

METILGLIOXAL: UMA TOXINA ENDÓGENA?#

Adriano Sartori

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo – SP, Brasil

Etelvino José Henriques Bechara*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo - SP / Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, R. Prof. Artur Riedel, 275, 09972-270 Diadema – SP, Brasil

Recebido em 10/6/10; aceito em 6/8/10; publicado na web em 20/10/10

IS METHYLGLYOXAL AN ENDOGENOUS TOXIN? Methylglyoxal is a very reactive α -oxoaldehyde putatively produced by glycolysis, cytochrome P₄₅₀-catalyzed acetone oxidation and aminoacetone oxidation. Methylglyoxal has been pointed as a substrate for the glyoxalase system ultimately energy-yielding pyruvate, but methylglyoxal is also a toxicant involved in protein aggregation and DNA modification. Controversial hypothesis on methylglyoxal as an anticancer agent, an energy-yielding glycolysis intermediates, and as a regulator of cell division have also been proposed. Methylglyoxal research focuses now on unveiling its biological properties and on the discovery of drugs capable to inhibit its toxic effects, principally in diabetes.

Keywords: methylglyoxal; glyoxalases; diabetes.

DIABETES: EPIDEMIOLOGIA, CLASSIFICAÇÃO E BIOQUÍMICA

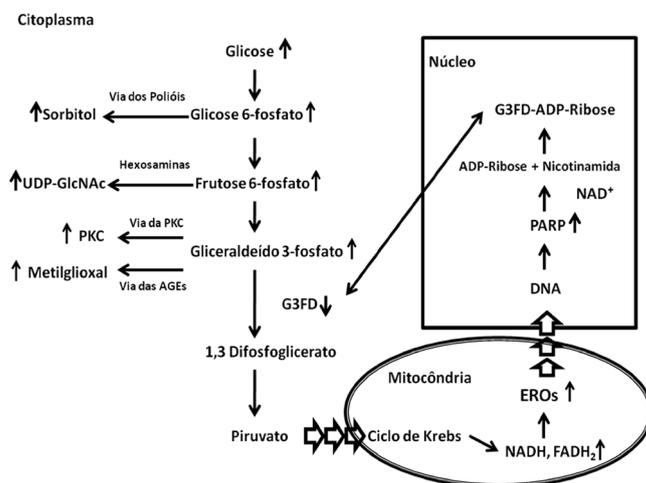
A história do diabetes *mellitus* remonta a aproximadamente 3.500 anos, desde sua descoberta, descrição e pesquisas sobre causas e tratamentos.¹ O número de casos da doença em todo mundo atingiu cerca de 171 milhões de pessoas em 2000 e pode chegar a mais de 350 milhões em 2030.² Apenas nos Estados Unidos, 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.³ O Ministério da Saúde do Brasil constatou, em 2009, que 5,2% da população adulta (acima dos 18 anos) é diabética.⁴

O estilo de vida sedentário aliado a uma má alimentação é o caminho mais curto para a aquisição do diabetes tipo 2,⁵ sendo os países em desenvolvimento os mais afetados pela doença, devido à adoção do estilo de vida rico em alimentos calóricos, cada vez mais parecido com o norte-americano.⁶ Por ser predominante, o diabetes tipo 2 é a forma que concentra maior número de estudos sobre seu desenvolvimento e tratamento.⁷ No que concerne ao diabetes tipo 1, uma doença autoimune, a hiperglicemia é o resultado da destruição das células produtoras de insulina.^{8,9} Por isso, ainda não há uma forma eficaz de tratamento da doença,¹⁰ mas o transplante de ilhotas é vislumbrado como uma das alternativas.¹¹ O primeiro transplante de ilhotas no Brasil foi realizado na cidade de São Paulo, pelo Hospital Albert Einstein, com a colaboração da Profa. Dra. Mari Sogayar do IQUSP.¹² Outro tratamento eficaz da doença poderá resultar das pesquisas sobre células-tronco.¹³

Todas as formas de diabetes são caracterizadas por hiperglicemia crônica e desenvolvimento de lesões à retina, nervos periféricos e glomérulos renais.¹⁴ O diabetes também é associado com o aceleramento da aterosclerose macrovascular, a qual afeta as artérias que suprem o coração, cérebro e os membros inferiores. Como resultado, pacientes com diabetes têm alto risco de sofrer infarto do miocárdio, amputações

de membros inferiores e acidente vascular cerebral (AVC).^{14,15} Danos que ocasionam disfunção mitocondrial são atualmente associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 2.^{16,17} Esses danos são precedidos por estresse oxidativo^{18,19} e sugerem a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) como um dos prováveis alvos de estudo para elucidar as bases moleculares e tratamento da doença.^{20,21}

Durante muitos anos, a relação entre hiperglicemia e desenvolvimento de patologias micro e macrovasculares não era totalmente entendida, porém, hoje há quatro hipóteses sobre como a hiperglicemia pode causar as complicações no diabetes (Esquema 1). São elas: aumento do fluxo na via de formação do sorbitol, a partir da ativação da enzima aldose reductase;²² formação dos produtos finais de glicação avançada



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. Adaptado da ref. 28. G3FD: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, PARP: Poli(ADP) ribose polimerase, EROs: Espécies reativas de oxigênio, UDP-GlcNac: UDP-N-acetil glucosamina, PKC: Proteína quinase c, AGEs: Advanced glycation end products

*e-mail: ebechara@iq.usp.br

#Artigo em homenagem ao Prof. Hans Vierter

(*advanced glycation end products*, AGEs), a partir da decomposição dos produtos de Amadori a um α -oxoaldeído, a 3-deoxiglucosona,²³ da autoxidação da glicose a glioxal²⁴ e da formação de metilglioxal,²⁵ também um α -oxoaldeído; ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC), a partir do aumento da concentração de diacilglicerol (DAG);²⁶ e aumento do fluxo metabólico 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 proteicos de transcrição, resultando em mudanças patogênicas na expressão gênica.²⁷

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 a estas hipóteses e, segundo, porque todas as tentativas de tratamento pontual a cada uma das hipóteses haviam falhado.²⁸ 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 ânion radical superóxido na mitocôndria, ativando o ciclo das hexosaminas²⁹ e que a normalização da produção do $O_2^{\bullet-}$ pelas mitocôndrias inibe a ativação das isoformas da PKC bem como a formação de AGEs e sorbitol.³⁰ Estes resultados corroboraram resultados anteriores de outros grupos de pesquisa, que ligavam a hiperglicemia ao desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo no diabetes.^{31,32}

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 se supõe comprometer o transporte de elétrons através do complexo III. Espera-se, conseqüentemente, aumento do “vazamento” de elétrons ao nível da coenzima Q da cadeia respiratória e, a partir daí, redução unieletrônica do oxigênio molecular ao $O_2^{\bullet-}$.³³

Estes dados permitiram conectar a ocorrência de elevadas concentrações do $O_2^{\bullet-}$ às quatro hipóteses!

Du e colaboradores reportaram que o aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ de fato acarreta diminuição da atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (G3FD), enzima da via glicolítica.²⁹ Sabe-se há mais de duas décadas que esta enzima pode ser inativada por H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ através da oxidação de grupos sulfidrilas presentes em seu sítio ativo.³⁴ Como esta inativação é reversível, este evento não se encaixava bem no modelo proposto para hiperglicemia/estresse oxidativo. Mais recentemente (2001), Garcia Soriano e colaboradores demonstraram que a hiperglicemia, através da elevada geração de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e de oxigênio (EROs), ativa a poli(ADP) ribose polimerase (PARP), uma enzima reparadora de DNA.³⁵ Considerando que 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^{36,37} e, há translocação bidirecional da enzima G3FD para o núcleo,^{38,39} foi proposto por Brownlee, em 2005,²⁸ que a ativação da PARP pela elevada concentração de espécies reativas, com conseqüente ligação dos polímeros de ADP-ribose à G3FD, seria o ponto de cruzamento entre as quatro hipóteses.

Neste contexto, é importante mencionar que Du e colaboradores já haviam demonstrado, em 2003, que ratos nocautes para a PARP, quando submetidos à hiperglicemia (30 mM de glicose), não apresentavam a enzima G3FD com os polímeros de ADP-ribose.⁴⁰ Porém, os animais não nocautes para PARP, em estado de hiperglicemia, tinham um aumento da ADP-ribosilação da enzima. Dessa maneira, a princípio, fica claro que a G3FD 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.

