



UFRGS-UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**Efeitos da dieta hiperlipídica aquecida e dieta hiperlipídica normal na
formação de produtos finais de glicação avançada e de espécies
reativas de oxigênio em ratos wistar.**

Mestrando: Adriano Martimbianco de Assis

Orientador: Prof. Dr. Marcos Luiz Santos Perry

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2009.

*“Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado.”*

Isaac Newton

Agradecimentos

Primeiramente, aos meus pais, Heitor e Rosaura, pelo exemplo de pessoas que são para mim, pelos ensinamentos, pela confiança, pela força, pelo apoio, pelo amor incondicional e por todo suporte para eu chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Pablo e Marcos, pelo auxílio, pelo carinho, pelo companheirismo e ajuda nestes anos.

À minha vó Irne, pelo apoio, pelo carinho, pelo amor e pelos cuidados sempre prestados a minha pessoa.

À minha namorada, Aline, pelo amor, pelo companheirismo, pelo carinho, pela compreensão, pelas conversas, pela força de sempre seguir em frente e por ser uma pessoa muito especial na minha vida.

À todos colegas do Laboratório de Estudo do Metabolismo Energético do Sistema Nervoso Central e do Metabolismo Intermediário (Laboratório 27, Departamento de Bioquímica – UFRGS).

Ao PPG em Ciências Biológicas: Bioquímica (UFRGS), às agências financiadoras brasileiras e rio-grandense de fomento à pesquisa e de bolsas de pós-graduação – CAPES, CNPq, PROPESQ/UFRGS e FAPERGS.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS.

Aos professores do PPG – Bioquímica da UFRGS.

Ao Professor Dr. José Cláudio F. Moreira, pelo auxílio e apoio sempre prestado.

Ao meu orientador Perry, pela amizade, pelas partidas de tênis, pela compreensão, pela paciência, pelos ensinamentos, por toda força mesmo nos momentos difíceis, pelas oportunidades e por ser um exemplo de pesquisador.

Resumo

O dano ao ADN pode estar associado com o diabetes mellitus tipo II (T2DM) e suas complicações, incluindo estresse oxidativo. Os parâmetros bioquímicos relacionados com o metabolismo glicídico (glicose, insulina, TTG e TSI) e parâmetros corporais (peso corporal, tecido adiposo) foram avaliados após 12 meses de tratamento com dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica aquecida. Após o período experimental, os ratos tratados com dietas hiperlipídicas obtiveram aumento de peso corporal e aumento de glicemia e insulinemia quando comparado ao grupo controle normolipídico. A dieta hiperlipídica (HFD) e a dieta hiperlipídica aquecida (HFTD) também levaram a uma redução na sensibilidade à insulina e na tolerância à glicose, independentemente dos tempos estudados. Interessantemente, somente os animais submetidos à dieta aquecida demonstraram redução na oxidação de glicose pelo tecido adiposo epididimal. Mostramos que ambas as dietas hiperlipídicas tem a capacidade de reduzir a síntese de glicogênio pelas vias, direta e indireta. A dieta aquecida acarretou um aumento significativo na peroxidação lipídica no fígado em relação aos demais grupos. Utilizando o ensaio cometa, verificamos um aumento significativo de dano ao ADN em sangue e hipocampo dos ratos submetidos às dietas hiperlipídicas, tendo o grupo HFTD aumento maior em relação ao HFD. Estes resultados sugerem que uma correlação positiva entre dieta hiperlipídica, alteração no metabolismo glicídico, estresse oxidativo e dano ao ADN. Contudo, o aquecimento da dieta parece agravar tais resultados.

Abstract

Many studies have demonstrated that DNA damage may be associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its complications. The goal of this study was to evaluate the effects of the potential relationship between fat (thermolyzed) intake, glucose dyshomeostasis and DNA injury in rats. Biochemical parameters related to glucose metabolism (i.e., blood glucose levels, insulin tolerance tests, glucose tolerance tests and fat cell glucose oxidation) and general health parameters (i.e., body weight, retroperitoneal and epididymal adipose tissue) were evaluated in rats after a 12-month treatment with either a high fat or a high thermolyzed fat diet. The high fat diet (HFD) and high fat thermolyzed diet (HFTD) showed increased body weight and impaired insulin sensitivity at the studied time-points in insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT). Interestingly, only animals subjected to the HFTD diet showed decreased epididymal fat cell glucose oxidation. We show which high fat diets have the capacity to reduce glycogen synthesis by direct and indirect pathways. HFTD promoted an increase in lipid peroxidation in the liver, demonstrating significant damage in lipids in relation to other groups. Blood and hippocampus DNA damage was significantly higher in animals subjected to HFDs, and the highest damage was observed in animals from the HFTD group. Striatum DNA damage was significantly higher in animals subjected to HFDs, compared with the control group. These results show a positive correlation between high fat diet, glucose dyshomeostasis, oxidative stress and DNA damage.

ÍNDICE

Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Lista de Abreviaturas.....	VII
Lista de Figuras.....	VIII
Parte I. Introdução	
1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	21
Parte II. Resultados	
Capítulo 1. High fat and high thermolyzed fat diets promote insulin resistance and increase DNA damage in rats.....	24
Parte III.	
3. Discussão.....	58
4. Conclusões.....	64
5. Perspectivas.....	64
6. Referências Bibliográficas.....	65

Lista de Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucléico

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Advanced Glycation end Products*)

AMPK : Adenosina Monofosfato Cinase

C: Grupo Controle

CML: Carboximetil-lisina

CPT1 : Carnitina Palmitoil Transferase 1

DAG: Diacilglicerol

DM: Diabetes Mellitus

EAO: Espécies Ativas de Oxigênio

HFD: Grupo Dieta Hiperlipídica

HFTD: Grupo Dieta Hiperlipídica Aquecida

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IRS-1: Substrato do Receptor de Insulina 1

MCP1: Proteína Quimiotática de Monócitos 1

NF-κB: Fator Nuclear κB

PAI-1: Ativador Inibidor do Plasminogênio 1

PARP: Poli (ADP ribose) polimerase

PKC: Proteína Cinase C

RAGE: Receptor para AGE

RI: Resistência à Insulina

TNF-α: Fator Alfa de Necrose Tumoral

Lista de Figuras	Pág.
Figura 1. Teoria Lipotóxica (Adaptado de Russel, 2004)	7
Figura 2. Etapas da Reação de Maillard.....	11
Figura 3. Ganho de peso e tipo de gordura na dieta em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas.....	56

PARTE I

1. Introdução

A obesidade é definida como um acúmulo em excesso de gordura associado com o aumento em número e tamanho das células adiposas. A obesidade se tornou um problema mundial, especialmente em países industrializados, embora a prevalência de obesos venha aumentando em países em desenvolvimento (Puoane et al., 2002). Um dos fatores chave para este acontecimento pode ser o aumento da urbanização. O movimento populacional das áreas rurais para as urbanas está associado com as grandes mudanças no estilo de vida, particularmente o aumento da disponibilidade de alimentos e bebidas com alto teor calórico (Rossi-Espagnet et al., 1991).

Atualmente, cerca de 1 bilhão de pessoas estão com sobrepeso ou obesos (Smyth e Heron, 2006). Como consequência desta obesidade, 60% de todos os casos de diabetes mellitus tipo 2 podem ser atribuídos ao sobrepeso (Smyth e Heron, 2006).

O aumento da massa do tecido adiposo, principalmente o tecido adiposo visceral ocasiona um aumento dos ácidos graxos livres circulantes, com consequente aumento de triglicerídeos no fígado, músculo esquelético, cardíaco, e células β das ilhotas de Langerhans (Seppala-Lindroos et al., 2002; Kelley et al., 2003).

Resistência à insulina é a diminuição da habilidade da insulina em controlar a produção hepática de glicose e em aumentar a utilização de glicose pelos tecidos (Walker, 1995).

Dietas hiperlipídicas conduzem ao aumento de adiposidade, resistência à insulina e dano ao metabolismo glicídico em ratos e em humanos (Terauchi

et al., 2007; Pichon et al., 2006). Dietas com alto teor de gordura aumentam a quantidade de substrato disponível para a oxidação e o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória mitocondrial, aumentando a produção de radicais livres (Yang et al., 2006).

Espécies ativas de oxigênio (EAO) causam dano oxidativo em componentes mitocondriais sob a forma de peroxidação lipídica, modificações protéicas e mutação ao ADN, levando a uma disfunção mitocondrial, que irá contribuir para uma larga escala de patologias incluindo doenças neurodegenerativas e cardiovasculares, diabetes e a degeneração associada à idade (Slim et al., 1996).

O fígado tem um papel central na manutenção na homeostase do metabolismo. Devido à importância metabólica do fígado, o estresse oxidativo ocasiona efeitos deletérios múltiplos que prejudicam o organismo como um todo (Hamelet et al., 2007). Este órgão fornece substrato energético para os tecidos periféricos através do ciclo de Cori e do catabolismo do glicogênio. (Raval et al., 2006; Kohen e Nyska, 2002).

É bem conhecido que o preparo dos alimentos a temperaturas elevadas (acima de 120°C) produzem glicotoxinas conhecidas como produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *“Advanced Glycation End Products”*) (Thornalley, 2005; Uribarri et al., 2005). A produção destas glicotoxinas (exógenas) é dependente da temperatura, do tempo de preparo dos alimentos, do método de preparo e da composição dos alimentos (Thornalley, 2005; Uribarri et al., 2005). As reações que produzem as glicotoxinas exógenas e endógenas são conhecidas como reações de Maillard (Thornalley, 2005; Uribarri et al., 2005).

O aumento dos níveis plasmáticos de produtos finais de glicação avançada, gerado pela reação não enzimática de grupos amino e açúcares reduzidos, está implicado em diversas doenças crônicas caracterizadas pelo aumento de estresse oxidativo e dano inflamatório, incluindo retinopatia, nefropatia e insuficiência cardíaca associadas ao diabetes (Vlassara e Palace, 2002; Finkel e Holbrook, 2000).

1.1. Obesidade

A obesidade é um problema de saúde pública que vem aumentando a cada dia, causando uma série de patologias. Esta obesidade ocorre quando a ingestão energética é maior que o gasto calórico.

O sobrepeso nos países desenvolvidos e nos países em desenvolvimento cresce de maneira preocupante. Das mulheres na faixa etária entre 20 anos e 39 anos, 29% são consideradas clinicamente obesas nos Estados Unidos (Flegal et al., 2004).

A obesidade é um estado pró-inflamatório, o tecido adiposo hipertrofiado é resistente à insulina e à leptina e apresenta um acentuado aumento na liberação de ácidos graxos e citocinas pró-inflamatórias (Després e Lemieux, 2006).

O tecido adiposo do obeso tem uma acentuada infiltração de macrófagos. Os ácidos graxos liberados pelos adipócitos estimulam os macrófagos residentes no tecido adiposo a aumentar a expressão e liberação do fator de necrose tumoral α . Este por sua vez estimula a síntese de MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) nos adipócitos e a liberação de ácidos

graxos (Suganami et al., 2005). O aumento dos ácidos graxos, diglicerídeos e ceramida no músculo esquelético, células β das ilhotas de Langerhans e fígado provoca resistência à insulina e morte celular nestes tecidos (Wang et al., 2008). A resistência à insulina e à leptina ocorre tanto nos tecidos periféricos quanto no sistema nervoso central. O hipotálamo é o principal local onde convergem impulsos neurais central e periféricos, e hormônios que participam da homeostasia dos níveis de alguns substratos energéticos, bem como da massa do tecido adiposo (Carvalho et al., 2003; Lam et al., 2005; Pocius et al., 2006). A leptina, insulina e aumento de glicose e ácidos graxos de cadeia longa inibem a AMPK no núcleo arqueado, com a consequente ativação da acetilCoA carboxilase (E.C. 6.4.1.2) e inibição da CPTI (EC 2.3.1.21) e determinam um aumento da liberação de peptídeos anorexígenos e uma diminuição da liberação do peptídeos orexígenos. Na obesidade e no diabetes tipo II esta sinalização está comprometida.

1.2. Resistência à Insulina

A resistência à insulina é definida como um decréscimo da resposta dos tecidos periféricos à ação da insulina. Indivíduos com resistência à insulina estão predispostos ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo II. Resistência à insulina é reconhecida como integrante das características da chamada síndrome metabólica, que compreende intolerância à glicose, obesidade, hipertrigliceridemia, baixo colesterol HDL, hipertensão e aterosclerose (Xu et al., 2003).

Estudos em humanos obesos e resistentes à insulina mostram claramente a relação entre ativação crônica de vias de sinalização inflamatórias

e decréscimo da sensibilidade à insulina. Por exemplo, elevados níveis de Fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 8 (IL-8) foram encontrados em pacientes diabéticos e com resistência à insulina (Roytblat et al., 2000; Sartipy e Loskutoff, 2003)

A resistência à insulina aumenta a produção de glicose que determina uma maior produção de insulina pelas células β -das ilhotas de Langerhans, num primeiro momento há hipertrofia e hiperplasia das células β . Com o aumento da lipotoxicidade, glicotoxicidade e do estresse oxidativo nas células β há uma morte acentuada das mesmas (Unger e Orci, 2000).

