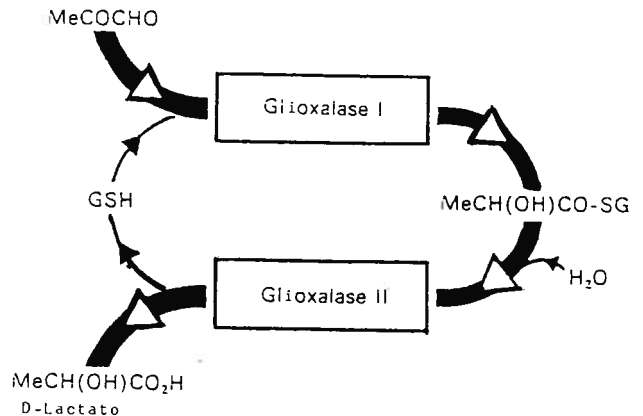


Fig. 12 — O sistema das glioxalases.

Este sistema é económico, na medida em que não há perda do potencial redutor representando pelo glutatião reduzido. O sistema das glioxalases está presente no citosol das células e organitos celulares, em especial mitocondrias. Intervem no crescimento celular e há evidência da sua alteração na diabetes. Em glóbulos vermelhos incubados com glucose, o fluxo de metilglioxal para lactato aumenta. Na diabetes clínica humana o metilglioxal e o lactoilglutatião estão elevados no sangue. Em estudos realizados em Portugal não se detectou alterações de actividade da glioxalase I nos glóbulos vermelhos de diabéticos em comparação com controlos normais<sup>51-56</sup>. Contudo verificou-se uma diminuição de actividade de ambas as glioxalases no fígado de ratos tornados diabéticos com estreptozotocina<sup>56</sup>. Em ratos com diabetes experimental a glicosilação das proteínas do cristalino é 8 vezes mais intensa do que a das proteínas do plasma. Sugeriu-se que este facto seria devido à presença de compostos inibidores da glioxalase no cristalino, que assim teria bloqueada a sua acção protectora<sup>58</sup>.

## DISCUSSÃO

Já desde o início do século XX se sabia que os açúcares reagem com compostos contendo grupos amina livres, proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, fosfolípidos da membrana, etc., originando compostos glicosilados que sofrem transformações várias, incluindo a formação de dicarbonilos altamente reactivos, susceptíveis de fazer ligações cruzadas, gerar radicais livres e inactivar diversos compostos de importância biológica. Estes compostos são obtidos em proporções diversas durante a confecção dos alimentos, a que dão o aroma e o sabor.

Contudo mais importante é o facto de eles também se formarem no organismo humano, em pequenas quantidades se a glicemia é normal, ou em quantidades maiores se está elevada, caso da diabetes. As proteínas glicosiladas no organismo são alteradas e tornam-se activas como antígenos contra os quais se produzem anticorpos. Os diversos açúcares tem capacidades diferentes de reagir com grupos amina. Um dos menos reactivos é a glucose. Talvez por isso, ela fosse seleccionada como combustível celular, pois o facto de se encontrar predominantemente em forma cíclica torna-a menos agressiva para as proteínas. Os açúcares livres são susceptíveis de formação de enedíois, que geram superóxido na presença de metais de transição. Também os compostos de Amadori são susceptíveis de produzir este radical. Contudo a autoxidação de trioses é muito mais eficaz neste aspecto. Temos assim uma série de compostos que iniciam o stress oxidativo em diabéticos. A estes há a adicionar  $\alpha$ -cetoaldeídos vários, susceptíveis de autoxidar ou de reagirem de modos não totalmente conhecidos e de grande agressividade, intensificando a formação de ligações cruzadas. Estas são especialmente importantes em proteínas de longa duração. Contudo a glicosilação de enzimas protectoras, casos da SOD e das gioxalases, inactivando-as também vai interferir com a sua eficácia, agravando a situação. Certamente existem mecanismos protectores encarregados de proteger o indivíduo contra a agressividade dos açúcares. Ainda pouco se sabe sobre este assunto. O sistema das glioxalases, que neutraliza dicarbonilos, regenerando glutatião reduzido parece ter grande importância. Certamente haverá outros mecanismos de defesa, que justificam a sobrevivência do indivíduo, apesar da quantidade maciça de substâncias tóxicas que produz. Eles serão conhecidos a pouco e pouco e um dia dar-nos-ão um panorama dos mecanismos de agressão e defesa a que o homem está sujeito, devido ao seu condicionalismo de ter de usar glucose para a formação de energia no organismo.