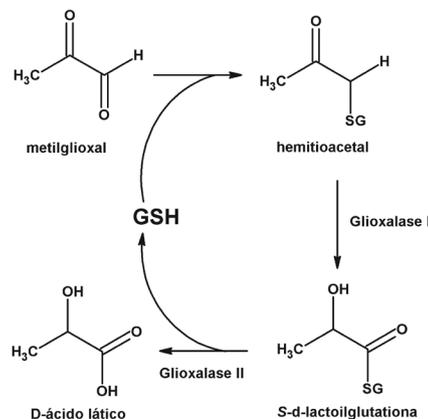
O CICLO DAS GLIOXALASES

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 quadro patológico.⁴¹ Doenças como o diabetes estão agora sendo associadas a um acúmulo destes compostos carbonílicos reativos, principalmente α -oxoaldeídos e aldeídos α,β -insaturados ou epoxidados, caracterizando-se um estado metabólico frequentemente denominado de “estresse carbonílico”.⁴²⁻⁴⁴ Metilglioxal,^{42,45} 4-hidroxi-2-nonenal (produto da peroxidação lipídica),⁴⁶ 3-deoxiglucosona⁴⁷ e aminoacetona^{48,49} são exemplos de catabólitos associados ao estresse carbonílico no diabetes.

Em especial, o estudo do papel do metilglioxal em diabetes tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, pois se trata de um potente agente eletrofílico modificador de proteínas e DNA,^{50,51} possivelmente associado à formação de adutos de Schiff e seus derivados, supostamente disparando as manifestações clínicas de neuropatia, nefropatia, retinopatia e arteriosclerose típicas de diabetes.^{25,52} A concentração plasmática de metilglioxal em indivíduos 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 2.⁵³ 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.⁵⁴ A identificação e determinação de metilglioxal em tecidos constitui ainda hoje um grande desafio para os químicos analíticos.

Os estudos com metilglioxal, o qual também é conhecido como pirvaldeído, aldeído pirúvico, 2-oxopropanal e acetilformaldeído, começaram no final do século XIX⁵⁵ e foram intensificados nas décadas seguintes, através da inserção equivocada do metilglioxal como um intermediário da via glicolítica.⁵⁶ Esta proposta foi baseada principalmente em trabalhos como os de Dakin e Dudley,⁵⁷ que mostraram maior quantidade de lactato de lactato (produto da fermentação láctica) e glicose (produto da neoglicogênese a partir de piruvato) na urina de coelhos tratados com injeções subcutâneas de metilglioxal. Além disso, relacionaram o acúmulo de metilglioxal ao diabetes visto que, além de o metilglioxal causar aumento de glicose na urina, se constatou que extratos de pâncreas de diferentes animais possuíam uma “atividade” capaz de inibir a geração de α -hidróxiácidos (como é o caso do ácido láctico) a partir de seus aldeídos correspondentes.⁵⁸

A produção de lactato através de metilglioxal foi atribuída ao ciclo das glioxalases (Esquema 2), o qual foi proposto, em 1913, de forma independente pelo pesquisador alemão Neuberg⁵⁹ e pelos pesquisadores ingleses Dakin e Dudley.⁶⁰ Ambos incluíram as glioxalases como



Esquema 2. Ciclo das glioxalases. GSH: glutationa reduzida, um metabolito tiólico

enzimas da via glicolítica. Dakin e Dudley propuseram a existência do ciclo ao observar maior quantidade de ácido mandélico na urina de coelhos tratados intraperitonealmente com fenilglicoxal,⁶⁰ enquanto Neuberg, tratando levedura e extratos de fígado e músculo de coelho com metilglicoxal, verificou a formação de lactato.⁵⁹ Ambos os grupos divergiam da rota de formação de lactato a partir do metilglicoxal; enquanto Dakin e Dudley propunham que o ciclo das glicoxalases era impulsionado por enzimas, Neuberg propôs um mecanismo químico de oxidação intramolecular do metilglicoxal, cujo resultado final é a conhecida reação de Cannizzaro (Figura 1).

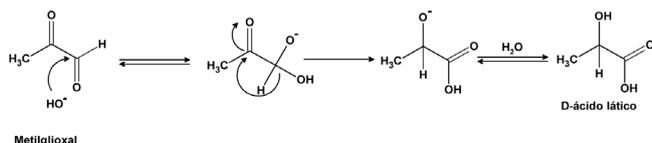


Figura 1. Formação de D-ácido láctico a partir de metilglicoxal, proposta por Neuberg,⁵⁹ utilizando a reação de Cannizzaro

Pouco tempo depois, verificou-se que a conversão de aldeídos aos seus correspondentes hidróxiácidos, através do ciclo das glicoxalases, era dependente de glutatona.⁶¹ Embden e colaboradores⁶² e Meyerhof⁶³ em seus primeiros trabalhos sobre a via glicolítica contrariavam a ideia de um intermediário, como o metilglicoxal, ao mostrarem que a formação de lactato no músculo era independente da geração de metilglicoxal. Isto fez com que as pesquisas envolvendo o metilglicoxal e o ciclo das glicoxalases perdesse crédito significativamente.

Apenas nos anos 60 foi que os estudos envolvendo metilglicoxal e glicoxalases voltaram à tona através do Prêmio Nobel Szent-Györgyi (1937, por pesquisas relacionadas à vitamina C), o qual afirmou que o ciclo das glicoxalases e o metilglicoxal estavam relacionados à divisão celular.⁶⁴ Szent-Györgyi utilizou a glândula timo para os estudos da glicoxalase no controle da divisão celular, baseado nos trabalhos de Gudernatsch⁶⁵ que mostravam que girinos alimentados com extrato de timo apresentaram metamorfose retardada, porém com hipertrofia corporal. Assim, acreditando que o extrato de timo possuía “atividade” para controlar a divisão celular, em 1960, Szent-Györgyi mostrou que culturas de células tratadas com extratos da glândula tinham seu crescimento inibido, porém, em alguns casos esse crescimento era acelerado. A estas atividades de inibição e ativação do crescimento foram dados os nomes de “retina” e “promina”, respectivamente.⁶⁶ Isolando-se a porção do timo com atividade de “retina”, verificou-se que camundongos com câncer experimental sofriam redução do tumor se tratados com “retina”.⁶⁷ Esta atividade “retina” do timo foi então proposta como um possível agente anticancerígeno.

Depois da descoberta das atividades de “retina” e “promina” em diversos tecidos,⁶⁸ passou-se então à identificação destes fatores. Pouco tempo depois da descrição destas atividades por Szent-Györgyi, o cientista Együd, do Instituto de Pesquisas do Músculo e Laboratório de Biologia Marinha de Massachusetts, EUA, analisou os extratos purificados com atividade “retina” por espectroscopia no infravermelho e propôs que se tratava de um derivado de glicoxal.⁶⁹ Mais tarde essa proposta foi confirmada ao se utilizar 2,4-difenil-hidrazina, conhecido nucleófilo de aldeídos, em extratos de fígado de rato.⁷⁰ Os resultados obtidos corroboraram a proposta de Dakin, Dudley e Neuberg de que aldeídos são ativadores do ciclo das glicoxalases. Szent-Györgyi, conhecendo os trabalhos de Schubert⁷¹ e Lohmann,⁶¹ em que se constatou que metilglicoxal era capaz de reagir com o grupo sulfidrila de cisteína e que o ciclo era dependente de glutatona reduzida (GSH), propôs que o derivado de glicoxal encontrado nos trabalhos anteriores era o metilglicoxal,⁷² o que foi confirmado posteriormente.^{73,74} Estes trabalhos também mostraram que a porção “promina”, na verdade,

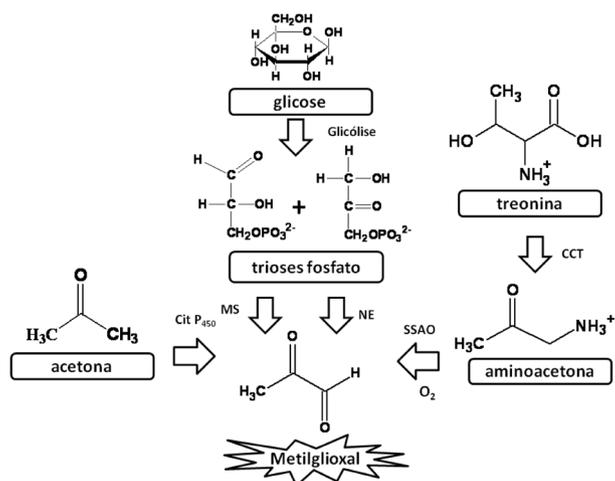
eram as enzimas denominadas como glicoxalases e que, de fato, o ciclo era dependente de GSH.⁷⁴

A participação do ciclo das glicoxalases no controle do ciclo celular é muito controversa e de certo modo parece descartada, pois nos dias atuais, com as revelações propiciadas pelas técnicas de biologia molecular, compreende-se que mais provável é a divisão celular ser controlada por outros fatores como as ciclinas dependentes de quinases (CDKs) e pelos “pontos de controle” (*checkpoints*)⁷⁵ exercidos por outras enzimas.