1.3. Teoria Lipotóxica

O aumento intracelular das concentrações de acil-CoA de cadeia longa (Thompson e Cooney, 2000) e de diacilglicerol (DAG) (Schmitz-Peiffer et al., 1997) estão associados com os níveis elevados de triglicerídeos e de ácidos graxos livres. O acúmulo de acil-CoA e de DAG está estritamente ligado com as mudanças “*downstream*” na via de sinalização do receptor de insulina (Yu et al., 2002), que pode, em parte, induzir a resistência à insulina. A síntese do DAG, um metabólito da hidrólise de triglicerídeos intracelulares, foi sugerida como um sinal modulador na resistência à insulina, pois ele é um conhecido ativador alostérico da serina cinase proteína cinase C (PKC) (EC 2.7.11.13) (Bronfman et al., 1988; Nishizuka, 1955). A ativação de PKC (especialmente a PKC- θ) pode fosforilar o substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1) no sítio de serina/treonina. Em consequência, a fosforilação de tirosina do IRS-1 é inibida (Itani et al., 2000), ocorre uma menor ligação da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) ao IRS-1 e uma menor translocação do transportador de glicose (GLUT 4)

para a membrana estimulada por insulina (Griffin et al., 1999) (Figura 1). O acúmulo de triglicerídeos intracelulares também pode estar associado com ativação da PKC- θ (Griffin et al., 1999) e PKC- ϵ (Schmitz-Peiffer et al., 1997) e a translocação da PKC- β e PKC- δ do citosol para a membrana celular (Itani et al., 2002). Assim como a atuação na sinalização da insulina, uma alteração na ativação de isoformas da PKC pode contribuir com a ativação da via do fator nuclear – κ B (NF- κ B) Itani et al., 2002). A PKC pode fosforilar diretamente o inibidor do NF- κ B, I κ B (Gosh e Baltimore, 1990). Esta fosforilação do I κ B resulta na liberação de NF- κ B que é translocado do citosol para o núcleo (Barnes e Karin, 1997), onde induz a transcrição de genes pró-inflamatórios como o TNF- α e a interleucina 6 (IL-6) (Barnes e Karin, 1997).

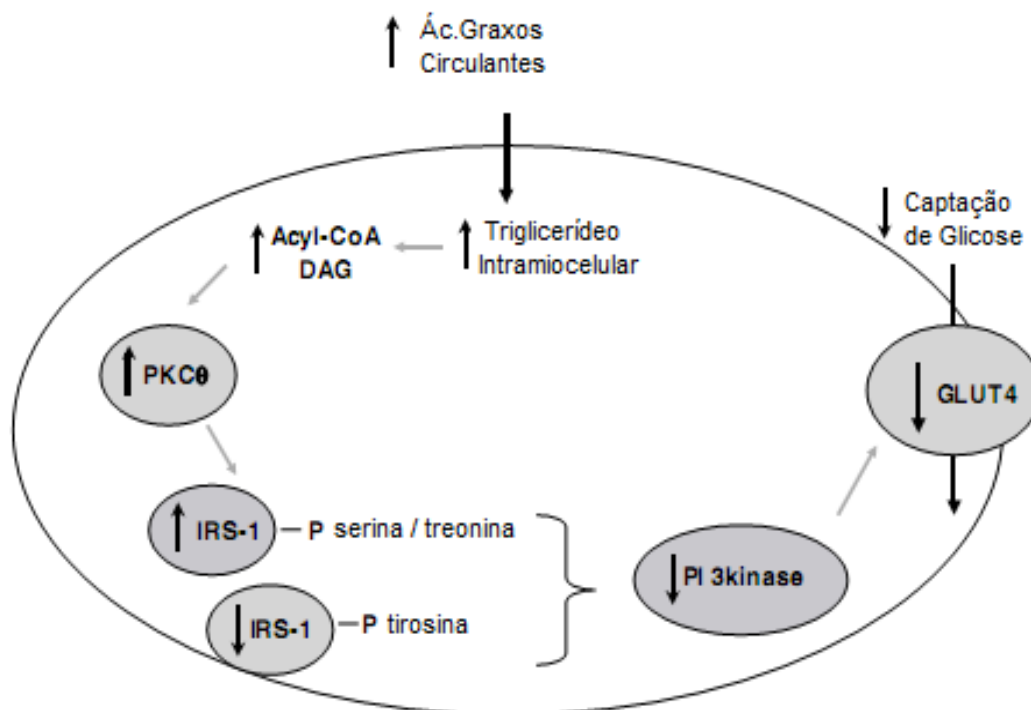


Figura 1. Teoria Lipotóxica (Adaptado de Russel, 2004)

Outro fator ligado ao acúmulo de triglicerídeos intramiocelulares com a resistência à insulina é o estresse oxidativo. O acúmulo de lipídeos em fígados com esteatose está associado com o fenômeno de peroxidação (MacDonald et al., 2001) análogo ao observado em lipoproteína de baixa densidade (LDL) na lesão aterosclerótica (Glass e Witztum, 2001). Indivíduos obesos, quando comparado a indivíduos não obesos, têm maior suscetibilidade a estresse oxidativo do LDL e demonstram maior índice de peroxidação lipídica, como as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (Dandona et al., 2001).

1.4. Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de alterações metabólicas caracterizadas principalmente pela hiperglicemia, resultado de defeitos na sua ação ou secreção de insulina, ou em ambos.

Atualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que cerca de 250 milhões de pessoas sejam diabéticas, o que significa 7,9% da população adulta. Segundo projeções da OMS, a população de indivíduos diabéticos a nível mundial vai aumentar até 2025 em mais de 50%, representando cerca de 380 milhões de pessoas. Pacientes com diabetes tipo I ou II têm uma propensão de cerca de 40% para complicações diabéticas microvasculares, mesmo tendo um controle de glicemia aceitável (UK prospective diabetes study group, 1998; Narayan et al., 2003). A maior causa de mortalidade em pessoas com diabetes mellitus tipo II são as doenças cardiovasculares (Kannel e McGee, 1979; Stamler et al., 1993).

As complicações crônicas do DM compreendem a nefropatia, com possível evolução para falência renal, retinopatia, com possibilidade de

cegueira, cardiopatia, com possibilidade de falha cardíaca, neuropatia, com possibilidade de neurodegeneração e artropatias, com risco de úlceras nos pés, amputações, entre outras. Pessoas com diabetes apresentam elevado risco de doença vascular aterosclerótica, como doenças coronarianas, arterial periférica e vascular cerebral (Oliveira, 2003).

A morbidade causada pelo DM é tradicionalmente classificada em doenças micro e macrovasculares (Huebschmann et al., 2006). Embora as complicações macrovasculares tenham recebido maior atenção, as complicações microvasculares são características no diabetes e a hiperglicemia contribui para o seu desenvolvimento. Vários mecanismos relativos à hiperglicemia crônica são provavelmente responsáveis pelas complicações micro e macrovasculares, que incluem a via do poliol, mediada pela aldolase redutase (E.C. 1.1.1.21), a via das hexosaminas, a ativação da proteína cinase C, a geração de estresse oxidativo, ativação da poli (ADP ribose) polimerase (PARP) e o acúmulo de produtos avançados de glicação (Brownlee, 2001; Beckman et al., 2002).

Danos induzidos por hiperglicemia envolvem uma interação complexa entre vários fatores, incluindo predisposição genética, tabagismo, dislipidemias e alterações em fatores de coagulação sanguínea (Farouque et al., 2000).

No DM coexiste uma desordem generalizada do metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas, com conseqüências diretas sobre as rotas que abrangem estas e outras biomoléculas.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) (Who, 1997) em conjunto com outras organizações propôs uma nova classificação para as principais formas de diabetes:

- A categoria designada tipo I, inclui todas as formas que são causadas por destruição primária auto-imune das células β do pâncreas ou algum outro tipo de defeito primário da função deste tipo celular, que leve a uma secreção de insulina insuficiente para os tecidos periféricos alvo.
- A categoria designada tipo II inclui a forma mais comum de diabetes, resultante da resistência dos tecidos periféricos alvo à ação da insulina, combinada a uma secreção inadequada de tal hormônio.

1.5. Produtos Finais de Glicação Avançada

Os Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) são um grupo heterogêneo de moléculas, produzidas por glicação e oxidação *in vivo*. A glicação é a principal causa espontânea de dano a proteínas celulares e extracelulares em sistemas fisiológicos, acometendo cerca de 0,1 a 0,2 % de resíduos de arginina e de lisina (Thornalley, 2002; Thornalley et al., 2003).

Na Figura 2, podemos ver a glicação protéica (conhecida como Reação de Maillard) ocorrendo entre açúcares redutores e grupos amino livres das proteínas, via adição nucleofílica, formando bases de Schiff. Essas bases são rearranjadas para uma forma mais estável e essencialmente irreversível, chamada de produtos de Amadori. Durante esta reorganização, grupos intermediários carbonila são acumulados. Estes compostos são conhecidos como α -dicarbonilas ou oxoaldeídos, incluindo a 3-deoxiglicosona e o metilglioxal (Baynes e Thorpe, 1999). As α -dicarbonilas têm a habilidade de reagir com grupos amino, sulfidril e guanidina em proteínas (Lo et al., 1994; Frye et al., 1998). As α -dicarbonilas podem também reagir com grupos lisina e

arginina de proteínas, formando compostos estáveis como os aductos N-(carboximetil)lisina (Basta, 2008).

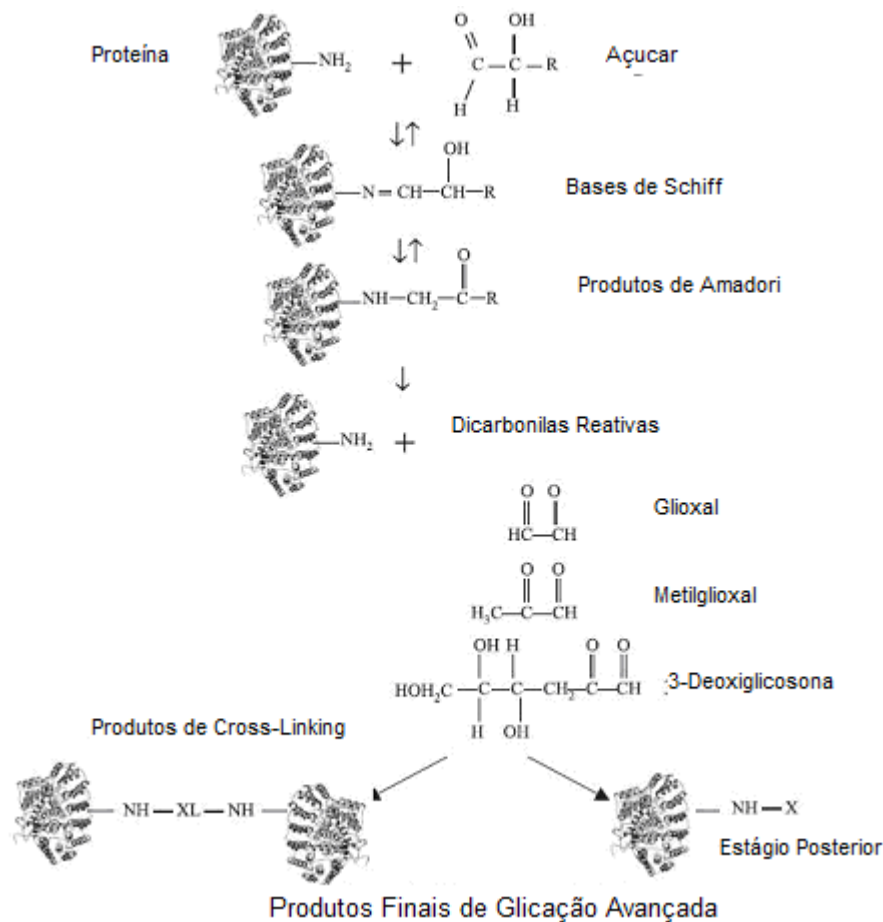


Figura 2. Etapas da Reação de Maillard.

Devido à heterogeneidade de estruturas de AGEs, pode ocorrer formação de ligações cruzadas. As proteínas afetadas por este processo geralmente são estáveis e de longa vida como o colágeno. A formação de ligações cruzadas induzida por ligação de AGEs aumenta a rigidez da matriz protéica, impedindo seu funcionamento, bem como aumenta a resistência à remoção por processos proteolíticos, afetando o processo de reposição tecidual. Esses processos permitem o avançar do envelhecimento e aceleram o diabetes (Paul e Bailey, 1999).

Atualmente, são conhecidos diferentes tipos de AGEs, sendo classificados de acordo com a sua origem. Takeuchi et al., (2004), reconheceram seis classes distintas de AGEs: os derivados de glicose (AGE-1), os derivados de outros carboidratos, como os de gliceraldeído (AGE-2), os de alfa-dicarbonila, como os glicolaldeídos (AGE-3), metilglioxal (AGE-4), glioxal (AGE-5), 3-deoxiglicosona (AGE-6).

Glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona são formados na glicação de proteínas por glicose, entretanto, glioxal é também formado na peroxidação de lipídios, metilglioxal pela fragmentação de trioses fosfato e pelo catabolismo da acetona e de treonina, e a 3-deoxiglicosona a partir de glicose-3-fosfato. Em alguns casos, a glicação está envolvida não somente com a glicose, mas também com compostos formados pela glicação por outros compostos já formados por glicoxidação. A partir da glicose, a via não oxidativa pode gerar pirralina; na via oxidativa pode gerar pentosidina e N-6-carboximetilisina.

Os AGEs são importantes na etiopatogenia do diabetes tipo II porque modificam proteínas intracelulares, de matriz celular e proteínas circulantes (Brownlee, 2005). Os AGEs são os principais responsáveis pela retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética, já que se formam intracelularmente e extracelularmente (Ahmed, 2005). São provenientes de alimentos (Vlassara e Uribarri, 2004), cigarro (Cerami et al., 1997) e são prejudiciais independentemente da hiperglicemia.