## BIBLIOGRAFIA

1. AZEVEDO M.S.: Complicações crónicas da diabetes I. Acta Médica Portuguesa 1986; 7: 55-61.
2. AZEVEDO M.S.: Complicações crónicas da diabetes II. Acta Médica Portuguesa 1986; 7: 177-182.
3. SANTOS J., FREIRE A.P., MIRA L.B., AZEVEDO M., MANSO C.: Metabolismo do sorbitol e diabetes. Acta Médica Portuguesa 1984; 5: 241-249.
4. MIRA M.L., AZEVEDO M.S., MANSO C.F.: The neutralization of hydroxyl radical by silibin, sorbinil and bendazac. Free Rad Res Comm 1986; 4: 125-129.
5. AZEVEDO M.S., FALCÃO J., RAPOSO J., MANSO C.: Superoxide radical generation by Amadori compounds. Free Rad Res Comm. 1988; 4: 331-335.
6. AZEVEDO M.S., MANSO C.F.: Oxygen radical generation by Maillard compounds. J Diabetes Complications 1986; 2: 19-21.
7. AZEVEDO M.S., MANSO C.F.: Inhibition of nonenzymatic glycosylation of proteins by different compounds. Diabetologia 1986; 29: 531 A.
8. AZEVEDO M.S., MANSO C.F.: Generation of superoxide radical by reducing sugars, aminosugars and Amadori compounds. Diabetologia 1988; 31: 466 A.
9. SAKURAI T., TSUCHIYA S.: Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. FEBS letters 1988; 236: 406-410.
10. MULLARKEY C., EDELSTEIN D., BROWNLEE M.: Free radical generation by early glycation products. A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. Biochem Bioph Res Comm 1990; 173: 932-939.
11. MONNIER V.: Toward a Maillard reaction theory of aging. The Maillard Reaction, in Aging, Diabetes and Nutrition, ed. J Baynes, V Monnier, Alan Liss, New York 1989; 1-22.
12. LEDL F., BECK J., SENGL M., OSIANDER H., ESTENDORFER S., SEVERIN T., HUBER B.: Chemical pathways of the Maillard reaction. In Diabetes and Nutrition, ed J Baynes, V Monnier, Alain Liss, New York 1989; 1-22.
13. BALTES W.: Roast aroma formation. The role of aminoacids during the Maillard reaction. The Maillard Reaction. Advances in Life Sciences 1990; 43-61.
14. HURRELL R.: Influence of Maillard reaction on the nutritional value of foods. Advances in Life Sciences 1990; 43-61.
15. HUNT J., DEAN R., WOLF S.: Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Biochem J 1988; 256: 205-212.
16. WOLF S., JIANG Z., HUNT J.: Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. Free Rad Biol Med 1991; 10: 339-352.
17. KNECHT K., DUNN J., MCFARLAND K., MCKANCE D., LYONS T., THORPE S., BAYNES J.: Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. Diabetes 1991; 40: 190-196.
18. WOLF S., CRABBE M., THORNALLEY P.: The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides. Experientia 1984; 40: 244-246.
19. THORNALLEY P., STERN A.: The effect of glyceraldehyde on red cells. Biochem Bioph Acta 1984; 804: 308-323.
20. THORNALLEY P., WOLF S., CRABBE J., STERN A.: The oxidation of oxyhemoglobin by glyceraldehyde and other simple monosaccharides. Biochem J 1984; 217: 615-622.
21. MIRA M., MARTINHO, F. AZEVEDO M., MANSO C.: Oxidative inhibition of red blood cell ATPases by glyceraldehyde. Biochim Bioph Acta (em publicação).
22. EDITORIAL: Browning and diabetic complications. The Lancet 1986; Maio 24: 1192-1193.
23. MC PHERSON J., SHILTON B., WALTON D.: Role of fructose in glycation and cross linking of proteins. Biochemistry 1988; 27: 1901-1907.
24. BUNN F., HIGGINS P.: Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. Science 1981; 213: 222-224.
25. WITZUM J., STEINBRECHER U., KESANIEMI A., FISHER M.: Auto-antibodies to glycosylated proteins in the plasma of patients with diabetes mellitus. Proc Nat Ac Sciences 1984; 81: 3204-3208.
26. HAYASE F., NAGARAG R., MIYATA S., NJOROG F., MONNIER V.: Aging of proteins immunological detection of a glucose derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. J Biol Chem 1989; 263: 3758-3764.
27. DUELL B., ORAM J., BIERMAN E.: Non enzymatic glycosylation of HDL and impaired HDL-receptor mediated cholesterol efflux. Diabetes 1991; 40: 377-384.
28. ARAI K., MAGUSHI S., FUJII S., ISHIBASHI H., OIKAWA K., TAMIGUCHI N.: Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. J Biol Chem 1987; 262: 16969-16972.
29. AZEVEDO M., SILVA I., NETO I., RAPOSO J., FALCÃO J., MANSO C.: An chronic diabetes complications due to oxidative stress? Diabetes 1991, 40: (supl I), com 2097, pg 525 A.
30. JAIN S., MCVIE R., DUETT J., HERBST J.: Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. Diabetes 1989; 38: 1539-1543.
31. YUE D., MCLENNAN S., FISHER E., HEFFERNAN S., CAPOGRECO C., ROSS G., TURTLE J.: Ascorbic acid metabolism and polyol pathway in diabetes. Diabetes 1989; 38: 257-261.
32. SINCLAIR A., GIRLING A., GRAY L., GNEN C., LUNEC J., BARNETT A.: Disturbed handling of ascorbic acid in diabetic patients with and without microangiopathy during high dose ascorbate supplementation. Diabetologia 1991; 34: 171-175.
33. MCLENNAN S., HEFFERNAN S., WRIGHT L., RAE C., FISHER E., YUE D., TURTLE J.: Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. Diabetes 1991; 40: 344-348.