Deve-se também destacar a possível ação anticarcinogênica do metilglicoxal (“retina”) sugerida por Szent-Györgyi. Este acreditava que a proliferação celular era determinada pelo balanço entre a produção de metilglicoxal e a atividade das glicoxalases.⁷⁶ De fato, muitos estudos demonstraram que o metilglicoxal é um agente mutagênico, capaz de alterar bases de DNA pela formação de etanoadutos com nucleobases.⁵⁰ Por outro lado, a atividade e expressão gênica das glicoxalases I e II em células tumorais é ainda objeto de controvérsia, visto que em alguns trabalhos a atividade e expressão gênica estão aumentadas, em outros, diminuídas ou não se diferem se comparadas às mesmas células não tumorais.⁷⁷⁻⁸⁰

METILGLIOXAL, REAÇÃO DE MAILLARD E AGES

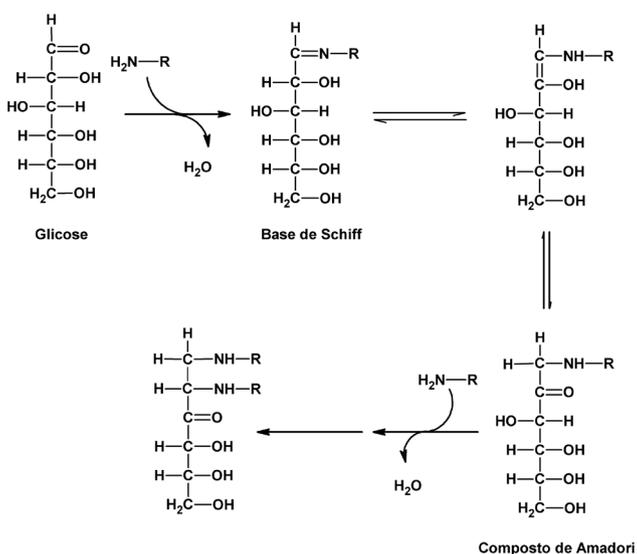
Apesar de o ciclo das glicoxalases não se enquadrar no modelo de regulação celular acreditado atualmente, esta via metabólica ganhou importância quanto à sua capacidade detoxificadora do metilglicoxal, o qual é associado a diversas desordens no diabetes.⁸¹ Foram identificadas três principais rotas de formação do metilglicoxal *in vivo* (Esquema 3), quais sejam, a partir da: via glicolítica, pela decomposição espontânea da di-hidroxicetona fosfato ou sua conversão a metilglicoxal pela enzima metilglicoxal sintase;⁸² hidroxilação da acetona, via citocromo P450IIIE isoenzimas⁸³ e, da oxidação aeróbica de aminoacetona, catalisada por íons de metais de transição⁸⁴ ou por uma aminoxidase sensível à semicarbazida (SSAO).⁸⁵ Aminoacetona, por sua vez, é supostamente formada a partir de treonina e glicina e sua oxidação gera, além de metilglicoxal, íons amônio e peróxido de hidrogênio, todos eles tóxicos a culturas de células se administrados em concentrações micro a milimolar. A título de curiosidade, o metilglicoxal também tem sido detectado como constituinte em água de chuva,⁸⁶ em fumaça de cigarro⁸⁷ e biscoitos,⁸⁸ além de mel, onde sua presença é associada à sua ação antimicrobiana.⁸⁹



Esquema 3. Rotas metabólicas de formação do metilglicoxal. CCT: Complexo de clivagem da treonina; SSAO: Semicarbazide sensitive amine oxidase; NE: Não enzimático; MS: metilglicoxal sintetase; Cit P₄₅₀: Citocromo P₄₅₀. Adaptado da ref. 48

A citotoxicidade do metilglicoxal é principalmente atribuída à formação de AGEs, os quais são fragmentos estáveis de proteínas danificadas por metilglicoxal, formados inicialmente por reação de Schiff entre o metilglicoxal e os grupos amino e sulfidrila de aminoácidos como lisina, arginina e cisteína.⁵² Os AGEs formados ligam-se aos RAGEs (receptores de AGEs), expressos em vários tipos de células,⁹⁰ disparando uma série de eventos patológicos.⁹¹

Os AGEs, propostos como biomarcadores de diabetes, aterosclerose, câncer, envelhecimento, cetoadicose e outras desordens do metabolismo humano, derivam-se da reação de Maillard (Esquema 4), proposta em 1912 pelo cientista francês Maillard.⁹² Esta reação entre aminoácidos e açúcares foi descrita com riqueza de detalhes mecanísticos e, numa série de trabalhos nos anos posteriores, Maillard propôs que esta reação estaria envolvida na fisiologia e patologia humana e também na de plantas. Para descrever as desordens fisiológicas acometidas em humanos pelos produtos da reação, principalmente diabéticos, Maillard adotou a expressão “patologia química”.



Esquema 4. Primeiros estágios da reação de Maillard. R: aminoácido ou proteína. Adaptado da ref. 178

Durante os anos seguintes, foi publicada uma série de trabalhos sobre proteínas de alimentos (a caseína do leite) a altas temperaturas, acarretando perda de valor nutricional, como mostrado por Greaves e colaboradores.⁹³ Posteriormente, foi detectado um complexo estável entre a lactoglobulina e caseína quando o leite era aquecido a 85 °C, utilizando eletroforese e traçando o perfil de pH desta reação.⁹⁴

As primeiras citações sobre as reações de Maillard são datadas do fim da década de 40, quando se associaram as alterações nutricionais de leite desnatado durante seu armazenamento à formação dos produtos das reações de aldoses.⁹⁵ O escurecimento de frutos envelhecidos também foi associado à formação dos produtos das reações de Maillard derivados das reações entre os aminoácidos e os açúcares contidos nestes alimentos, seguidos de oxidação aeróbica catalisadas por íons de metais de transição.^{96,97} Estes trabalhos também propuseram que o aroma agradável de cervejas e batatas fritas era associado a reações de Maillard.

A primeira incursão no estudo de aspectos nutricionais e fisiológicos das reações de Maillard no organismo de mamíferos foi publicada em 1970 por Erbesdobler e colaboradores,⁹⁸ que investigaram a influência do produto de reação entre frutose e lisina na microflora intestinal. No início dos anos 80, as reações de Maillard foram implicadas no envelhecimento e no diabetes, aumentando

significamente o número de pesquisas sobre a química destes processos.^{99,100} Sell e Monnier¹⁰¹ isolaram a pentosidina (produto de reação entre ribose, lisina e arginina) no colágeno humano e, mais tarde, mostraram que o acúmulo de pentosidina no colágeno de pessoas idosas e de pacientes diabéticos com complicações renais era muito maior se comparado a pessoas jovens e não diabéticas.¹⁰² As reações de Maillard ainda são objeto de estudos *in vivo* visto que ainda não se encontrou um modo eficaz de inibi-la e, a cada dia, são descobertos novos efeitos biológicos deletérios associados aos produtos desta reação. Há crescente interesse na identificação e síntese de biomarcadores destes adutos de Maillard¹⁰³ e no estudo de seus efeitos no metabolismo de diabéticos.^{104,105}

Uma vez que a glicose, uma aldose, é uma das principais moléculas protagonistas das reações de Maillard, especulou-se que o metilglicoxal (“retina”, na nomenclatura de Szent-Györgyi) poderia também participar nas reações. A formação de hidroxipirroles a partir de metilglicoxal e acetato de metil amônio¹⁰⁶ foi uma das primeiras descobertas que permitiram associar a reação de Maillard com metilglicoxal e propor que esse metabólito poderia estar envolvido na fisiopatologia do envelhecimento e do diabetes, através da formação dos AGEs. Anos mais tarde atribuiu-se a uma oxoaldeído reductase, extraída de fígado de porco, um possível mecanismo de defesa frente aos produtos derivados de metilglicoxal e aminoácidos.¹⁰⁷ Nos anos 90, foi então relatada a formação de imidazóis em proteínas pela reação do grupo guanidina de arginina com metilglicoxal,¹⁰⁸ bem como a ativação dos RAGEs por produtos da reação entre albumina, rica em grupos sulfidrila, e metilglicoxal,¹⁰⁹ confirmando que as AGEs eram de fato produzidas através de reações de Maillard.

Nesta mesma época, Westwood e Thornalley mostraram que albumina bovina e humana tratadas com glicose e metilglicoxal exibiam algumas diferenças químicas e estruturais.¹¹⁰ Embora não se observasse seletividade entre arginina e lisina para a reação com glicose, a reação de metilglicoxal com lisina só acontecia quando utilizadas altas concentrações de metilglicoxal (100 mM).