Estes produtos de glicação são formados em excesso, principalmente durante o envelhecimento e o diabetes mellitus (DM) (Schleicher et al., 1997). No caso do DM, uma das conseqüências prejudiciais da hiperglicemia crônica e do constante estresse oxidativo, causados por um controle glicêmico

inadequado, é a formação acelerada dos AGEs *in vivo*, via reação de Maillard (Lapolla et al., 2005). Esta hiperglicemia crônica pode resultar em um significativo acúmulo de AGEs em certas proteínas de vida longa como as do cristalino (Sell et al., 1990). O cristalino está sujeito a uma progressiva modificação por AGEs, ocorrendo um escurecimento lenticular e acúmulo de ligações cruzadas (Monnier et al., 1981). O resultado dessa opacificação é a formação de cataratas, processo associado com diabetes e envelhecimento.

Os AGEs têm sido identificados também, a partir de fontes exógenas como tabaco e em certos alimentos, principalmente aqueles que sofrem aquecimento (O'Brien e Morrissey, 1989). Estes AGEs exógenos são os principais causadores destes efeitos deletérios ao organismo, podendo ser mais deletérios do que os AGEs endógenos (Huebsschmann et al., 2006).

1.5.1. Fontes de Produtos Finais de Glicação Avançada

1.5.1.1 Fontes Endógenas

Pessoas diabéticas têm níveis mais elevados de AGEs do que as não diabéticas porque tanto a hiperglicemia como o estresse oxidativo contribuem para esse acúmulo. Estudos mostram níveis de AGEs 20 a 30% mais elevados em pessoas com diabetes sem complicações e níveis de 40 a 100% mais altos em pessoas com diabetes tipo II com complicações por doença arterial coronariana ou microalbuminúria (Sharp et al., 2003). Indivíduos com doença renal em estágio final apresentam aumento significativo de AGEs circulantes comparados com indivíduos saudáveis (cinco a dez vezes) (Raj et al., 2000). O transplante renal normalizou os níveis de AGEs em indivíduos com doença renal terminal (Makita et al., 1991). A literatura indica que o turnover de AGEs é

dinâmico e que os AGEs endógenos são determinados pela produção de AGEs (glicemia endógena e estresse oxidativo), assim como a excreção renal destes compostos.

1.5.1.2 Fontes Exógenas

A formação de AGEs geralmente é endógena, porém, estes podem ser derivados de fontes exógenas como tabaco e alimentos (Bucala et al., 1994; Cerami et al., 1997).

Os AGEs derivados da dieta são similares aos AGEs endógenos no que diz respeito a suas propriedades pró-oxidantes e inflamatórias (Cai et al., 2002; Vlassara e Uribarri, 2004). Aminolipídios provenientes de dietas hiperlipídicas (4-hidroxinonenal, N-carboximetilisina (CML) e seus análogos) são também alvos de peroxidação (Nakamura et al., 1993; Fu et al., 1996). Assim, a ingestão de produtos de glicação e lipoxidação pode acelerar a geração de radicais livres induzindo ao estresse oxidativo via carbonilação (Miyata et al., 2003). A auto-oxidação da glicose também é acompanhada pela geração de espécies ativas de oxigênio, tal como o radical superóxido (Wolff e Dean, 1987).

Em humanos, diabéticos ou não, uma única refeição com alto teor de AGEs leva a um aumento significativo de AGEs séricos, comparado a uma refeição com baixo nível de AGEs (Koschinsky et al., 1997). Cerca de 10% dos AGEs são absorvidos, e 2/3 do total absorvido é retido (Koschinsky et al., 1997). O epitélio intestinal absorve derivados primários (Produtos de Amadori), assim como AGEs intermediários e tardios (Finot, 2005). Mono, di ou tripeptídeos modificados por AGEs podem ser prontamente transportados

através da parede intestinal levando consigo um ou mais produtos de glicação. A presença, na maioria dos alimentos, de dois produtos derivados da formação dos AGEs (Metilglioxal e N-Carboximetilisina) permitiu estudos que confirmam seu papel tóxico em vários órgãos (Cai et al., 2002; Lin et al., 2003; Peppas et al. 2003; Vlassara e Uribarri, 2004).

Goldberg e cols., 2004, em seu trabalho quantificou para fins comparativos, a quantidade de produtos finais de glicação avançada de 250 alimentos comumente utilizados pelos humanos, alguns deles estão listados na Tabela 1. A cocção a altas temperaturas (exemplo: assado, grelhado, fritura e cozimento) aumenta significativamente os índices dos produtos finais de glicação avançada (Goldberg et al., 2004), enquanto o cozimento dos alimentos a temperaturas mais baixas, por menor tempo e com maior conteúdo de água (fervura ou vapor) permitem um menor aumento destes produtos. (Goldberg et al., 2004; Uribarri et al., 2005).

Tabela 1. Conteúdo de AGEs em alimentos preparados por métodos de cozimento padrão. (* AGEs foram quantificados através de um anticorpo para N-Carboximetilisina). Adaptado de Goldberg et al., 2004.

Alimentos	AGE* (kU/g ou /ml de alimento)
Gorduras	
Amêndoas, assadas	66,5 kU/g
Óleo de Oliva	120 kU/ml
Manteiga	265 kU/g
Maionese	94 kU/g
Proteínas	
Peito de frango, grelhado x 15 min	58 kU/g
Peito de frango, frito x 15 min	61 kU/g
Carne, fervida x 60 min	22 kU/g
Carne, grelhada x 15 min	60 kU/g
Atum, assado	6 kU/g
Atum, grelhado	51 kU/g
Queijo americano	87 kU/g
Queijo	56 kU/g
Ovo frito	27 kU/g
Gema de ovo fervida	12 kU/g
Tofu cru	8 kU/g
Tofu grelhado	41 kU/g
Carboidratos	
Pão integral de trigo	0.54 kU/g
Panqueca caseira	10 kU/g
Leite de vaca integral	0.05 kU/mL
Leite humano integral	0.05 kU/mL
Emfamil (fórmula infantil)	4.86 kU/mL
Maçã	0.13 kU/g
Banana	0.01 kU/g
Cenouras	0.1 kU/g
Feijões verdes	0.18 kU/g

1.5.2. Diabetes Mellitus e Produtos Finais de Glicação Avançada

Os AGEs acumulam-se em proteínas da matriz extracelular, como no processo fisiológico de envelhecimento (Frye et al., 1998); entretanto, isso ocorre mais rapidamente em indivíduos com diabetes mellitus do que em indivíduos não diabéticos (Schleicher et al., 1997). Também foi demonstrado que há uma grande correlação entre a importância dos depósitos de AGEs e a severidade das complicações diabéticas (Hammes et al., 1998).

Como já foi citado anteriormente, a formação e o acúmulo de AGEs são características em tecidos de indivíduos mais idosos (envelhecimento) e em pacientes com diabetes mellitus, sendo que esses produtos estão implicados com a patogênese das complicações micro e macrovasculares no diabetes (Singh et al., 2001). A disfunção microvascular, incluindo o espessamento da membrana basal, aumento da permeabilidade vascular estado pré-trombótico, e redução de fluxo sanguíneo, é uma característica onipresente na doença microvascular da retina, rins e nervos periféricos (Singh et al., 2001).

O aumento de AGEs séricos está associado com o aumento da doença arterial coronariana em indivíduos com diabetes tipo II (Kilhovd et AL., 1999). Os AGEs podem estar relacionados com a aterosclerose de várias maneiras, incluindo aumento da disfunção endotelial, aumento de LDL vascular, aumento da desestabilização de placas ateroscleróticas, proliferação neoíntima (membrana interna) (Zhou et al., 2003) e inibição da recuperação vascular após injúria.

A inflamação e disfunção endotelial fornecem condições favoráveis para a progressão gradual de ateroma em indivíduos diabéticos (Basta et al., 2004). Os mecanismos ateroscleróticos mediados por AGEs incluem a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (E.C. 1.14.139) (Vlassara et al., 1994), resistência à regeneração vascular do colágeno em *crosslinks*, redução da remoção do LDL e pela redução do reconhecimento do receptor de LDL pelo LDL modificado por AGEs (Vitek et al. 1994; Brownlee et al., 1991).

1.5.3. Estresse Oxidativo e Produtos Finais de Glicação Avançada

A formação de espécies ativas de oxigênio pode alterar a integridade genômica celular. Espécies ativas de oxigênio e espécies ativas de carbonil causam dano celular e reagem diretamente com ADN, proteínas e lipídios (Berlett e Stadtman, 1997).

Espécies ativas de oxigênio são também geradas durante a formação de AGEs, causando um auto-perpetuamento do ciclo de formação AGEs/Espécies ativas de oxigênio, que ocorre em doenças como o diabetes (Forbes et al., 2005).

Grande parte do dano tecidual e morte celular associada com a hiperglicemia crônica no diabetes são mediadas por radicais livres. Na hiperglicemia de pacientes diabéticos, o estresse oxidativo gerado é devido, primeiramente, ao excesso de produção de radicais livres e, em segundo lugar, ao aumento da oxidação de substratos (açúcares, gorduras não saturadas, proteínas glicadas), aumento da auto-oxidação da glicose e a um decréscimo de antioxidantes.

A ligação entre estresse oxidativo e AGEs pode, em parte, ser explicada pela relação entre hiperglicemia e disfunção endotelial e dano tecidual. Estudos demonstraram que a interação entre AGEs e seu receptor (RAGE) induz a ativação de estresse oxidativo, estimula a produção e liberação de citocinas, amplificando seu dano tecidual (Wautier et al., 1994).

1.5.4. Receptores para AGEs

A importância em compreender a relação dos AGEs com seus receptores está no fato de que estes desempenham papéis negativos e positivos nas ações e destinos dos AGEs (Huebschmann et al., 2006). No seu papel positivo, alguns receptores normalmente ajudam na retirada dos AGEs da circulação e podem auxiliar a atenuar os efeitos pró-oxidantes dos AGEs. Em contrapartida, o receptor para AGE (RAGE) e outros receptores parecem ativar uma resposta estressante, desencadeando inflamação e disfunção celular.

As principais moléculas AGE-ligantes descritas incluem o complexo AGE-receptor específico, composto por R1, R2 e R3 (Li et al., 1996), receptor para AGE (RAGE) e receptores como o CD-36 (Ohgami et al., 2001) e SCR-II (Araki et al., 1995).

Nos receptores de AGEs benéficos que aumentam sua remoção, incluem-se AGE-R1 e lisozima (Li et al., 1996; Lu et al., 2004). O AGE-R1 é ativo em ligação e degradação de AGE-ligante específico. A baixa expressão de AGE-R1 em rins de camundongos diabéticos não obesos é associada a altos níveis de AGEs nos tecidos e com doença renal. Da mesma forma, células mononucleares circulatórias humanas de indivíduos diabéticos com

complicações diabéticas severas apresentaram baixa expressão de AGE-R1 e alto nível de AGEs séricos (He et al., 2001). AGE-R1 pode exercer uma ação protetora contra a ativação celular promovida por AGEs e RAGE.

RAGE é um membro multiligante da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular, que foi primeiramente descrito como um receptor para aductos modificados por glicosilação não enzimática entre proteínas e lipídios, que ocorre principalmente no diabetes mellitus (Neeper et al., 1992). RAGE é expresso em uma grande quantidade de tecidos, mas principalmente no coração, pulmões e músculo esquelético. Este receptor é uma proteína de aproximadamente 45 kDa, originalmente isolada do endotélio pulmonar bovino (Schmidt et al., 1992). Este receptor consiste de 403 aminoácidos em humanos, ratos e camundongos. A região extracelular deste receptor consiste em um domínio imunoglobulina tipo V, seguido por dois domínios imunoglobulina tipo C, estabilizadas por duas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína (Dattilo et al., 2007).

A via de sinalização do RAGE pode ser inicializada por diversos ligantes, como AGEs, proteínas S100, proteína beta amilóide, entre outros (Schmidt et al., 2001; Chavaskis et al., 2003). O sistema de receptores AGEs podem ser regulados por fatores relacionados ao diabetes mellitus, assim como glicose, insulina, AGEs e espécies ativas de oxigênio (Shanmugam et al., 2003; Muller et al., 2004).

2. Objetivos

2.1. Geral

A obesidade e o diabetes mellitus se tornaram as principais doenças da atualidade, elas produzem grande impacto na sociedade, economia e na saúde coletiva. Levando em consideração estes aspectos e da ampla utilização de alimentos aquecidos a altas temperaturas pela sociedade, do fácil acesso a alimentos ricos em gorduras, a inexistência em nosso Departamento de um modelo de glicotoxinas relacionadas a dieta e a inexistência de trabalhos anteriores focando dieta rica em glicotoxinas e dano ao ADN, nós consideramos pertinente o objetivo geral desta Dissertação; responder a seguinte questão: a dieta hiperlipídica aquecida causa maior dano ao ADN, maior estresse oxidativo e mais resistência à insulina do que uma dieta hiperlipídica não aquecida?

2.2. Específicos

- Tratar os ratos por 12 meses com dieta hiperlipídica e avaliar o dano ao ADN, estresse oxidativo e resistência à insulina em relação à dieta controle?
- O aquecimento desta dieta irá ampliar o dano causado pela dieta hiperlipídica?
- O SNC estará protegido dos efeitos deletérios desta dieta?
- Poderemos relacionar o dano ao ADN com estresse oxidativo?