34. HUNT J., SMITH C., WOLFF S.: Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes* 1990; 39: 1420-1424.
35. LEE J., SHIN D., LUPOVITCH A., SHI D.: Glycosylation of lens proteins in senile cataract and diabetes mellitus. *BBRC* 1984; 123: 888-893.
36. LIANG J., CHYLACK L.: Change in protein tertiary structure with non-enzymatic glycosylation of calf  $\alpha$ -crystallin. *BBRC* 1984; 123: 899-906.
37. LIANG J., HERSHORIN L., CHYLACK L.: Non-enzymatic glycosylation in human diabetic lens crystallins. *Diabetologia* 1986; 29: 225-228.
38. DUHAIMEN A., RABBANI N., COTLIER E.: Camel lens crystallins glycosylation and high molecular weight aggregate formation in the presence of ferrous ions and glucose. *BBRC* 1990; 173: 823-832.
39. MONNIER V.: The paradoxical effects of the Maillard reaction in vivo impaired maturation and accelerated aging of collagen. In Fujikami M, Namiki M, Kato H. Amino-carbonyl reactions in food and biological systems, Elsevier 1986; 459-474.
40. HICKS M., DELBIDGE L., YUE D., REEVE T.: Increase in cross-linking of nonenzymatically glycosylated collagen induced by products of lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1989; 268: 249-254.
41. MENZEL E., REIHSNER R.: Alterations of biochemical and biochemical properties of rat tail tendons caused by nonenzymatic glycation and their inhibition by dibasic aminoacids arginine and lysine. *Diabetologia* 1991; 34: 12-16.
42. BAYNES J.: Role oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
43. NICHOLLS K., MANDEL T.: Advanced glycosylation end-products in experimental murine diabetic nephropathy. *Laboratory investigation* 1989; 60: 486-491.
44. IGAKI N., SAKAI M., HATA H., OIMONI M., BABA S., KATO H.: Effects of 3-deoxiglucosone on the Maillard reaction. *Clin Chem* 1990; 36: 631-634.
45. WOLFF S., DEAN R.: Aldehydes and dicarbonyls in nonenzymatic glycosylation of proteins. *Biochem J* 1988; 249: 618-619.
46. EBLE A., THORPE S., BAYNES J.: Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross linking of proteins. *J Biol Chem* 1983; 258: 9406-9412.
47. BROWNLEE M., CERAMI A., VLASSARA H.: Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetes complications. *NEJ Medicine* 1988; 318: 1315-1320.
48. CERAMI A.: Glucose as a mediator of aging. *J American Geriatrics Society* 1985; 33: 626-634.
49. MONNIER V., SELL D., MIYATA S., NAGARAJ R.: The Maillard reaction as a basis for a theory of aging. In the Maillard Reaction, *Adv. Life Sciences* 1990; Birkhauser 393-414.
50. AZEVEDO M.: Estudo de alguns aspectos bioquímicos da diabetes mellitus humana e experimental. Tese de doutoramento Lisboa 1981; 423-456.
51. AZEVEDO M., SILVA I., RAPOSO J., FALCÃO J.: Early increase in histamine concentration in isolated Langerhans islets, from rats made diabetic with streptozotocin. *Diabetologia* 1989; 32: 463 com 22.
52. ERICKSON U., BORG L.: Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose induced embryonic malformations in vitro. *Diabetologia* 1991; 34: 325-331.
53. THORNALLEY P.: The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway, fundamental to biological life. *Biochemical J* 1990; 269: 1-11.
54. AZEVEDO M.: Importância do sistema das glioxalases. *Arq Port Ciências Biológicas* 1987; 21: 1-19.
55. PÓVOA P., NETO I., DUARTE R., AZEVEDO M., MANSO C.: Actividade da glioxalase I dos glóbulos vermelhos e dos glóbulos brancos em doentes diabéticos e sua comparação com um grupo controle. *Arq Port Ciências Biológicas* 1987; 21: 21-36.
56. NETO I., PÓVOA P., AZEVEDO M., MANSO C.: Autoxidação da glucose e sistema das glioxalases. *Arq Port Ciências Biológicas* 1987; 21: 37-55.
57. NETO I., AZEVEDO M., MANSO C.: Decreased liver glyoxalases activities in diabetic rats and possible relationship with Study Diabetes, Dublin 1991.
58. AZEVEDO M., NETO I., RAPOSO J., FALCÃO J., MANSO C.: Is the lens more sensitive to glycation than other tissues? *Diabetes Research and Clinical Practice* (em publicação).