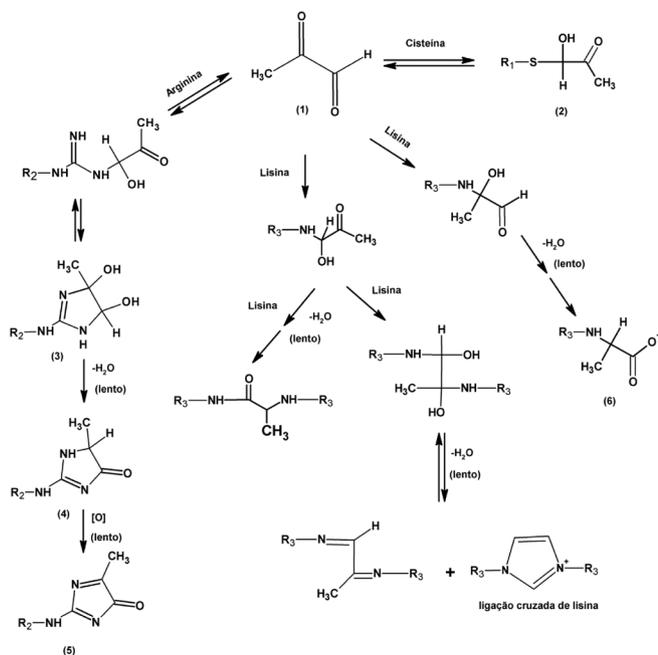
Foi também demonstrada a formação de radicais livres nas reações de metilglicoxal com aminoácidos. Utilizando alanina marcada isotopicamente com ^{15}N -, $1\text{-}^{13}\text{C}$ -, $2\text{-}^{13}\text{C}$ e $3\text{-}^{13}\text{C}$, através de espectros de ressonância paramagnética de elétrons (EPR), inferiu-se que nesta reação eram gerados um ânion radical metilglicoxal, ânion radical superóxido e um cátion radical, este último, produto da reação entre metilglicoxal e o produto da reação metilglicoxal/alanina.¹¹¹

A participação de metilglicoxal no processo de envelhecimento foi evidenciada pela detecção de *N*- ϵ -carboxietil-lisina, produto da modificação química de proteínas por metilglicoxal, em proteínas do cristalino.¹¹² Paralelamente, Abordo e colaboradores determinaram um aumento da concentração de α -oxoaldeídos e da instalação de estresse oxidativo em culturas de macrófagos de ratos tratados com H_2O_2 .¹¹³

Enfim, assim como a glicose, o metilglicoxal é capaz de reagir com grupos amino e sulfidrila de proteínas, gerando bases de Schiff e, conseqüentemente, os produtos da reação de Maillard (Esquema 5).¹¹⁴

EFEITOS CITOTÓXICOS E TÓXICOS DO METILGLIOXAL

O metilglicoxal existe em água num equilíbrio dinâmico entre suas formas mono (56-62%) e di-hidratada (38-44%), restando em solução 1% do total de metilglicoxal na sua forma cetona-aldeídica (Figura 2).¹¹⁵ O espectro de absorção do metilglicoxal em vários solventes, como água e acetona, foi descrito primeiramente por Woo e Chang (1945). Eles concluíram que o metilglicoxal em água gera uma forma hidratada,¹¹⁶ a qual já havia sido proposta por Neuberg e Schor (1927), através de estudos de espectroscopia de absorção UV-Vis.¹¹⁷ Moulds



Esquema 5. Produtos de reação entre metilgloxal e resíduos de arginina, lisina e cisteína. Adaptado da ref. 53. R_1 : $-CH_2CHNH_2COOH$, R_2 : $-(CH_2)_3CHNH_2COOH$ e R_3 : $-(CH_2)_4CHNH_2COOH$. (1) Metilgloxal, (2) hemetioacetal, (3) N_5 -(4,5-di-oxo-4-metilimidazolidin-2-il) ornitina, (4) N_5 -(5-hidro-5-metilimidazol-4-on-2-il) ornitina, (5) N_5 -(5-metilimidazol-4-on-2-il) ornitina e (6) N_5 -(1-carboxietil)lisina

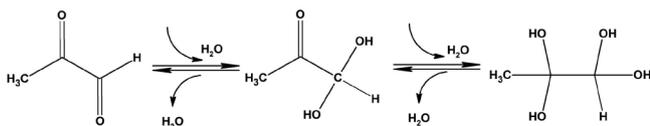


Figura 2. Estruturas químicas do metilgloxal em água

e Riley (1938) mostraram que logo após a destilação do metilgloxal em solução aquosa, um polímero é formado e que o mesmo é destruído com a adição de água. Propuseram então que poderia haver traços de um polímero do composto em meio aquoso.¹¹⁸

Apesar de o metilgloxal existir sob tantas formas em água, a mais reativa é a cetona-aldeídica, segundo Nukaya e colaboradores (1993).¹¹⁹ Esta é a forma produtora de ácido fórmico, ácido acético e diacetil em meio aquoso tamponado com fosfato e H_2O_2 diluído. Neste trabalho, detectou-se radical acetila e consequente formação de *N*-acetilguanosina, a qual poderia indicar uma atividade mutagênica do metilgloxal. Metilgloxal também promoveu aumento de radicais livres e acúmulo de cálcio em eritrócitos na presença de íons de ferro, levando à redução de íons de Fe^{3+} .¹²⁰

Apesar de tantas evidências quanto à toxicidade de metilgloxal, quando Dakley e Dudley mostraram que lactato é gerado a partir de metilgloxal, não foi relatado nenhum efeito tóxico do metilgloxal em animais experimentais.⁵⁷ Os primeiros trabalhos sobre os efeitos tóxicos de metilgloxal só apareceram a partir dos anos 20 com Sjollem e Seekles, ao mostrarem que coelhos tratados com metilgloxal manifestavam depressão e falta de apetite, além de edema e hiperemia pulmonar associados a doses letais.¹²¹

Na primeira metade do século passado, a deficiência de tiamina (vitamina B1) com consequente beribéri em aves já havia sido relacionada ao acúmulo de metilgloxal nos tecidos destes animais.¹²² Este efeito foi atribuído a uma disfunção do ciclo das glicoxalases ao eliminar o metilgloxal.¹²³ Geiger e Rosenberg (1933) encontraram

elevada concentração de metilgloxal na urina de cães polineuróticos e na urina e no fluido cérebro-espinhal de recém-nascidos com dispepsia aguda, doenças associadas à deficiência de tiamina.¹²⁴ A nefropatia, relacionada à elevada concentração de metilgloxal e baixa atividade das glicoxalases em fígado de ratos, revelou que estes animais também eram deficientes em tiamina.¹²⁵

No início dos anos 50, foi descrita a inibição da succinato desidrogenase de mitocôndrias isoladas de fígado de rato por metilgloxal, ocasionando depressão da respiração celular, sugerindo que tiolproteínas seriam potenciais alvos do metilgloxal.¹²⁶ Outros autores também verificaram que o metilgloxal inibe o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado e cérebro de rato.¹²⁷ Estes resultados deram início a uma série de trabalhos que propunham uma ação antitumoral do metilgloxal. São dignos de nota o estudo de Pine e DiPaolo (1966) sobre o efeito inibitório do metilgloxal em mitocôndrias isoladas de tumores induzidos em ratos por células leucêmicas L1210¹²⁸ e o de Mikles-Robertson e colaboradores (1979) sobre a inibição da atividade mitocondrial e proliferação celular de diferentes linhagens de células humanas e murinas desafiadas com metilgloxal.¹²⁹ Mais tarde, porém, verificou-se que mitocôndrias isoladas de rins de ratos saudáveis também eram afetadas pelo metilgloxal.¹³⁰

As reações de metilgloxal com proteínas já eram conhecidas e, em 1973, Krymkiew demonstrou que metilgloxal também era capaz de reagir com DNA e RNA e por isso poderia ser considerado um agente mutagênico, contrariando trabalhos anteriores que apresentavam o metilgloxal como um composto anticarcinogênico.¹³¹ Além dos efeitos lesivos do metilgloxal a DNA e RNA, foram relatados efeitos citotóxicos em culturas de linfócitos humanos, medula óssea e aparelho gastrointestinal de camundongos,¹³² o que colocou em xeque o papel do metilgloxal como agente anticarcinogênico.

Em virtude de sua alta reatividade frente a proteínas e DNA, não é absolutamente surpreendente que múltiplas propriedades biológicas possam ser exibidas pelo metilgloxal. Não só enzimas da via glicolítica como aldolase e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase são susceptíveis ao metilgloxal,¹³³ como a enzima mitocondrial carnitina palmitoil transferase de coração, fígado e músculo esquelético de ratos,¹³⁴ promotora da translocação de ácidos graxos para dentro da matriz mitocondrial, comprometendo a oxidação destes combustíveis biológicos.