PARTE II

Capítulo 1

**High fat and high thermolyzed fat diets promote insulin resistance and
increase DNA damage in rats**

Manuscrito aceito pela Revista Experimental Biology and Medicine (2009)

**High fat and highly thermolyzed fat diets promote insulin resistance
and increase DNA damage in rats**

A. M. de Assis¹, D. K. Rieger¹, A.L. Santos¹, C. Battu², S. Raymundi¹, R. F. da
Rocha¹, A. C. Andreazza¹, M. Farina³, L. N. Rotta^{4,5}, C. Gottfried¹, C. A.
Gonçalves¹, J. C. Moreira¹, M. L. S. Perry^{1*}.

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

² Programa de Pós-Graduação em Neurociências, ICBS, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil

³ Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁴ Programa de Pós Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada,
Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil.

⁵ Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal
de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: M. L. S. Perry

Departamento de Bioquímica, Rua Ramiro Barcelos 2600 Anexo,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003,
Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5551

Fax: +55 51 3308 5540

E-mail: marcos.perry@gmail.com

Abstract

Many studies have demonstrated that DNA damage may be associated with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and its complications. The goal of this study was to evaluate the effects of the potential relationship between fat (thermolyzed) intake, glucose dyshomeostasis and DNA injury in rats. Biochemical parameters related to glucose metabolism (i.e., blood glucose levels, insulin tolerance tests, glucose tolerance tests and fat cell glucose oxidation) and general health parameters (i.e., body weight, retroperitoneal and epididymal adipose tissue) were evaluated in rats after a 12-month treatment with either a high fat or a high thermolyzed fat diet. The high fat diet (HFD) and high fat thermolyzed diet (HFTD) showed increased body weight and impaired insulin sensitivity at the studied time-points in insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT). Interestingly, only animals subjected to the HFTD diet showed decreased epididymal fat cell glucose oxidation. We show which high fat diets have the capacity to reduce glycogen synthesis by direct and indirect pathways. HFTD promoted an increase in lipid peroxidation in the liver, demonstrating significant damage in lipids in relation to other groups. Blood and hippocampus DNA damage was significantly higher in animals subjected to HFDs, and the highest damage was observed in animals from the HFTD group. Striatum DNA damage was significantly higher in animals subjected to HFDs, compared with the control group. These results show a positive correlation between high fat diet, glucose dyshomeostasis, oxidative stress and DNA damage.

Key words: High fat diet, thermolyzed fat diet, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, DNA damage.

Introduction

The tendency to overeat is spreading rapidly, and about 1 billion people worldwide are overweight or obese. In particular, around 60% of all cases of type 2 diabetes mellitus (T2DM), which is a pathological condition associated with insulin resistance, hyperglycemia and oxidative stress, can be attributed to obesity. Unhealthy and abundant (“junk”) food, sugar-rich drinks and physical inactivity appear to be the main reasons for this epidemic (1).

Fat and energy intake have been shown to be important dietary factors that modulate insulin resistance and the risk of T2DM (2,3). In this regard, diets that provide low carbohydrate, low fiber and high saturated fat contribute to disease complications in patients with T2DM and are not recommended. Particularly, high fat diets containing high levels of advanced glycation/lipoxidation end products (AGEs/ALEs), which are originated during the heat processing of food, are linked to the development of insulin resistance and T2DM (4,5). High levels of fat have been reported to increase fat-mediated oxidative stress and decrease antioxidative enzyme activity (6,7). The liver plays a central role in the maintenance of systemic lipid homeostasis and is especially susceptible to damage from reactive oxygen species (ROSs) (8). This organ supplies energy substrates to peripheral tissues via the Cori cycle and glycogen catabolism, and it is important for detoxification. Factors related to oxidative stress could be implicated in the functional impairment of the liver, associated with exacerbated nutrient oxidation (9, 10).

DNA damage may be associated with T2DM and its complications (11). In this context, the accumulation of oxidative stress-related products appears to be responsible, at least in part, for DNA damage in diabetes patients (12).

As noted above, the excessive intake of high (mainly thermolyzed) fat diets is linked to the occurrence of T2DM (4). On the other hand, DNA damage may be associated with T2DM and its complications (6). Fried foods are an important source of fat in developed countries (13), allowing for the consumption of oxidized fats containing a large amount of AGEs/ALEs, which affect mammalian metabolism. Despite, there are no studies on the potential link between the thermal oxidation of dietary fat, glucose dyshomeostasis and DNA damage. This study took into account that (i) high fat diets and obesity are linked to an increased susceptibility to T2DM, (ii) fried (thermally oxidized) foods represent an important source of fat in developed countries, (iii) DNA damage may be associated with T2DM and its complications, and (iv) there are no studies underlying thermolyzed fat diet intake, glucose dyshomeostasis and DNA damage. Thus, this work aimed at investigating the effects of high fat and high thermolyzed fat diets on biochemical parameters related to glucose metabolism (i.e., blood glucose levels, insulin tolerance tests, glucose tolerance tests and fat cell glucose oxidation), general health (i.e., body weight, retroperitoneal and epididymal adipose tissue) and markers of DNA injury (i.e., blood, hippocampus and striatum DNA damage) in rats. Lam et al. (14) showed that glucose homeostasis depends on lactate metabolism in the hypothalamus. Pierre et al. (15) showed that mice fed with a high fat diet had a significant increase in the number of the hippocampal monocarboxylic acid transporters MCT1 and MCT2. Glucose homeostasis depends on lactate metabolization (14) and on a high fat diet to induce an increase in transporters of monocarboxylic acids MCT1 and MCT2 in the hippocampus. Therefore, we opted to determine the effects of high fat diets (HFD and HFTD) on DNA damage in this structure. The striatum was

chosen since its structure is submitted to a larger oxidative stress, due to dopamine catabolism by monoamine oxidase (MAO) (16).

Material and Methods

Chemicals

D-[U-¹⁴C]glucose (297 mCi/mmol) and [U-¹⁴C]glycerol (142 mCi/mmol) were purchased from Amersham International (Little Chalfont, Bucks, UK). Low and normal melting point agarose (Gibco, USA), ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), Triton X-100 and dimethyl sulfoxide (DMSO) (Labsynth Produtos de Laboratório Ltda, SP, Brazil), RMPI 1640 medium (Nutricell, Campinas-SP, Brazil), ethidium bromide, cytochalasin- B, bovine albumin (essentially fatty acid free) and hyamine hydroxide (J. T. Baker Chemical Company, Phillipsburg, NJ, USA) were all analytical grade. Optiphase Hi-Safe 3 was purchased from Perkin-Elmer (RJ, Brazil).

Animals and Diets

Thirty adult Wistar rats (male, 60 days old) from the Central Animal House of the Department of Biochemistry were maintained under a standard dark–light cycle (lights on between 7:00 a.m. and 7:00 p.m.) at a room temperature of 22±2°C. The protocol used for this research was employed according to guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of Veterinary Medicine and Animal Science from the University of São Paulo, Brazil.

Rats were divided into three groups: (1) the control group (C, n=10), which received standard laboratory rat chow (50% carbohydrates from starch, 22% protein and 4% fat); (2) the high fat diet group (HFD, n=10), which received an

enriched fat diet (60% fat, composed of 59% lard and 1% soy bean oil, 20% protein and 15% carbohydrates); and (3) the high fat thermolyzed diet group (HFTD, n=10), which received the same diet as for group 2, but the food was heated for 30 min at 130°C, and a vitamin mixture was added after heating. Diet thermolyzation was based on the study by Sandu et al. (4), which indicated a high AGE content (around 1 unit/μg) in the high fat diet after thermolyzation. During the treatment period (12 months), animals had free access to food and water.

Glucose Tolerance Test (GTT)

A glucose tolerance test was carried out after six months of diet treatment. A 50% glucose solution was injected into the animals (2 mg/kg IP) after 6 h of starvation. Blood was collected by a small puncture on the tail immediately prior to the injection, as well as 30, 60, and 120 min afterward. At each time-point, glucose was measured by a glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics, USA).

Insulin Tolerance Test (ITT)

An insulin tolerance test was performed after six months of diet treatment. Insulin (1 U insulin/kg) was injected intraperitoneally after 6 h of starvation, and blood was collected by a small puncture on the tail immediately prior to the injection, as well as 30, 60, and 120 min afterward. Each time, glucose was measured by a glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics, USA).

Tissue Preparation

Rats were killed by decapitation. Retroperitoneal and epididymal fat tissues were dissected and weighted. The liver was dissected, weighed for glycogen

synthesis and stored at -70°C for future analyses of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and carbonil. Blood was collected immediately after decapitation into heparinized tubes, and $5\ \mu\text{L}$ was immediately separated out for a comet assay. The remaining whole blood was centrifuged at $2500 \times g$ for 10 min to yield the plasma fraction, which was used for subsequent biochemical analyses.

The brains of the rats were removed in no more than 1 min. These were placed on a Petri plate dish with filter paper and over ice. The brains were washed with Krebs Ringer bicarbonate buffer solution, pH 7.4, at 3°C . Hippocampus and hypothalamus (including the preoptic area) tissues were dissected and stored at -70°C for posterior analyses of DNA damage (comet assay).

Glucose Oxidation by Epididymal Adipose Tissue

For the measurement of glucose oxidation, epididymal fat was dissected and cut into small pieces (15-25 mg). This was incubated in closed bottles in a medium containing Krebs Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) with 1% of fatty acid free albumin, 5 mM glucose and $0.2\ \mu\text{Ci D}[U-^{14}\text{C}]\text{glucose}$. Incubations were carried out in flasks after contents were gassed with a 95% O_2 :5% CO_2 mixture for 1 min. Flasks were subsequently sealed with rubber caps. The small pieces (between 15-20 mg) of epididymal tissue were incubated at 37°C for 1 h in a metabolic shaker (60 cycles/min), according to the method of Dolnikoff et al. (17). Incubation was stopped by adding 0.25 ml 50% TCA through the rubber cap. Subsequently, 0.2 ml of 1 M hyamine hydroxide was injected into central wells. The flasks were shaken further for 30 min at 37°C to trap CO_2 . Next, the contents of the central well were transferred to vials and assayed for CO_2 radioactivity in a liquid-scintillation counter. All results were expressed

considering the initial specific activity of the incubation medium. The CO₂ production rate was constant during 30, 60 and 90 min of incubation.

Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS)

As an index of lipid peroxidation, we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction. This has been widely adopted for the measurement of lipid redox states, as previously described (18). In brief, the samples were mixed with 0.6 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 mL of 0.67% thiobarbituric acid and then heated in a boiling water bath for 25 min. TBARS were determined by absorbance in a spectrophotometer at 532 nm. Results are expressed as TBARS/mg protein.

Measurement of Protein Carbonyls

Oxidative damage to proteins was measured by the quantification of carbonyl groups based on their reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (19). In brief, proteins were precipitated by the addition of 20% TCA and dissolved in DNPH. Absorbance was measured at 370 nm using a spectrophotometer. Results are expressed as nmol carbonyl/mg protein.

Comet Assay

DNA damage was evaluated in blood, hippocampus and striatum through alkaline single gel electrophoresis (comet assay), according to previously described work (20).

The alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al. (21), with minor modifications. Each piece of brain was placed in 0.5 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS) and minced into fine pieces to obtain a cellular suspension. Cell suspensions from brain and peripheral blood (5 µl) were

embedded in 95 μ l of 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, the cover slip was gently removed, and the slides were placed in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM disodium EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide) for up to 24 h. Subsequently, the slides were incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 12.6) for 10 min and electrophoresed. Following electrophoresis, slides were immersed in neutralizing buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, 4°C) for 5 min. Subsequently, 50 mL of 5 mg/mL ethidium bromide was applied to the slides, and they were left in the dark for 20 min for DNA staining. Negative and positive controls were used for each electrophoresis assay to ensure the reliability of the procedure. Images of 100 randomly selected nuclei (50 nuclei from two replicated slides) were analyzed for each treatment. Nuclei were scored visually for comet tail size, based on an arbitrary scale of 0–4 (i.e., ranging from no DNA damage to extensive DNA damage). Thus, a group damage index could range from 0 (all nuclei without tail, 100 cells \times 0) to 400 (all nuclei with maximally long tails, 100 cells \times 4) (22). During electrophoresis, any relaxed or broken DNA fragments migrated farther than supercoiled, undamaged DNA. Slides were viewed on a Nikon inverted microscope using a TE-FM Epi-Fluorescence accessory. Images were transferred to a computer with a digital camera (Sound Vision Inc., Wayland, MA, USA).

Blood Biochemical Parameters

Plasma glucose, triacylglycerol (TAG), total cholesterol, HDL cholesterol levels, as well as aspartate and alanine aminotransferases (AST and ALT, respectively) and alkaline phosphatase activities, were measured using

commercial kits (Labtest, MG, Brazil). Reactions were performed using the Labmax apparatus (Labtest, MG, Brazil). Plasma free fatty acids and insulin activities were measured using commercial kits (Roche Diagnostics, Germany and MP Biomedicals, NY, USA, respectively).

Hepatic Glycogen Synthesis

For the measurement of hepatic glycogen synthesis, the liver was dissected and cut into 300 µm slices using a McIlwain tissue chopper (100-120 mg). It was incubated in a beaker with a medium containing Krebs Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4), 5 mM glucose and 0.2 µCi D[U-¹⁴C]glucose, or 1 mM glycerol and 0.5 µCi [U-¹⁴C]glycerol, for glycogen synthesis from glycerol. Incubations were carried out in ambient content that was gassed with a 95% O₂:5% CO₂ mixture for 1 h. Liver slices (between 100-120 mg) were incubated at 37°C for 1 h in a metabolic shaker (60 cycles/min), according to the method of Dolnikoff et al. (17). Incubation was stopped by placing the bottles in ice. Afterward, 1 ml of 60% KOH was added to each beaker. After 15 min in a boiling water bath, 3 ml of 96% ethanol was added to the tubes to precipitate glycogen. After precipitation, glycogen was suspended in 0.2 ml of water, and the scintillation liquid (Opti-Phase HiSafe3 from PerkinElmer-USA) was added. The samples were assessed in a scintillation liquid counter.