O balanço redox no interior de culturas de hepatócitos de ratos foi perturbado pelo metilgloxal através de uma diminuição dos níveis de glutatona reduzida (GSH),¹³⁵ possivelmente via inibição de glutatona redutase¹³⁶ e de glutatona peroxidase.¹³⁷ O metilgloxal também se enquadrou como um agente capaz de causar retinopatia ao degradar proteínas do cristalino da retina de bois e humanos.¹³⁸

Também se sabe que metilgloxal afeta a eletrofisiologia de células-beta do pâncreas,¹³⁹ induzindo inchamento celular¹⁴⁰ e as conduzindo à apoptose,¹⁴¹ assim como se administrado a culturas de células Jurkat, ativando a *c-Jun* *N*-terminal quinase¹⁴² ou à linhagem leucêmica de células monocíticas U937.¹⁴³ Metilgloxal também induz hipertensão em ratos,¹⁴⁴ um distúrbio característico do envelhecimento de animais experimentais e humanos.

Devido ao vasto acervo de dados quanto aos efeitos do metilgloxal em diversas linhagens celulares e animais, atualmente a elucidação dos mecanismos de morte celular associados ao metilgloxal se tornaram mais interessantes e instigadores. Cook e colaboradores (1998) relataram que culturas de células-beta de ilhotas de pâncreas, tratadas com metilgloxal, continham elevada concentração intracelular de íons cálcio.¹⁴⁵ Lembramos aqui que $[Ca^{2+}]_i > 10$ nM catalisa a abertura de poros da membrana mitocondrial afetando seu desempenho energético, podendo levar a célula à apoptose.¹⁴⁶ Akhand e colaboradores (2001) mostraram que culturas de células

endoteliais humanas, desafiadas por metilglioal, sofrem agregação de proteínas, principalmente as da superfície da membrana celular, ativando a proteína tirosina quinase e, dessa maneira, fosforilando resíduos de tirosina e inibindo, ao mesmo tempo, a ação da quinase regulada extracelularmente. Os autores concluíram que o metilglioal, através de modificações químicas de proteínas, pode regular ao mesmo tempo as ações de fosfatases e quinases das células.¹⁴⁷ A ativação do mitógeno p-38 e da proteína *heat-shock 27* em células mesangiais glomerulares de ratos também foi relatada como via de morte celular induzida por metilglioal.^{148,149} Recentemente, muitos trabalhos sobre os efeitos do metilglioal no organismo apostam numa resposta típica de estresse oxidativo. Entre eles, ressaltamos a constatação de Tatsunami e colaboradores (2009) de disfunção dos sistemas das tioredoxinas e glutaredoxinas, consumidoras de peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos tóxicos, em culturas de células endoteliais de aorta bovina desafiadas por metilglioal, culminando com desbalanço redox e morte celular.¹⁵⁰

METILGLIOAL EM PROCARIOTOS

A geração de lactato a partir de metilglioal em bactérias foi demonstrada primeiramente por Neuberger e Gorr (1926)¹⁵¹ e logo depois se conseguiu isolar metilglioal de culturas de bactérias.¹⁵² Entretanto, pesquisas envolvendo bactérias e metilglioal só retornariam com maior ênfase nos anos 60 com Együd e Szent-Györgyi (1966), quando demonstraram que a proliferação de *E. coli* era dose-dependente da adição de metilglioal e revertida pela adição de cisteína.¹⁵³ Verificou-se que a principal via de formação do metilglioal em bactérias é através da metilglioal sintetase, do mesmo modo ao encontrado em outros animais.¹⁵⁴ Porém, mutantes de *E. coli* deficientes para a metilglioal sintetase não têm o seu crescimento e metabolismo afetado, demonstrando que o metilglioal não é preponderante para o desenvolvimento do micro-organismo.¹⁵⁵

A caracterização de uma enzima (metilglioal redutase) em *Pseudomonas putida*, que utilizava aldeídos como substratos, oxidando-os, entre eles o próprio metilglioal adicionado às suspensões, permitiu provar que o metilglioal era tóxico às bactérias.¹⁵⁶ Verificou-se também que esta bactéria contém atividades consideráveis de enzimas do ciclo das glioalases. Mais recentemente, uma nova aldo-ceto redutase (YghZ) foi clonada, caracterizada e expressa em culturas de *E. coli* e se mostrou eficiente ($K_m = 3,4 \text{ mM}$) na eliminação do metilglioal.¹⁵⁷ Outra enzima, denominada glioalase III, não dependente de glutatona, foi isolada e purificada de *E. coli*.¹⁵⁸ Esta enzima apresenta algumas características distintas das glioalases I e II. Por exemplo, é insensível aos inibidores da glioalase I, mas é inibida por bloqueadores de grupos tiólicos, o que sugere que seja dependente de grupos sulfidrila em seu sítio ativo.

Atividade antimicrobiana também foi assinalada ao metilglioal. Quando adicionado a culturas de *E. coli*, o metilglioal causou diminuição da síntese de RNA e DNA bem como depleção de espermidina e putrescina de *E. coli*, como esperado, pois estas poliaminas são vitais à proliferação e são desativadas por adição ao metilglioal.¹⁵⁹ Metilglioal também se mostrou tóxico quando administrado a culturas de *Prevotella ruminicola*, uma bactéria encontrada em ruminantes, quando crescida em meio enriquecido de glicose (50 mM).¹⁶⁰ Esta resposta foi atribuída ao estresse oxidativo desencadeado por metilglioal devido ao consumo excessivo de glutatona (GSH). Demonstrou-se que GSH tem papel antioxidante em culturas de *E. coli* desafiadas com metilglioal, diferentemente de culturas de *E. coli* deficientes na produção de GSH, que foram susceptíveis ao composto.¹⁶¹ Esse efeito protetor também foi demonstrado quando culturas de *Haemophilus influenzae* tratadas com metilglioal apresentaram alta viabilidade ao serem pré-tratadas com GSH.¹⁶²

Desse modo, a produção de metilglioal por bactérias e células de mamíferos, incompreensivelmente, não apresenta nenhuma vantagem evolutiva, pois permanece associada a uma perda do controle do metabolismo através de grande fluxo e sobrecarregamento da via glicolítica.⁸¹

METILGLIOAL EM LEVEDURAS

O metilglioal como um intermediário da fermentação alcoólica de leveduras foi primeiramente proposto por Kostytschew e Soldatenkov (1927).¹⁶³ Assim como em mamíferos e procariotos, leveduras também contam com o ciclo das glioalases dependente de GSH para a detoxificação do metilglioal.¹⁶⁴ Em leveduras, a atividade da glioalase I dispõe de altas concentrações de glutatona (GSH) e é regulada pela interação célula-célula, aumentada com a densidade celular.¹⁶⁵

Inose e Murata (1995) relataram que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* produtores de metilglioal em excesso possuem elevadas atividades de algumas enzimas da via glicolítica como a triose fosfato isomerase e a fosfofrutoquinase, envolvidas na mutagenicidade destas leveduras.¹⁶⁶ Consistentemente, observou-se glicação de proteínas promovidas por metilglioal em *Saccharomyces*.^{167,168}

Diferentemente de bactérias, a principal via de formação do metilglioal em leveduras pode ser a decomposição química espontânea da di-hidroxicetona fosfato, pois não foi detectada atividade de metilglioal sintetase.¹⁶⁴ Recentemente, análises do genoma de *S. cerevisiae* não revelaram sequências homólogas à da metilglioal sintetase, o que corrobora trabalhos anteriores.¹⁶⁹ Martins e colaboradores (2001) também constataram que não há atividade enzimática envolvida na geração de metilglioal em leveduras, concluindo que apenas 0,3% do fluxo de glicose é divergido para a formação de metilglioal.¹⁷⁰

Leveduras, assim como mamíferos e bactérias, também possuem uma aldo redutase capaz de detoxificar o metilglioal¹⁷¹ e contam com di-hidroxiacetona quinases, capazes de eliminar excessos de di-hidroxiacetona fosfato impedindo, assim, a formação de metilglioal.¹⁷² Estudos com *S. cerevisiae* demonstraram que há duas vias de produção de lactato a partir de metilglioal: a já conhecida via das glioalases e, uma via composta por metilglioal redutase e lactaldeído desidrogenase.¹⁷³

Recentemente, as leveduras têm sido usadas como organismos-modelo para a avaliação da citotoxicidade do metilglioal e de seu mecanismo de ação em doenças neurodegenerativas. Além disso, é de extremo interesse tecnológico impedir a formação de metilglioal no processo de fermentação alcoólica, contribuindo assim para maior viabilidade e funcionalidade da levedura.¹⁷⁴

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Ao longo de quase um século de pesquisa sobre o(s) papel(is) do metilglioal em diversos organismos, foram propostas três funções para esta molécula: intermediário da via glicolítica e, portanto, gerador de piruvato, um combustível biológico e precursor da neoglicogênese; regulador da divisão celular e, agente anticarcinogênico, paradoxalmente ao lado de seu papel indutor de envelhecimento, câncer e diabetes.

A elucidação da via glicolítica¹⁷⁵ com a exclusão do metilglioal como intermediário, a probabilidade de que a divisão celular seja controlada pelas ciclinas dependentes de quinases (CDKs) e os pontos de controle (*checkpoints*)⁷⁵ e a controvérsia sobre a contribuição pró- ou antitumoral do metilglioal¹⁶⁷ por sua capacidade de reagir com DNA⁵⁰ tornaram o papel do metilglioal no metabolismo uma questão extremamente intrigante, não resolvida ainda. Um ponto que vem ganhando certo destaque na literatura sobre o metilglioal e ciclo

das glioxalases é a participação de ambos numa rota anaplaerótica para o ciclo do ácido cítrico,¹⁷⁶ porém, esta hipótese também não está consolidada por evidências experimentais.

Dessa maneira permanece a pergunta: Por quê o organismo produz quantidades excessivas de uma molécula capaz de reagir rapidamente com proteínas e DNA e disparar respostas biológicas que conduzirão a doenças como diabetes e Alzheimer?

Em alguns animais como o polvo (*Polvo ocellatus*) o metilglioxal foi identificado como combustível biológico através de sua conversão a *D*-lactato,¹⁷⁷ precursor de piruvato, corroborando proposta inicial de o metilglioxal e o ciclo das glioxalases¹⁷⁶ constituírem precursores de ATP. Entretanto isto não acontece na maioria dos organismos, e o acúmulo do metilglioxal é considerado como ator de distúrbios fisiológicos.

Finalmente, chamamos a atenção para a importância do desenvolvimento de pesquisas sobre o papel do metilglioxal em sistemas biológicos, bem como sobre o desenvolvimento de fármacos capazes de inibir ou diminuir os efeitos tóxicos desta molécula e controlar a atividade das enzimas da via das glioxalases, em especial no diabetes e em outras doenças onde produtos de glicação avançada são comumente encontrados. Para tanto, o desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação de metilglioxal livre e combinado a macromoléculas em amostras biológicas, bem como a caracterização de adutos marcadores de doenças derivados de metilglioxal se tornam necessários e desafiam a criatividade e empenho dos químicos.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos Redox em Biomedicina - Redoxoma. As pesquisas dos autores deste trabalho sobre modelos experimentais de diabetes contam com a colaboração da Profa. M. Sogayar (IQUSP, Depto. de Bioquímica), através de constantes e frutíferas discussões, apoio experimental e contínuo estímulo.

REFERÊNCIAS

- Sanders, L. J.; *Diabetes Spectrum* **2002**, *15*, 56.
- Wild, S.; Roglic, G.; Green, A.; Sicree, R.; King, H.; *Diabetes Care* **2004**, *5*, 1047.
- <http://da3.diabetesatlas.org/indexc97b.html>, acessada em Abril 2010.
- http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23617&janela=1/, acessada em Abril 2010.
- Narayan, K. M.; Williamson, D. F.; *J. Gen. Int. Med.* **2010**, *25*, 154.
- Tuchman, A.; *Lancet* **2009**, *37*, 1140.
- Israili, Z. H.; *Am. J. Ther.* **2009**, doi: 10.1097/MJT.0b013e3181afbf51.
- Hawa, M. I.; Thivolet, C.; Mauricio, D.; Alemanno, I.; Cipponeri, E.; Collier, D.; Hunter, S.; Buzzetti, R.; de Leiva, A.; Pozzilli, P.; Leslie, R. D.; *Diabetes Care* **2009**, *32*, 160.
- Skyler, J. S.; *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *81*, 768.
- Cernea, S.; Raz, I.; Herold, K. C.; Hirshberg, B.; Roep, B. O.; Schatz, D. A.; Fleming, G. A.; Pozzilli, P.; Little, R.; Schloot, N. C.; Leslie, R. D.; Skyler, J. S.; Palmer, J. P.; *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2009**, *25*, 694.
- Corrêa-Giannella, M. L.; Raposo do Amaral, A. S.; *Diabetol. Metab. Syndr.* **2009**, *1*, 9.
- Eliashewitz, F. G.; Aita, C. A.; Genzini, T.; Noronha, I. L.; Lojudice, F. H.; Labriola, L.; Krogh, K.; Oliveira, E. M.; Silva, I. C.; Mendonça, Z.; Franco, D.; Miranda, M. P.; Noda, E.; de Castro, L. A.; Andreolli, M.; Goldberg, A. C.; Sogayar, M. C.; *Transplant Proc.* **2004**, *36*, 1117.
- Couri, C. E.; Voltarelli, J. C.; *Diabetol. Metab. Syndr.* **2009**, *16*, 19.
- Brownlee, M.; *Nature* **2001**, *414*, 813.
- Wei, M.; Gaskill, S. P.; Haffner, S. M.; Stern, M. P.; *Diabetes Care* **1998**, *7*, 1167.
- Friederich, M.; Hansell, P.; Palm, F.; *Curr. Diabetes Rev.* **2009**, *5*, 120.
- Schiff, M.; Loublier, S.; Coulibaly, A.; Bénit, P.; Ogier de Baulny, H.; Rustin, P.; *J. Inherit. Metab. Dis.* **2009**, *32*, 684.
- Munusamy, S.; MacMillan-Crow, L. A.; *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *46*, 1149.
- Houstis, N.; Rosen, E. D.; Lander, E. S.; *Nature* **2006**, *440*, 944.
- Nishikawa, T.; Araki, E.; *Antioxid. Redox Signal* **2007**, *9*, 343.
- Bertera, S.; Crawford, M. L.; Alexander, A. M.; Papworth, G. D.; Watkins, S. C.; Robbins, P. D.; Trucco, M.; *Diabetes* **2003**, *52*, 387.
- Lorenzi, M.; *Exp. Diabetes Res.* **2007**, *2007*, 1.
- Monnier, V. M.; Sell, D. R.; Dai, Z.; Nemet, I.; Collard, F.; Zhang, J.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 81.
- Grillo, M. A.; Colombatto, S.; *Amino Acids* **2008**, *35*, 29.
- Kalapos, M. P.; *Drug Metabol. Drug Interact.* **2008**, *23*, 69.
- Das Evcimen, N.; King, G. L.; *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 498.
- Hu, Y.; Suarez, J.; Fricovsky, E.; Wang, H.; Scott, B. T.; Trauger, S. A.; Han, W.; Hu, Y.; Oyeleye, M. O.; Dillmann, W. H.; *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 547.
- Brownlee, M.; *Diabetes* **2005**, *54*, 1615.
- Du, X. L.; Edelstein, D.; Rossetti, L.; Fantus, I. G.; Goldberg, H.; Ziyadeh, F.; Wu, J.; Brownlee, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 12222.
- Nishikawa, T.; Edelstein, D.; Du, X. L.; Yamagishi, S.; Matsumura, T.; Kaneda, Y.; Yorek, M. A.; Beebe, D.; Oates, P. J.; Hammes, H. P.; Giardino, I.; Brownlee, M.; *Nature* **2000**, *404*, 787.
- Ceriello, A.; Quattraro, A.; Giugliano, D.; *Diabetologia* **1993**, *36*, 265.
- Wolf, B. A.; Williamson, J. R.; Easom, R. A.; Chang, K.; Sherman, W. R.; Turk, J.; *J. Clin. Invest.* **1991**, *87*, 31.
- Korshunov, S. S.; Skulachev, V. P.; Starkov, A. A.; *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 15.
- Brodie, A. E.; Reed, D. J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *148*, 120.
- Garcia Soriano, F.; Virág, L.; Jagtap, P.; Szabó, E.; Mabley, J. G.; Liaudet, L.; Marton, A.; Hoyt, D. G.; Murthy, K. G.; Salzman, A. L.; Southan, G. J.; Szabó, C.; *Nat. Med.* **2001**, *7*, 108.
- Love, S.; Barber, R.; Wilcock, G. K.; *Brain* **1999**, *122*, 247.
- de Murcia, J. M.; Niedergang, C.; Trucco, C.; Ricoul, M.; Dutrillaux, B.; Mark, M.; Oliver, F. J.; Masson, M.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Walztinger, C.; Chambon, P.; de Murcia, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 7303.
- Schmidtz, H. D.; Dutiñé, C.; Bereiter-Hahn, J.; *Cell. Biol. Int.* **2003**, *27*, 511.
- Sawa, A.; Khan, A. A.; Hester, L. D.; Snyder, S. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 11669.
- Du, X.; Matsumura, T.; Edelstein, D.; Rossetti, L.; Zsengellér, Z.; Szabó, C.; Brownlee, M.; *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1049.
- Ellis, E. M.; *Pharmacol. Ther.* **2007**, *115*, 13.
- Duran-Jimenez, B.; Dobler, D.; Moffatt, S.; Rabbani, N.; Streuli, C. H.; Thornalley, P. J.; Tomlinson, D. R.; Gardiner, N. J.; *Diabetes* **2009**, *58*, 2893.
- Turk, Z.; *Physiol. Res.* **2010**, *52*, 147.
- Ceriello, A.; Motz, E.; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 816.
- Yao, D.; Brownlee, M.; *Diabetes* **2009**, *59*, 249.
- LoPachin, R. M.; Gavin, T.; Petersen, D. R.; Barber, D. S.; *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 1499.
- Nakayama, K.; Nakayama, M.; Iwabuchi, M.; Terawaki, H.; Sato, T.; Kohno, M.; Ito, S.; *Am. J. Nephrol.* **2008**, *28*, 871.
- Sartori, A.; Garay-Malpartida, H. M.; Forni, M. F.; Schumacher, R. I.; Dutra, F.; Sogayar, M. C.; Bechara, E. J.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 1841.