Statistical Analysis

Comparisons between different groups were performed, employing a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post hoc Duncan test, whenever necessary. The level of significance adopted was $p < 0.05$.

Results

Table 1 shows the body parameters of rats after 12 months of nutritional treatment. Animals from both groups supplemented with the high fat diets showed higher weight gains (77% for HFD and 60% for HFTD) when compared to animals from the control group. The amounts of retroperitoneal and epididymal adipose tissues were significantly higher in animals subjected to the high fat diets when compared to controls (Table 1).

Table 2 shows the biochemical parameters of rats after 12 months of nutritional treatment. Plasma glucose levels were higher in animals from both HFD and HFTD groups, when compared to controls. Plasma triglycerides, cholesterol and HDL levels, as well as AST and ALT activities, were not different between the groups. However, plasma alkaline phosphatase activity was higher in animals submitted to both high fat diets. Only the HFTD group showed increased levels of free fatty acids in relation to other groups. Insulin levels were higher in animals from both HFD and HFTD groups when compared to controls. A homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was used to demonstrate which high fat diet protocol was efficient to induce insulin resistance.

The Glucose Tolerance Test (GTT) and Insulin Tolerance Test (ITT) were performed to verify if high fat diets were able to induce insulin resistance in our experimental/nutritional protocol. In the GTT (Figure 1A), animals fed with high fat diets showed higher glycemia after glucose administration when compared to control rats and independently of the time-point evaluated. Indeed, two-way ANOVA showed a significant main effect of diets ($F_{2,72} = 7.12$; $p = 0.0037$) and

time ($F_{3,72} = 190.24$; $p < 0.0001$) for GTT. Moreover, two-way ANOVA showed significant ($F_{6,72} = 3.17$; $p = 0.0081$) time versus diet interactions for the GTT.

As shown in Figure 1B, animals fed with high fat diets showed higher glycemia after insulin administration when compared to control rats and independently of the time-point evaluated (30, 60 or 120 min). In fact, two-way ANOVA showed a significant main effect of diets ($F_{2,87} = 30.96$; $p < 0.0001$) and time ($F_{3,87} = 7.47$; $p = 0.0002$) for ITT. Two-way ANOVA showed significant ($F_{6,87} = 4.46$; $p = 0.0006$) time versus diet interactions for the ITT.

Figure 2 shows decreased glucose oxidation by the epididymal tissue in animals fed a high fat thermolyzed diet when compared to animals of the control and HFD groups.

DNA damage is related to T2DM, including its complications (11) and high fat diets may contribute to the development of T2DM (4). Therefore, we sought out the effects of high fat diets on DNA damage levels in rat blood (Figure 3). Both high fat diets induced marked DNA damage, but this phenomenon was higher in animals of the HFTD group. As neuropathy (23,24) and cognitive dysfunction (25, 26) are usual events in diabetes patients, DNA damage was also evaluated in the hippocampus of rats fed with high fat diets. Both high fat diets induced significant hippocampus DNA damage, but this phenomenon was much higher in animals from the HFTD group (Figure 4). In the striatum (Figure 5), both high fat diets induced significant DNA damage, compared to the control group.

HFTD promotes an increase of lipid peroxidation in the liver (Figure 6A), demonstrating significant lipid damage in relation to the HFD and control group.

In the protein carbonylation (Figure 6B) assay, we did not observe any differences between all of the groups studied ($p < 0.05$).

Figure 7 shows the effect of diets on hepatic glycogen synthesis, both for the direct (Figure 7A) and indirect (Figure 7B) pathways. For glycogen synthesis from glucose (Figure 7A), we found that both high fat diets reduced glycogen synthesis in relation to the control group. We found that both the high fat diets reduced significantly the glycogen synthesis by direct (Figure 7A) and indirect (Figure 7B) pathways.

Discussion

This study found that normal rats exposed to high fat diets over 12 months exhibited metabolic changes that led to the appearance of T2DM signals. These included increased body weight, increased blood glucose levels, hyperinsulinemia, and impaired responses in insulin and glucose tolerance tests. However, only animals subjected to the HFTD diet showed decreased epididymal fat cell glucose oxidation, pointing to a decreased capability to uptake and/or metabolize glucose.

Metabolic stress caused by an HFD results in activation of the regulatory protein JNK 1 (27). JNK is activated, in part, by increased serum free fatty acids that induce a stress signaling pathway in target tissues. This increase of free fatty acids, as observed in the HFTD group (Table 2), can justify lipid peroxidation in the liver (Figure 6A). In a previous study by Matsuzawa-Nagata et al. (28), protein carbonyl levels were found to be elevated by 35% in the liver, but they were not altered in the adipose tissue of mice fed a high fat diet compared with

control mice at 6 weeks. In protein carbonylation (Figure 6B), we did not observe differences between the groups. Diamanti-Kandarakis et al. (5) submitted female rats during a six-month period to a warm diet that was heated to 100°C for 20 sec (L-AGE) and to a diet with the same composition of L-AGE, though this diet was heated to 125°C for 30 min (H-AGE).

The female rats fed with the high AGE-diet (H-AGE diet) presented an increased glycemia and fast insulinemia in relationship to the female rats fed with L-AGE diet (low AGE-diet). Additionally, the H-AGE showed an increase in AGE localization in the cells of the ovarian tissue, compared to the L-AGE group. Furthermore, fasting serum AGE levels was significantly higher in the H-AGE-D group compared with the L-AGE-fed group. Diamond-Kandarakis et al. (5) found an increase in the glycemia and fast insulinemia in rats submitted to HFD and HFTD in relation to diet controls (L-fat-diet no warm). The results found in the present work are due to the effects of the hyperlipid diet and to the heating of the hyperlipid diet.

Previous studies have shown that fat and energy intake represent important dietary factors, modulating insulin resistance and increasing the risk of T2DM (2,3). Decreased expression of type 2 glucose transporters (GLUT-2) and glucokinase in pancreatic beta-cells has been proposed as an important mechanism by which high fat diet leads to an impaired glucose-stimulated insulin secretion (6). In this regard, a high fat diet induces oxidative stress and apoptosis, which reduces beta-cell mass and compromises beta-cell function (6). Individuals with impaired glucose tolerance are maximally or near-maximally insulin resistant, they have lost 80% of their cell function, and they

have an approximate 10% incidence of diabetic retinopathy. By both pathophysiological and clinical standpoints, these pre-diabetic individuals with impaired glucose tolerance should be considered to have type 2 diabetes (29). Although epidemiological (30) and experimental (31) studies point to the involvement of a high fat diet on insulin resistance and increased risk of T2DM, knowledge regarding the effects of dietary fat thermolization on these phenomena is scarce. Indeed, the relationship between thermolyzed fats and T2DM is only recently becoming clarified.

Hepatic glycogen storage is impaired in all major forms of diabetes, contributing to the development of hyperglycemia (32). Regulation of carbohydrate metabolism in the liver is perturbed in type 2 diabetes and insulin resistance, resulting in increased hepatic glucose production. Factors contributing to this imbalance include increased gluconeogenesis and impaired hepatic glycogen storage. In Figures 7A and 7B, we show the high fat diets that have the capacity to reduce glycogen synthesis by the direct pathway (glucose \rightarrow glucose-6-P \rightarrow glucose-1-P; glucose-1-P + UTP \rightarrow UDPG + PPi; UDPG glucose transporter to glycogen synthesis) and indirect pathway (the indirect pathway uses gluconeogenetic substrates toward glucose-6-P synthesis, for example: glycerol + ATP \rightarrow glycerol-P + ADP \rightarrow by gluconeogenesis: glucose-6-P \rightarrow glucose-1-P; glucose-1-P + UTP \rightarrow UDPG + PPi; UDPG glucose transporter to glycogen synthesis) (31).

In this respect, Sandu et al. (4) have elegantly shown that HFTD induces T2DM symptoms to a higher extent when compared with HFD group. These symptoms were related to high dietary levels of toxins [advanced glycation/lipoxidation end

products (AGEs/ALEs)], which possess pro-oxidant and pro-inflammatory properties (34). In addition, Sauter et al. (35) showed that the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) protected mouse islets from HFD-induced beta-cell apoptosis and improved glucose-stimulated insulin secretion, suggesting the involvement of pro-inflammatory events in HFD-induced glucose dyshomeostasis. In agreement with these studies, we also observed that HFTD elicited the most hazardous effects toward glucose metabolism, when compared to HFD. This manifested as a higher impairment in controlling glycemia after glucose administration during the GTT. Interestingly, animals fed HFTD showed a decrease in glucose oxidation capabilities by epididymal adipose tissue when compared to controls. This phenomenon was not observed in animals of the HFD group. These are novel results, pointing to deficient glucose metabolism by the adipose tissue as a potential phenomenon involved in the T2DM symptoms induced by thermolyzed dietary fat. Taking into account that thermolyzation-derived toxins (AGEs/ALEs) possess pro-oxidant and pro-inflammatory properties (34), one could suggest the involvement of these molecules on the metabolic deficit impairment observed in epididymal adipose tissues of HFTD-fed animals. However, this hypothesis has yet to be proven.

Another interesting and important finding of our study was the increased blood, hippocampus and striatum DNA damage induced by high fat diets. To the best of our knowledge, there are no prior results in the literature showing a link between high fat diets, T2DM symptoms and DNA damage. It is noteworthy that HFTD aggravates such conditions. In fact, a significantly higher degree of DNA damage was observed in the blood (leucocytes), hippocampus and striatum of animals fed a high fat diet that was subjected to thermolyzation.

It is known that AGEs cause retinal vascular leakage (36). Vlassara et al. (37) showed that EV injection of AGE-RSA (AGE rat serum albumin) caused an increase in the vascular permeability of several rat tissues, as well as in the cerebral tissue. Certainly, AGEs propagators, such as carboxymethyllysine, fructoselysine, furosine and others, could cross the blood-brain barrier and act on the CNS cell.

From a nutritional point of view, these results appear to be relevant because they are derived from an experimental protocol that simulates a nutritional condition that is spreading rapidly. Fried (thermolyzed) foods represent a significant source of fat in developed countries (13). Therefore, the extrapolation of our results to humans may suggest that an important percentage of the population is exposed to a dietary condition that greatly increases the susceptibility of developing T2DM, DNA damage and genomic instability.

Conclusion

This study indicates that a high fat diet induces T2DM symptoms, oxidative stress and DNA damage. Moreover, the fat thermolization process aggravates such a condition, decreases epididymal fat cell glucose oxidation and oxidative stress in the liver, and increases free fatty acids in the plasma. These results are the first to show a positive correlation between high fat diets, glucose dyshomeostasis, oxidative stress and DNA damage, being in agreement with epidemiological studies reporting that diabetes patients are more prone to the development of different types of cancer. Our findings support the need for rigorous nutritional attention toward fried (thermolyzed) foods, which represent an important source of fat in developed countries.

Acknowledgments

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

References

1. Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Med*, 12:75-80, 2006.
2. McGarry JD. Dysregulation of fatty acid metabolism in etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51:7-18, 2002.
- 3 Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science*, 307:373-375, 2005.
4. Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes*, 54: 2314-2319, 2005.
5. Diamanti-Kandarakis E, Piperi C, Korkolopoulou P, Kandarakis E, Levidou G, Papalois A, Patsouris E, Papavassiliou AG. Accumulation of dietary glycotoxins in the reproductive system of normal female rats. *J Mol Med* 85:1413-1420, 2007.
6. Cerf ME. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Med Sci Monitor: Int Med J Exp Clin Res*, 13: RA12-7, 2007.
7. Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA, Hennig B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr* 15:289-94, 1996.
8. Hamelet J, Demuth K, Paul JL, Delabar JM, Janel N. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J Hepatol* 46:151-159, 2007.
9. Raval J, Lyman S, Nitta T, Mohuczy D, Lemasters JJ, Kim JS, et al. Basal reactive oxygen species determine the susceptibility to apoptosis in cirrhotic hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 41:1645-1654, 2006.

10. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30:620–650, 2002.
11. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Res* 554: 297-304, 2004.
12. Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes* 48:176-181, 1999.
13. Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Rad Biol Med* 12:63-81, 1992.
14. Lam KTT, Guitierrez-Juarez R, Poci A, Rossetti L. Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309:943-947, 2005.
15. Pierre K, Parent A, Jayet P-Y, Halestrap AP, Scherrer U, Pellerin L. Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice. *J Physiol* 583:469-486, 2007.
16. Teixeira AM, Reckziegel P, Müller Liz, Pereira RP, Roos DH, Rocha JB, Bürger ME. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacol Biochem Behav* 92:231-235, 2009.
17. Dolnikoff M, Martin-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes Rel Metab Dis* 25:426-433, 2001.
18. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol* 186:421-431, 1990.

19. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 186:464-478, 1990.
20. Gedik CM, Grant G, Morrice PC, Wood SG, Collins AR. Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats. *Eur J Nutr* 44:263-272, 2005.
21. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221, 2000.
22. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 29:183-193, 1997.
23. Albers JW, Herman WH, Pop-Busui R, Martin CL, Cleary P, Waberski B. Subclinical neuropathy among Diabetes Control and Complications Trial participants without diagnosable neuropathy at trial completion: possible predictors of incident neuropathy? *Diabetes Care* 30: 2613-2618, 2007.
24. Tesfaye S, Kempler P. Painful diabetic neuropathy. *Diabetologia* 48:805-807, 2005.
25. Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine Rev* 29: 494-511, 2008.
26. Tiehuis AM, Vincken KL, van den Berg E, Hendrikse J, Manschot SM, Mali WP, Kappelle LJ, Biessels GJ. Cerebral perfusion in relation to cognitive function and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51:1321-1326, 2008.

27. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420:333-336, 2002.
28. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57:1071-1077, 2008.
29. DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58(4):773-95, 2009.
30. Marshall JA, Hamman RF, Baxter J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *Am J Epidemiol* 134:590-603, 1991.
31. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53:S215-219, 2004.
32. Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel P, Shulman GI. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest* 98:1755-1761, 1996.
33. Newgard CB, Hirsch LJ, Foster DW, McGarry JD. Studies on the mechanism by which exogenous glucose is converted into liver glycogen in the rat. A direct or an indirect pathway? *J Biol Chem* 258: 8046-8052, 1983.

34. Hofmann SM, Dong HJ, Li Z, Cai W, Altomonte J, Thung SN, Zeng F, Fisher EA, Vlassara H. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes* 51:2082-2089, 2002.
35. Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology* 149: 2208-2218, 2008.
36. Stitt AW, Bhaduri T, McMullen CBT, Gardiner TA, Archer DB. Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 3:380-388, 2000.
37. Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: A model for diabetes and aging complication. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:12043-12047, 1992.

Legends

Figure 1: The Glucose Tolerance Test (A) and Insulin Tolerance Test (B) in rats after 6 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD). Blood glucose levels are expressed as mg/dL and represented as the mean \pm SEM ($n = 6$ per group). Two-way analysis of variance showed significant time vs. diet interactions for Glucose ($F_{6,72} = 3.17$; $p = 0.0081$) and Insulin ($F_{6,87} = 4.46$; $p = 0.0006$) Tolerance Tests.

Figure 2: Glucose oxidation by epididymal adipose tissue in rats after 12 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD). Data are expressed as pmol of glucose oxidized per milligram per hour of tissue and represented as the mean \pm SEM ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 3: DNA damage in total blood of rats after 12 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD) ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 4: DNA damage in the hippocampus of rats after 12 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD) ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 5: DNA damage in the striatum of rats after 12 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD) ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 6: Lipid peroxidation (A) and protein carbonylation (B) in rats after 12 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD) ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Figure 7: Glycogen synthesis from D[U-¹⁴C]Glucose (A) and glycogen synthesis from [U-¹⁴C]Glycerol (B) in rats after 12 months of different nutritional treatments. For treatment details, see the Materials and Methods Section: Control (C), High Fat Diet (HFD) and High Fat Thermolyzed Diet (HFTD) ($n = 8$ per group). Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$) by one-way analysis of variance followed by a Duncan multiple range test.

Table 1

Body Parameters	C	HFD	HFTD
Initial Body Weight (g)	305 ± 14.7	309 ± 10.8	302 ± 13.2
Final Body Weight (g)	475 ± 46 ^a	610 ± 47 ^b	575 ± 51 ^b
Body Weight Gain (g)	170 ± 32 ^a	301 ± 52 ^b	273 ± 41 ^b
Retroperitoneal Adipose Tissue (g)	10.7 ± 5.2 ^a	39 ± 15 ^b	37.7 ± 10 ^b
Retroperitoneal Adipose Tissue (%)	2.1 ± 0.9 ^a	6.1 ± 1.9 ^b	6.5 ± 1.2 ^b
Epididymal Adipose Tissue (g)	9.2 ± 3.6 ^a	17.9 ± 8.7 ^b	16 ± 2 ^b
Epididymal Adipose Tissue (%)	1.8 ± 0.6 ^a	2.8 ± 1.2 ^b	2.8 ± 0.2 ^b

Table 2

Biochemical Parameters	C	HFD	HFTD
Glucose (mg/dL)	93.6 ± 10.7 ^a	116.5 ± 14.7 ^b	111.83 ± 19.7 ^b
Cholesterol (mg/dL)	71.1 ± 10.8	74 ± 9.5	84.5 ± 16.3
HDL (mg/dL)	35 ± 2.8	35.5 ± 5	41.3 ± 6.2
AST (U/L)	308 ± 87	315.8 ± 100	267 ± 97
ALT (U/L)	80.2 ± 8.5	79 ± 37	89.2 ± 25.2
Alkaline Phosphatase (U/L)	108.8 ± 31 ^a	165 ± 57.9 ^b	261.3 ± 110 ^b
Free Fatty Acids (µM/ml)	435.6 ± 82 ^a	445.7 ± 96.5 ^a	642.6 ± 152.1 ^b
Insulin (µUI/ml)	33.8 ± 12 ^a	47.1 ± 8 ^b	46.4 ± 9.3 ^b
HOMA-IR	9.1 ± 3.7 ^a	15.1 ± 3.6 ^b	18.8 ± 4 ^b

Figure 1

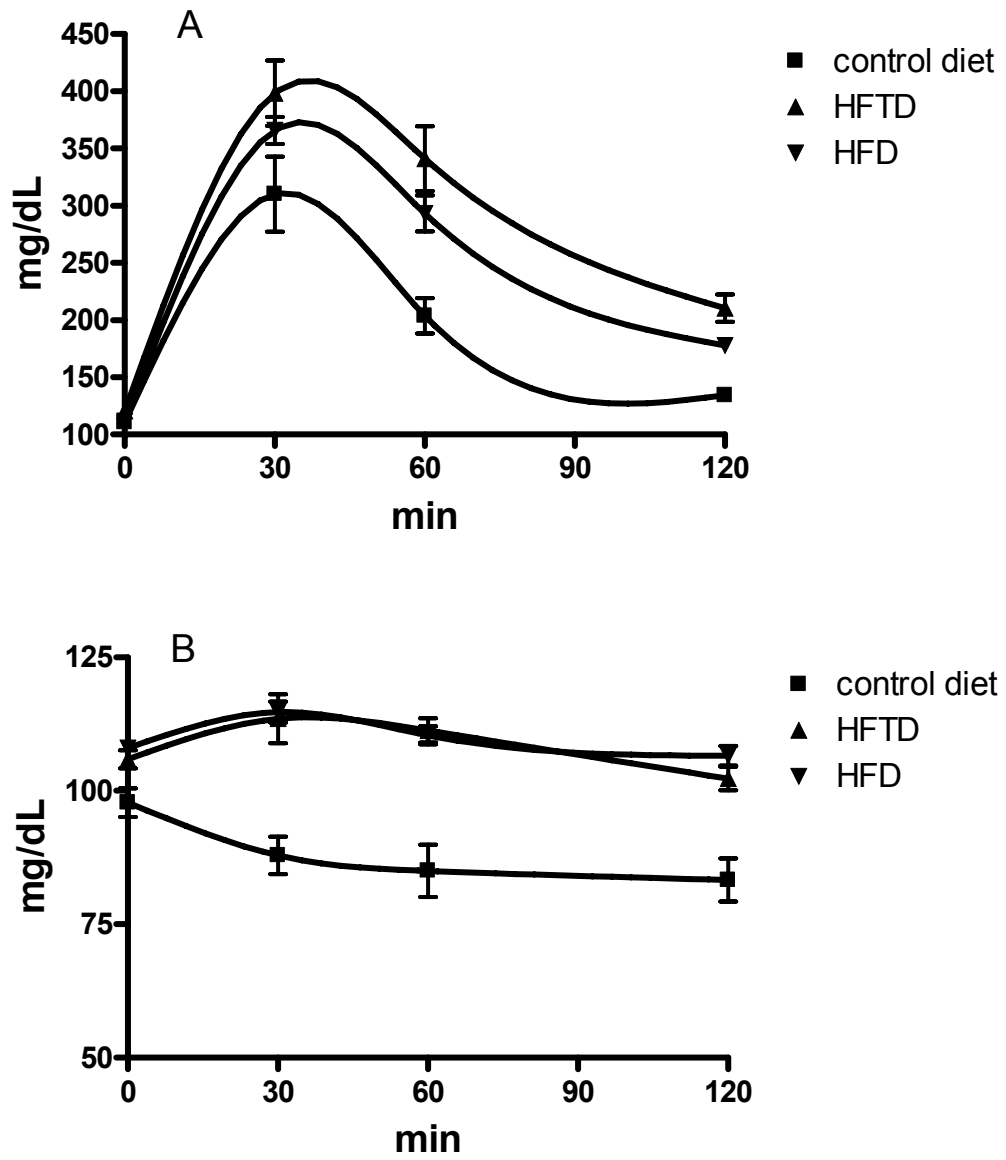


Figure 2

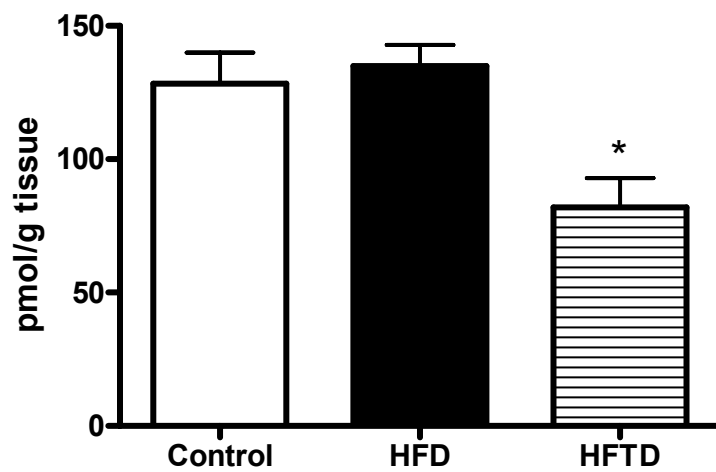


Figure 3

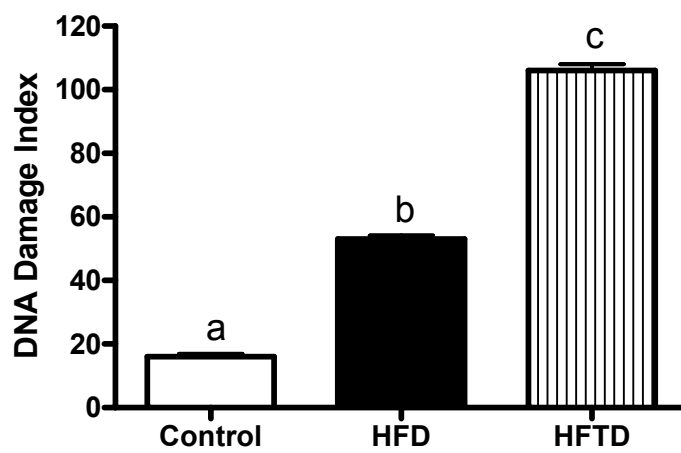


Figure 4

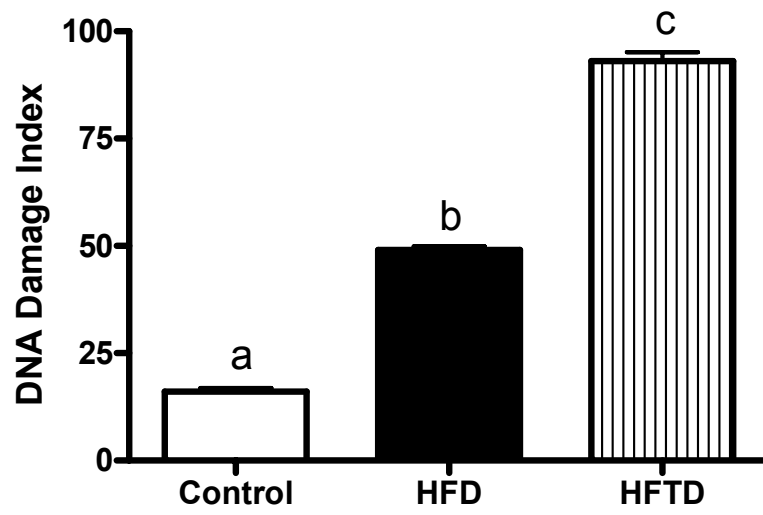


Figure 5

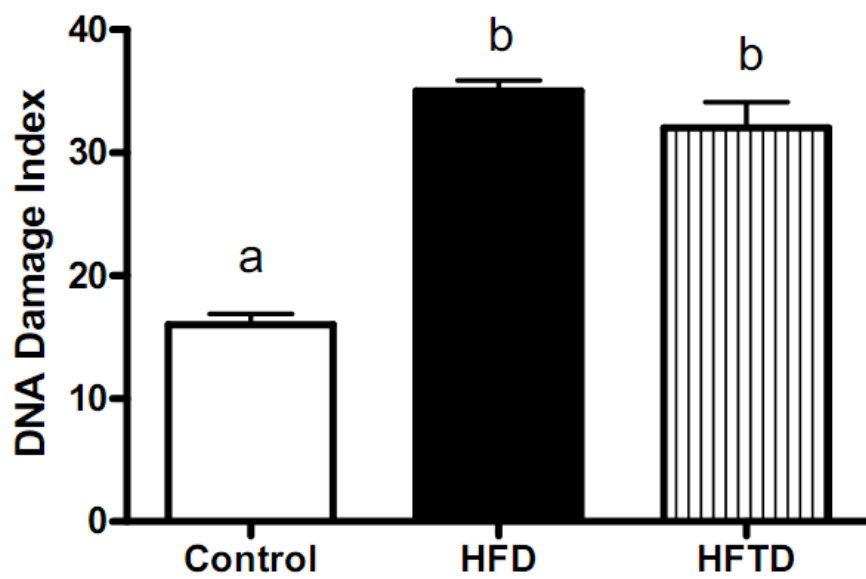


Figure 6

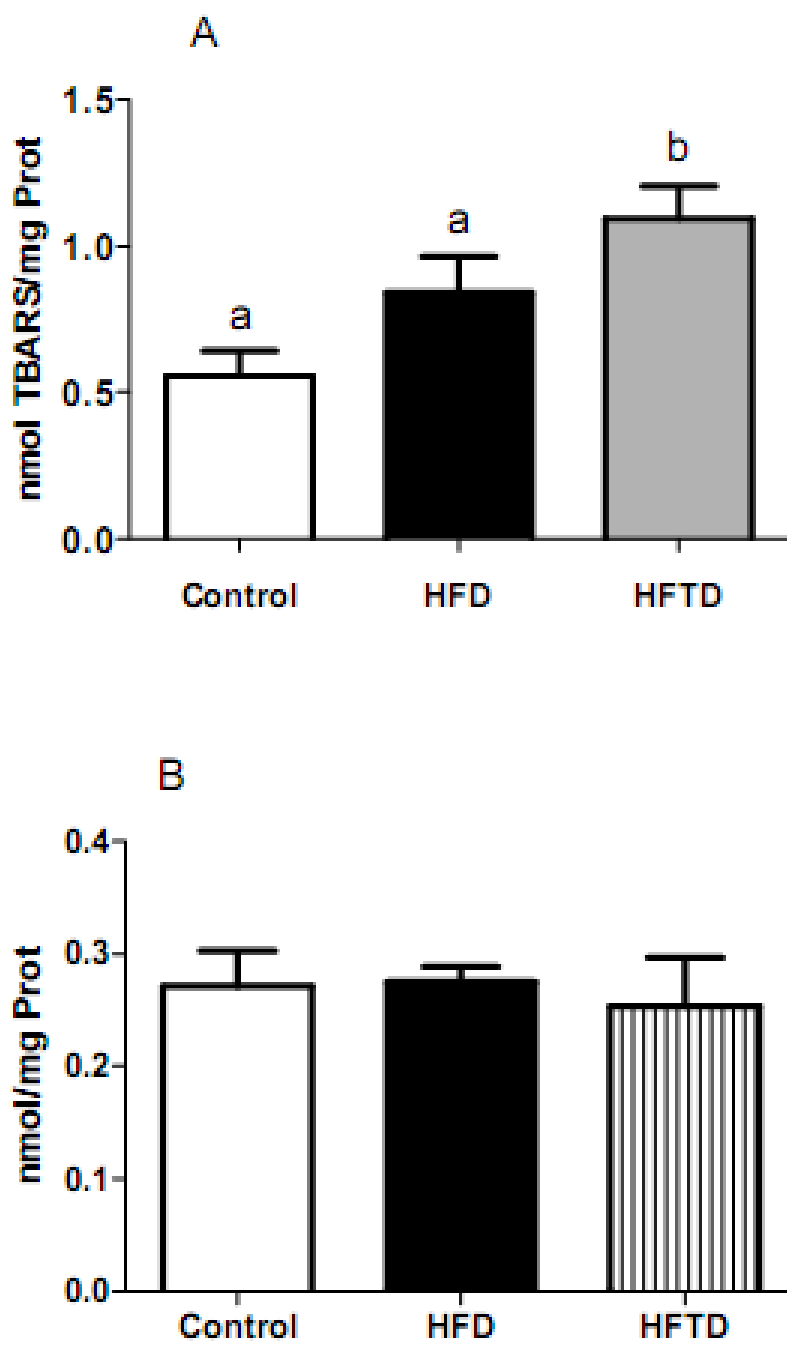
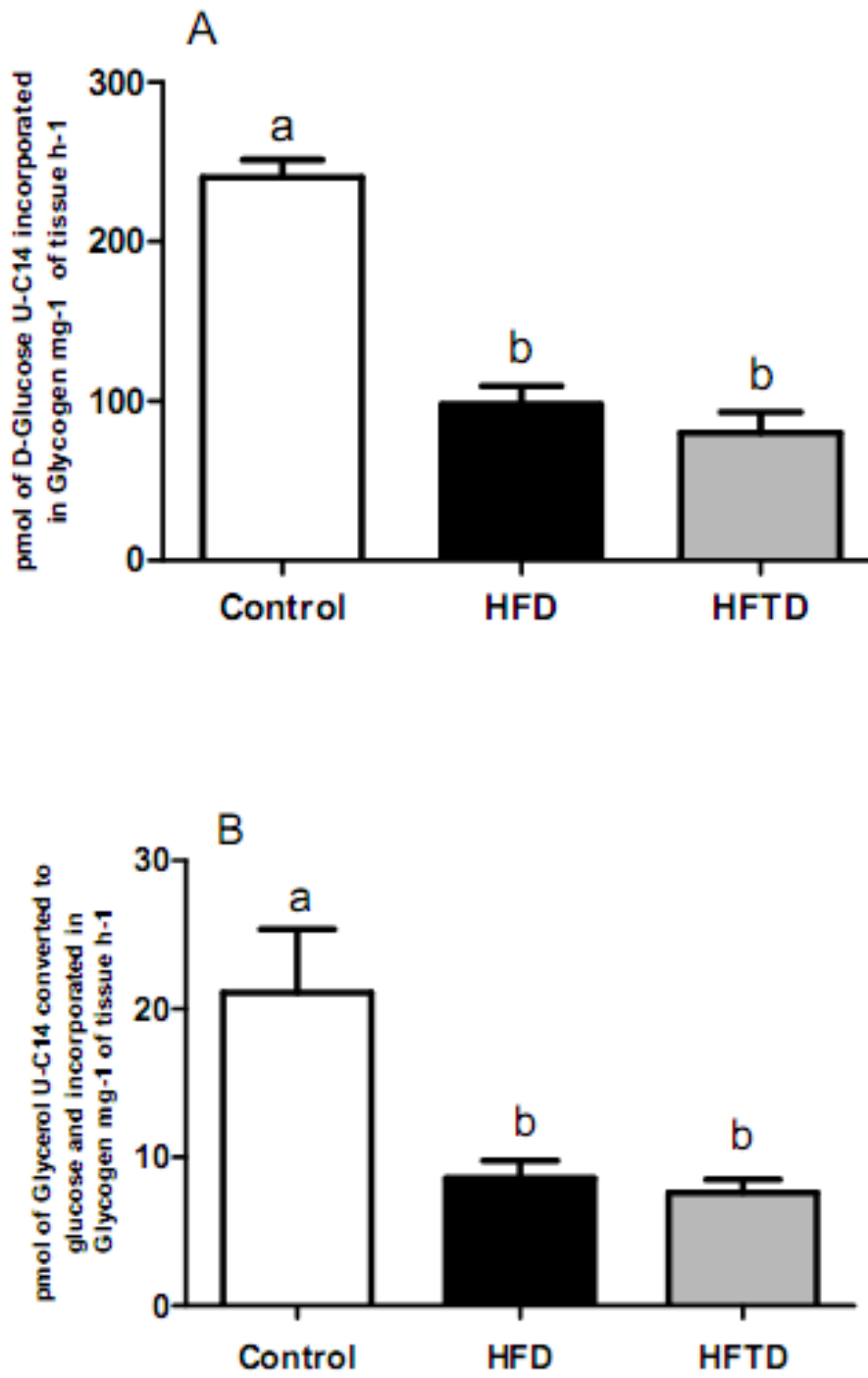


Figure 7



PARTE III

3. Discussão

Vários pesquisadores têm demonstrado que o “fígado graxo” é insulino-resistente e produz em excesso muitos dos fatores de risco cardiovasculares associados com a síndrome metabólica (Seppala-Lindroos et al., 2002). O fígado no diabetes mellitus tipo 2 (com insulina alta) é resistente à insulina quanto ao metabolismo glicídico (gliconeogênese e glicogenólise), porém esta insulina aumentada estimula a síntese de ácidos graxos, por outro lado o tecido adiposo está resistente à insulina. O fígado recebe grande quantidade de ácidos graxos que produzem esteatose, com aumento de liberação de VLDL. A MTP está sendo sintetizada (a insulina inibe a síntese de MTO, porém ela já está resistente a insulina) (MaGarry, 2002). Quando tens um DM 2 com insulina aumentada tens um fígado com alta gliconeogênese, resultando numa superprodução de VLDL, que leva a uma condição de hipertrigliceridemia e uma diminuição dos níveis de HDL (Adiels et al., 2006). O fígado, uma vez rico em ácidos graxos, produz em excesso também fibrinogênio, fator de Von Willebrand, Proteína C-Reativa (Targher et al., 2005), e Ativador Inibidor do Plasminogênio 1 (PAI-1) (Targher et al., 2005; Yki-Jarvinen et al., 2003).

A primeira descrição de uma intervenção nutricional em pesquisa é datada por volta dos anos de 1940. Estudos subseqüentes demonstraram que dietas hiperlipídicas eram capazes de promover hiperglicemia e resistência à insulina, a partir daí vários pesquisadores examinaram os seus efeitos na fisiologia muscular e hepática e na transdução de sinal da via insulínica (Oakes et al., 1997). Baseados nestes estudos, é aceito por toda comunidade científica que as dietas hiperlipídicas podem ser usadas para gerar um modelo válido de síndrome metabólica com resistência à insulina e função comprometida das

células β em roedores (Lingohr et al., 2002). A indução da obesidade é mais efetiva quando o tratamento com a dieta começa com os roedores ainda jovens e é conduzida por várias semanas (Peckham et al., 1962).

Neste trabalho, demonstramos claramente que o modelo experimental escolhido foi eficaz em promover obesidade e resistência à insulina. Os dados da Tabela 1 (Artigo) mostram que os animais tratados com dietas hiperlipídicas apresentaram maior ganho de peso corporal (77% para o grupo HFD and 60% para HFTD) e maior acúmulo de tecido adiposo (Retroperitoneal e Epididimal). O ganho de peso durante o período de tratamento é gradual, como mostra Buettner et al., 2007 na Figura 3. Embora, já possamos ver o aumento de peso corporal em apenas duas semanas de tratamento, a dieta induzindo o fenótipo torna-se mais aparente após quatro semanas de dieta hiperlipídica.

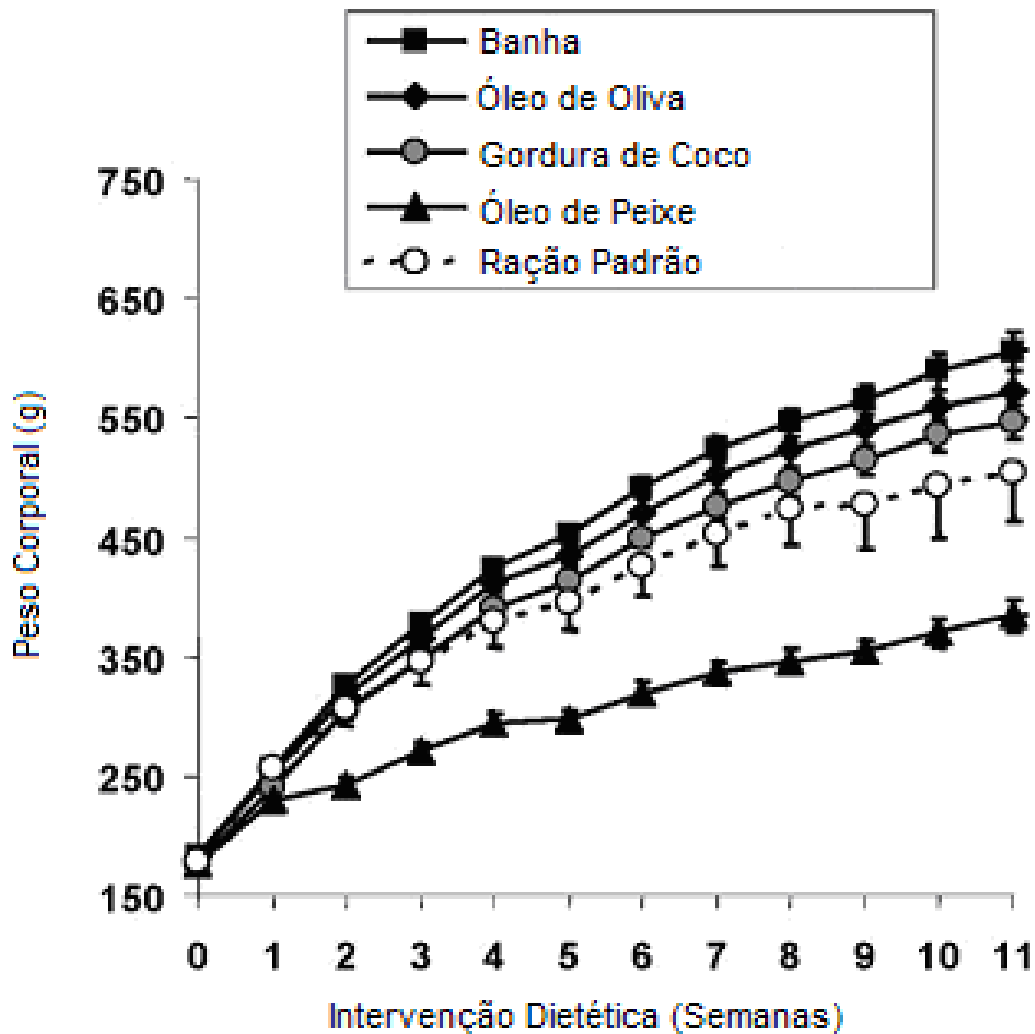


Figura 3. Ganho de peso e tipo de gordura na dieta em ratos alimentados com dietas hiperlipídicas. Ratos Wistar machos alimentados com dietas hiperlipídicas semi purificadas (42% lipídios, 39% carboidratos e 19% proteínas). Fontes de lipídios: (Banha de porco, óleo de oliva, gordura de coco, óleo de peixe e ração padrão para roedores) (Adaptado de Buettner et al., 2007).