49. Dhar, A.; Desai, K.; Kazachmov, M.; Yu, P.; Wu, L.; *Metabolism* **2008**, *57*, 1211.
50. Synold, T.; Xi, B.; Wuenschell, G. E.; Tamae, D.; Figarola, J. L.; Rahbar, S.; Termini, J.; *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2148.
51. Frischmann, M.; Bidmon, C.; Angerer, J.; Pischetsrieder, M.; *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 1586.
52. Ahmed, N.; Thornalley, P. J.; *Diabetes Obes. Metab.* **2007**, *9*, 233.
53. Thornalley, P. J.; *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 565.
54. Dhar, A.; Desai, K.; Liu, J.; Wu, L.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1093.
55. von Pechmann, H.; *Ber. Dtsch. Chem. Gesells.* **1887**, *20*, 3213.
56. Bernhauer, K.; Görlich, B.; *Biochem. Zeitschr.* **1929**, *212*, 452.
57. Dakin, H. D.; Dudley, H. W.; *J. Biol. Chem.* **1913**, *15*, 127.
58. Dakin, H. D.; Dudley, H. W.; *J. Biol. Chem.* **1913**, *15*, 463.
59. Neuberg, C.; *Biochem. Zeitschr.* **1913**, *51*, 484.
60. Dakin, H. D.; Dudley, H. W.; *J. Biol. Chem.* **1913**, *14*, 155.
61. Lohmann, K.; *Biochem. Zeitschr.* **1932**, *254*, 332.
62. Embden, G.; Deuticke, H. J.; Kraft, G.; *Klin. Woch.* **1933**, *12*, 213.
63. Meyerhof, O.; *Nature* **1933**, *132*, 337.
64. Szent-Györgyi, A.; *Bioelectronics*, Academic Press: New York, 1968.
65. Gudernatsch, F.; *Med. Rec.* **1937**, *146*, 101.
66. Szent-Györgyi, A.; *Introduction to a Submolecular Biology*, Academic Press: New York, 1960.
67. Szent-Györgyi, A.; Hegyeli, A.; McLaughlin, J. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, *48*, 1439.
68. Együd, L. G.; *Biochem. J.* **1965**, *96*, 19C.
69. Együd, L. G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1965**, *54*, 200.
70. Szent-Györgyi, A.; Együd, L. G.; McLaughlin, J. A.; *Science* **1967**, *155*, 539.
71. Schubert, M. P.; *J. Biol. Chem.* **1935**, *111*, 671.
72. Szent-Györgyi, A.; *Persp. Biol. Med.* **1968**, *11*, 350.
73. Szent-Györgyi, A.; *Bioenergetics* **1973**, *4*, 533.
74. Szent-Györgyi, A.; *Living State and Cancer*, Marcel Dekker: New York, 1978.
75. Ivanchuk, S. M.; Rutka, J. T.; *Neurosurgery* **2004**, *54*, 692.
76. Szent-Györgyi, A.; *Science* **1968**, *161*, 988.
77. Ayoub, F.; Zaman, M.; Thornalley, P.; Masters, J.; *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 151.
78. Ranganathan, S.; Walsh, E. S.; Tew, K. D.; *Biochem. J.* **1995**, *309*, 127.
79. Antognelli, C.; Del Buono, C.; Baldracchini, F.; Talesa, V.; Cottini, E.; Brancadoro, C.; Zucchi, A.; Mearini, E.; *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1880.
80. Di Ilio, C.; Angelucci, S.; Pennelli, A.; Yeyya, A.; Tenaglia, R.; Sacchetta, P.; *Cancer Lett.* **1995**, *96*, 189.
81. Kalapos, M. P.; *Toxicol. Lett.* **1999**, *110*, 145.
82. Rose, I. A.; Nowick, J. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13047.
83. Beisswenger, B. G.; Delucia, E. M.; Lapoint, N.; Sanford, R. J.; Beisswenger, P. J.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 201.
84. Dutra, F.; Knudsen, F. S.; Curi, D.; Bechara, E. J.; *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1323.
85. Yu, P. H.; Wright, S.; Fan, E. H.; Lun, Z. R.; Gubisne-Harberle, D.; *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1647*, 193.
86. Sakugawa, H.; Kaplan, I. R.; Shepard, L. S.; *Atmos. Environ. Part B* **1993**, *27*, 203.
87. Biswas, S.; Gairola, C. G.; Das, S. K.; *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, *229*, 153.
88. Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2966.
89. Kwakman, P. H.; te Velde, A. A.; de Boer, L.; Speijer, D.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Zaat, S. A.; *FASEB J.* **2010**, *24*, 2576.
90. Brett, J.; Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Zou, Y. S.; Weidman, E.; Pinsky, D.; Nowygrod, R.; Neeper, M.; Przysiecki, C.; Shaw, A.; Migheli, A.; Stern, D.; *Am. J. Pathol.* **1993**, *143*, 1699.
91. Yan, S. F.; Ramasamy, R.; Schmidt, A. M.; *J. Mol. Med.* **2009**, *87*, 235.
92. Maillard, L. C.; *Council of Royal Academy Science Series 2* **1912**, *154*, 66.
93. Greaves, E. O.; Morgan, A. F.; Loveen, M. K.; *J. Nutr.* **1938**, *16*, 115.
94. McGugan, W. A.; Zehren, V. F.; Zehren, V. L.; Swanson, A. M.; *Science* **1954**, *120*, 435.
95. Henry, K. M.; Kon, S. K.; Lea, C. H.; Smith, J. A. B.; White, J. C. D.; *Nature* **1946**, *158*, 348.
96. Patron, A.; *Fruits d'Outre-Mer.* **1950**, *5*, 167.
97. Patron, A.; *Indust. Agr. Alim.* **1951**, *68*, 251.
98. Erbersdobler, H.; Gunsser, I.; Weber, G.; *Zbl. Vet. Med. A* **1970**, *17*, 573.
99. Monnier, V. M.; Cerami, A.; *Science* **1981**, *211*, 491.
100. Monnier, V. M.; Stevens, V. J.; Cerami, A.; *Prog. Food. Nutr. Sci.* **1981**, *5*, 315.
101. Sell, D. R.; Monnier, V. M.; *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21597.
102. Sell, D. R.; Monnier, V. M.; *J. Clin. Invest.* **1990**, *85*, 380.
103. Henrotin, Y.; Deberg, M.; Mathy-Hartert, M.; Deby-Dupont, G.; *Adv. Clin. Chem.* **2009**, *49*, 31.
104. Fan, X.; Zhang, J.; Theves, M.; Strauch, C.; Nemet, I.; Liu, X.; Qian, J.; Giblin, F. J.; Monnier, V. M.; *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 34618.
105. Unoki, H.; Yamagishi, S.; *Curr. Pharm. Des.* **2008**, *14*, 987.
106. Wieland, T.; Severin, T.; *Z. Lebensm. Unters. For.* **1973**, *153*, 201.
107. Liang, Z. Q.; Hayase, F.; Kato, H.; *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 373.
108. Henle, T.; Walter, A. W.; Haessner, R.; Klostermeyer, H. Z.; *Lebensm. Unters. For.* **1994**, *199*, 55.
109. Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Thornalley, P. J.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32293.
110. Westwood, M. E.; Thornalley, P. J.; *J. Protein. Chem.* **1995**, *14*, 359.
111. Yim, H. S.; Kang, S. O.; Hah, Y. C.; Chock, P. B.; Yim, M. B.; *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 28228.
112. Ahmed, M. U.; Brinkmann Frye, E.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W.; *Biochem. J.* **1997**, *324*, 565.
113. Abordo, E. A.; Minhas, H. S.; Thornalley, P. J.; *Biochem. Pharmacol.* **1999**, *58*, 641.
114. Bechara, E. J.; Dutra, F.; Cardoso, V. E.; Sartori, A.; Olympio, K. P.; Penatti, C. A.; Adhikari, A.; Assunção, N. A.; *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *146*, 88.
115. Nemet, I.; Vikić-Topić, D.; Varga-Defterdarović, L.; *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 560.
116. Woo, S. C.; Chang, S. T.; *Trans. Faraday Soc.* **1945**, *41*, 157.
117. Neuberg, C.; Schor, S. A.; *Biochem. Z.* **1927**, *191*, 466.
118. Moulds, L. D. V.; Riley, H. L.; *J. Chem. Soc.* **1938**, 621.
119. Nukaya, H.; Inaoka, Y.; Ishida, H.; Tsuji, K.; Suwa, Y.; Wakabayashi, K.; Kosuge, T.; *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1993**, *41*, 649.
120. Wittmann, I.; Mazák, I.; Pótv, L.; Wagner, Z.; Wagner, L.; Vas, T.; Kovács, T.; Belágyi, J.; Nagy, J.; *Chem. Biol. Interact.* **2001**, *138*, 171.
121. Sjollem, B.; Seekles, L.; *Biochem. Z.* **1926**, *176*, 431.
122. Findlay, G. M.; *Biochem. J.* **1921**, *15*, 104.
123. Vogt-Moller, P.; *Biochem. J.* **1931**, *25*, 418.
124. Geiger, A.; Rosenberg, A.; *Klin. Wschr.* **1933**, *12*, 1258.
125. Salem, H. M.; *Biochem. J.* **1954**, *57*, 227.
126. Kun, E.; *J. Biol. Chem.* **1950**, *187*, 289.
127. Kiessling, K. H.; *Acta Chem. Scand.* **1963**, *17*, 2113.
128. Pine, M. J.; DiPaolo, J. A.; *Cancer Res.* **1966**, *26*, 18.
129. Mikles-Robertson, F.; Feuerstein, B.; Dave, C.; Porter, C. W.; *Cancer Res.* **1979**, *39*, 1919.
130. Rosca, M. G.; Monnier, V. M.; Szewda, L. I.; Weiss, M. F.; *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2002**, *283*, F52.
131. Krymkiewicz, N.; *FEBS Lett.* **1973**, *29*, 51.
132. Migliore, L.; Barale, R.; Bosco, E.; Giorgelli, F.; Minunni, M.; Scarpato, R.; Loprieno, N.; *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1503.
133. Leoncini, G.; Maresca, M.; Bonsignore, A.; *FEBS Lett.* **1980**, *117*, 17.

134. Brady, L. J.; Brady, P. S.; Gandour, R. D.; *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 447.
135. Kalapos, M. P.; Garzó, T.; Antoni, F.; Mandl, J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1092, 284.
136. Vander Jagt, D. L.; Hunsaker, L. A.; Vander Jagt, T. J.; Gomez, M. S.; Gonzales, D. M.; Deck, L. M.; Royer, R. E.; *Biochem. Pharmacol.* **1997**, 53, 1133.
137. Park, Y. S.; Koh, Y. H.; Takahashi, M.; Miyamoto, Y.; Suzuki, K.; Dohmae, N.; Takio, K.; Honke, K.; Taniguchi, N.; *Free Radical Res.* **2003**, 37, 205.
138. Riley, M. L.; Harding, J. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1270, 36.
139. Cook, L. J.; Best, L.; *J. Physiol-London* **1995**, 489P, P49.
140. Best, L.; Miley, H. E.; Brown, P. D.; Cook, L. J.; *J. Membr. Biol.* **1999**, 167, 65.
141. Sheader, E. A.; Benson, R. S.; Best, L.; *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61, 1381.
142. Du, J.; Suzuki, H.; Nagase, F.; Akhand, A. A.; Yokoyama, T.; Miyata, T.; Kurokawa, K.; Nakashima, I.; *J. Cell. Biochem.* **2000**, 77, 333.
143. Okado, A.; Kawasaki, Y.; Hasuike, Y.; Takahashi, M.; Teshima, T.; Fujii, J.; Taniguchi, N.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 225, 219.
144. Vasdev, S.; Ford, C. A.; Longereich, L.; Parai, S.; Gadag, V.; Wadhawan, S.; *Artery* **1998**, 23, 10.
145. Cook, L. J.; Davies, J.; Yates, A. P.; Elliott, A. C.; Lovell, J.; Joule, J. A.; Pemberton, P.; Thornalley, P. J.; Best, L.; *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 1361.
146. Rizzuto, R.; Pozzan, T.; *Nat. Genet.* **2003**, 34, 135.
147. Akhand, A. A.; Hossain, K.; Kato, M.; Miyata, T.; Du, J.; Suzuki, H.; Kurokawa, K.; Nakashima, I.; *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31, 1228.
148. Liu, B. F.; Miyata, S.; Hirota, Y.; Higo, S.; Miyazaki, H.; Fukunaga, M.; Hamada, Y.; Ueyama, S.; Muramoto, O.; Uriuhara, A.; Kasuga, M.; *Kidney Int.* **2003**, 63, 947.
149. Padival, A. K.; Crabb, J. W.; Nagaraj, R. H.; *FEBS Lett.* **2003**, 551, 113.
150. Tatsunami, R.; Oba, T.; Takahashi, K.; Tampo, Y.; *J. Pharmacol. Sci.* **2009**, 111, 426.
151. Neuberg, C.; Gorr, G.; *Biochem. Z.* **1926**, 173, 476.
152. Fromageot, C.; *Biochem. Z.* **1929**, 216, 467.
153. Együd, L. G.; Szent-Györgyi, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1966**, 55, 388.
154. Saadat, D.; Harrison, D. H.; *Biochemistry* **1998**, 37, 10074.
155. Töttemeyer, S.; Booth, N. A.; Nichols, W. W.; Dunbar, B.; Booth, I. R.; *Mol. Microbiol.* **1998**, 27, 553.
156. Rhee, H.; Watanabe, K.; Murata, K.; Kimura, A.; *Agric. Biol. Chem.* **1987**, 51, 1059.
157. Grant, A. W.; Steel, G.; Waugh, H.; Ellis, E. M.; *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, 218, 93.
158. Misra, K.; Banerjee, A. B.; Ray, S.; Ray, M.; *Biochem. J.* **1995**, 305, 999.
159. Midorikawa, Y.; Hibasami, H.; Gasaluck, P.; Yoshimura, H.; Masuji, A.; Nakashima, K.; Imai, M.; *J. Appl. Bacteriol.* **1991**, 70, 291.
160. Russell, J. B.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 2844.
161. Ferguson, G. P.; Booth, I. R.; *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 4314.
162. Vergauwen, B.; Pauwels, F.; Vanechoutte, M.; van Beeumen, J. J.; *J. Bacteriol.* **2003**, 185, 1572.
163. Kostytschew, S.; Soldatenkov, S.; *H-S. Z. Physiol. Chem.* **1927**, 168, 128.
164. Penninckx, M. J.; Jaspers, C. J.; Legrain, M. J.; *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 6030.
165. Inoue, Y.; Kimura, A.; *Adv. Microb. Physiol.* **1995**, 37, 177.
166. Inose, T.; Murata, K.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **1995**, 30, 141.
167. Gomes, R. A.; Sousa Silva, M.; Vicente Miranda, H.; Ferreira, A. E.; Cordeiro, C. A.; Freire, A. P.; *FEBS Lett.* **2005**, 272, 4521.
168. Gomes, R. A.; Vicente Miranda, H.; Sousa Silva, M.; Graça, G.; Coelho, A. V.; Ferreira, A. E. do N.; Cordeiro, C.; Freire, A. P.; *FEMS Yeast Res.* **2008**, 8, 174.
169. Hodges, P. E.; McKee, A. H. Z.; Davis, B. P.; Payne, W. E.; Garrels, J. I.; *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 69.
170. Martins, A. M.; Cordeiro, C. A.; Ponces Freire, A. M.; *FEBS Lett.* **2001**, 499, 41.
171. Aguilera, J.; Prieto, J. A.; *Curr. Genet.* **2001**, 39, 273.
172. Molin, M.; Norbeck, J.; Blomberg, A.; *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 1415.
173. Maeta, K.; Izawa, S.; Inoue, Y.; *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 253.
174. Ispolnov, K.; Gomes, R. A.; Silva, M. S.; Freire, A. P.; *J. Appl. Microbiol.* **2008**, 104, 1092.
175. Meyerhof, O.; *Experientia* **1948**, 4, 169.
176. Kalapos, M. P.; *J. Theor. Biol.* **1998**, 193, 91.
177. Fujisawa, T.; Akagi, S.; Kawase, M.; Yamamoto, M.; Ohmori, S.; *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* **2005**, 303, 489.
178. Gerrard, J. A.; *Aust. J. Chem.* **2002**, 55, 299.