A obesidade é um fator de risco para a resistência à insulina e o diabetes tipo II, e ainda um fator de risco para doenças cerebrovasculares, nem todo paciente obeso é resistente à insulina ou tem alto risco para diabetes ou doenças cerebrovasculares. Na verdade o que irá predizer o risco deste paciente será a quantidade de gordura intra-abdominal ou visceral.

Já está bem demonstrada na literatura que a obesidade leva a uma condição de resistência à insulina, esta por sua vez inibe a produção hepática de glicose basal e pós-prandial, resultando em hiperglicemia e hiperinsulinemia (Seppala-Lindroos et al., 2002).

Como pode ser observado na Tabela 2 (Artigo), os níveis de glicose e de insulina plasmáticos dos ratos tratados com dietas hiperlipídicas indicam que estes animais tornaram-se hiperglicêmicos e hiperinsulinêmicos, condição normal na resistência à insulina. O HOMA-IR, índice que mede a função das células β , confirmou esta resistência à insulina. O fluxo dos ácidos graxos livres para o fígado pode prejudicar o metabolismo deste órgão, conduzindo ao aumento da produção hepática de glicose. Em humanos, embora haja uma correlação entre o acúmulo de gordura na região visceral e o fluxo portal de ácidos graxo livres para o fígado, a maioria destes ácidos graxos origina-se da circulação sistêmica. Ainda na Tabela 2 (Artigo), de acordo com a literatura esperávamos que ambas as dietas hiperlipídicas promovessem aumento de ácidos graxos livres, porém verificamos que apenas o grupo HFTD teve estes níveis elevados. Embora Prada et al., 2007, em seu estudo verificou que a suplementação de dieta hiperlipídica em ratos Wistar por dois meses não alterou os níveis de ácidos graxos livres em relação ao controle. De acordo com Hirosumi et al., 2002, o estresse metabólico causado pelas dietas hiperlipídicas (HFD) resulta na ativação da proteína regulatória JNK1. A JNK é ativada, em parte, pelo aumento de ácidos graxos livres que induzem via de sinalização de estresse em tecidos alvo. Indução esta que pode estar relacionada com o resultado que encontramos na Figura 5A (Artigo), onde o grupo HFTD demonstrou maior peroxidação lipídica em relação aos outros

grupos estudados. Em seu estudo Matsuzawa-Nagata et al. 2008, suplementou camundongos com dieta hiperlipídica durante seis semanas e observou que a dieta foi capaz de aumentar em 35% o dano a proteínas no fígado, o que não foi observado no tecido adiposo em relação ao controle. Em nosso trabalho (Figura 5B – Artigo) nós não observamos nenhuma diferença de dano a proteína nos grupos estudados.

Nas Figuras 1A e 1B (Artigo) avaliamos a resposta dos ratos a uma carga de glicose e insulina respectivamente. Verificamos que no teste de tolerância à glicose (TTG) os grupos tratados com dietas hiperlipídicas demonstraram ser menos tolerantes a ação da glicose, demorando mais tempo para metabolizar esta. Já no teste de sensibilidade à insulina, observamos que estes grupos (HFD e HFTD) que demonstraram estar menos tolerantes a glicose no TTG, se mostraram mais tolerantes a ação da insulina, confirmando os resultados anteriores e deixando claro o quadro de resistência à insulina destes grupos.

Um defeito principal na síntese de glicogênio estimulada por insulina é um achado característico em todos estados insulino-resistentes, incluindo obesidade, diabetes e a combinação destes dois. (DeFronzo, 1997; DeFronzo, 1988; Avogaro et al., 1996) A falha na síntese de glicogênio também representa a maior causa de resistência à insulina em indivíduos obesos com normal ou ligeira redução na tolerância à glicose. A glicogênio sintase existe na forma ativa (menos fosforilada) e na forma inativa (mais fosforilada) (Dent et al., 1990; Cohen, 1989). Sob circunstâncias basais, a atividade da glicogênio sintase em indivíduos com diabetes tipo II está reduzida e a habilidade da insulina em ativar a glicogênio sintase está severamente prejudicada (Thorburn et al., 1990). Na Figura 6A e 6B (Artigo), mostramos claramente este efeito da

resistência à insulina sobre o metabolismo do glicogênio documentado pela literatura, onde os grupos tratados com dietas hiperlipídicas demonstraram uma menor síntese de glicogênio hepático em relação ao grupo controle, tanto a via direta (Figura 6A) quando a via indireta (Figura 6B).

Segundo Huebschmann et al., 2006, a ingestão de uma dieta rica em AGEs está associada com o aumento de risco para aterosclerose (Lin et al., 2003), nefropatia (Zheng et al., 2002; Sebekova et al., 2003) e prejudica a cicatrização de feridas (Peppas et al., 2003) em modelos animais de diabetes. Em indivíduos diabéticos, o aumento na ingestão de AGEs através da dieta foi demonstrado estar associado com altos índices de AGEs no soro, aumento de marcadores pró-inflamatórios como a proteína C reativa (Vlassara et al., 2002), e aumento da disfunção endotelial (Stirban et al., 2006). Os AGEs possuem propriedades pró-oxidantes e pró-inflamatórias (Hofmann et al., 2002), podemos sugerir a participação destas moléculas na redução da oxidação de D[U-¹⁴C]Glicose pelo tecido adiposo epididimal do grupo HFTD (Figura 2 – Artigo). Entretanto, esta hipótese ainda deve ser confirmada.

Um achado muito interessante neste trabalho foi que as dietas hiperlipídicas induziram um aumento de dano ao ADN em sangue total (Figura 3 – Artigo) e hipocampo (Figura 4 – Artigo). Até a presente data, não há trabalhos na literatura relacionando dieta hiperlipídica, resistência à insulina e dano ao ADN. É notável que o grupo HTFD provoca agravamento desta condição de dano. De fato, um grau significativamente mais elevado de dano ao AND foi observado em ambos, sangue e hipocampo dos animais tratados com a dieta hiperlipídica submetida ao processo de aquecimento. A partir do ponto de vista nutricional, estes resultados demonstram ser relevantes porque

são derivados de um protocolo experimental que representa uma condição nutritiva (aquecimento) muito utilizada nos países desenvolvidos (Kubow 1992).

Conseqüentemente, a extrapolação de nossos resultados aos seres humanos podem sugerir que uma porcentagem importante da população mundial esteja expondo-se a uma condição dietética que aumente extremamente a susceptibilidade de desenvolver diabetes mellitus tipo II, dano ao ADN resultando em instabilidade genômica.

4. Conclusões

Em resumo, este estudo que o aumento de lipídios na dieta induz resistência à insulina, estresse oxidativo e dano ao ADN. Além disso, o processo de aquecimento desta dieta agravou tais condições e diminuiu a oxidação de glicose pelo tecido adiposo epididimal e aumentou a peroxidação lipídica no fígado e concentração de ácidos graxos livres no plasma. Este trabalho foi o primeiro a demonstrar uma correlação positiva entre dieta hiperlipídica, disfunção no metabolismo de glicose, estresse oxidativo e dano ao ADN. Nossos resultados indicam a necessidade de atenção nutricional rigorosa para os alimentos aquecidos.

5. Perspectivas

- Verificar a via de sinalização de insulina no sistema nervoso central.
- Determinar a quantidade de AGEs em tecidos do sistema nervoso central e periférico.
- Verificar os efeitos destas dietas em ratos diabéticos.
- Utilizar substâncias terapêuticas que reduzam o efeito dos AGEs sobre o metabolismo.

6. Referências Bibliográficas

Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Borén J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol*. 2006 Jun; 17(3):238-46.

Ahmed MH. Invasive and non-invasive investigations for non-alcoholic steatohepatitis: the benefit of histology. *Scand J Gastroenterol*. 2005 Oct;40(10):1260.

Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, Shichiri M, Horiuchi S. Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem*. 1995 Jun 1;230(2):408-15.

Avogaro A, Toffolo G, Valerio A, Cobelli C. Epinephrine exerts opposite effects on peripheral glucose disposal and glucose-stimulated insulin secretion. A stable label intravenous glucose tolerance test minimal model study. *Diabetes*. 1996 Oct;45(10):1373-8.

Basta G, Sarchielli P, Luca G, Racanicchi L, Nastruzzi C, Guido L, Mancuso F, Macchiarulo G, Calabrese G, Brunetti P, Calafiore R. Optimized parameters for microencapsulation of pancreatic islet cells: an in vitro study clueing on islet graft immunoprotection in type 1 diabetes mellitus. *Transpl Immunol*. 2004 Dec;13(4):289-96.

Basta G, Berti S, Cocci F, Lazzerini G, Parri S, Papa A, Battaglia D, Lubrano V, Del Turco S, Ravani M, Rizza A, De Caterina R, Marraccini P, Mazzone A. Plasma N-epsilon-(carboxymethyl)lysine levels are associated with the extent of vessel injury after coronary arterial stenting. *Coron Artery Dis*. 2008 Aug;19(5):299-305.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999 Jan;48(1):1-9.

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002 May 15;287(19):2570-81.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 1997 Aug 15;272(33):20313-6.

Brownlee M. Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Annu Rev Med*. 1991;42:159-66.

Hammes HP, Wellensiek B, Klötting I, Sickel E, Bretzel RG, Brownlee M. The relationship of glycaemic level to advanced glycation end-product (AGE) accumulation and retinal pathology in the spontaneous diabetic hamster. *Diabetologia*. 1998 Feb;41(2):165-70.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.

Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, Dohi K, Makita Z, Vlassara H, Bucala R. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol*. 1993 Dec;143(6):1649-56.

Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*. 1994 Feb;70(2):138-51.

Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):4766-70.

Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Sep 27;91(20):9441-5.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Apr;15(4):798-808.

Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppas M, He C, Vlassara H. Oxidative stress-inducing carbonyl compounds from common foods: novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med*. 2002 Jul;8(7):337-46.

Carvalho JB, Ribeiro EB, Araújo EP, Guimarães RB, Telles MM, Torsoni M, Gontijo JA, Velloso LA, Saad MJ. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetologia*. 2003 Dec;46(12):1629-40.

Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13915-20.

Chavakis T, Bierhaus A, Al-Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP. The pattern recognition

receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1507-15.

Cohen MP. Nonenzymatic glycation and enhanced polyol pathway activity in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol*. 1989;73:59-70; discussion 71-2.

Dattilo BM, Fritz G, Leclerc E, Kooi CW, Heizmann CW, Chazin WJ. The extracellular region of the receptor for advanced glycation end products is composed of two independent structural units. *Biochemistry*. 2007 Jun 12;46(23):6957-70.

DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988 Jun;37(6):667-87.

DeFronzo RA. Use of the splanchnic/hepatic balance technique in the study of glucose metabolism. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1987 Nov;1(4):837-62.

Dent P, Lavoigne A, Nakielny S, Caudwell FB, Watt P, Cohen P. The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. *Nature*. 1990 Nov 22;348(6299):302-8

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):881-7.

Farouque HM, O'Brien RC, Meredith IT. Diabetes mellitus and coronary heart disease--from prevention to intervention: Part I. *Aust N Z J Med*. 2000 Jun;30(3):351-9.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.

Finot PA. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann NY Acad Sci.* 2005 Jun; 1043:1-8.

Flegal KM, Williamson DF, Pamuk ER, Rosenberg HM. Estimating deaths attributable to obesity in the United States. *Am J Public Health.* 2004 Sep; 94(9):1486-9.

Forbes S, Moonan M, Robinson S, Anyaoku V, Patterson M, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR, Johnston DG. Impaired circulating glucagon-like peptide-1 response to oral glucose in women with previous gestational diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005 Jan;62(1):51-5.

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem.* 1998 Jul 24;273(30):18714-9.

Thompson AL, Cooney GJ. Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance. *Diabetes* 2000; 49: 1761–1765

Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW, Biden TJ. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes* 1997; 46: 169–178

Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor

substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 2002; 277: 50230–50236.

Bronfman M, Morales MN, Orellana A. Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long-chain acyl-CoA. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 152: 987–992.

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995; 9: 484–496.

Itani SI, Zhou Q, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* 2000; 49: 1353–1358.

Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 1999; 48: 1270–1274.

Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 2002; 51: 2005–2011.

Ghosh S, Baltimore D. Activation in vitro of NF- κ B by phosphorylation of its inhibitor I κ B. *Nature* 1990; 344: 678–682.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066–1071.

MacDonald GA, Bridle KR, Ward PJ, Walker NI, Houglum K, George DK, Smith JL, Powell LW, Crawford DH, Ramm GA. Lipid peroxidation in hepatic steatosis

in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 599–606.

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis, the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503–516.

Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg R. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 355–362.

Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004 Aug;104(8):1287-91.

Hamelet J, Seltzer V, Petit E, Noll C, Andreau K, Delabar JM, Janel N. Cystathionine beta synthase deficiency induces catalase-mediated hydrogen peroxide detoxification in mice liver. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1782(7-8):482-8.

He CJ, Koschinsky T, Buenting C, Vlassara H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol Med*. 2001 Mar;7(3):159-68.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002 Nov 21;420(6913):333-6.

Hofmann SM, Dong HJ, Li Z, Cai W, Altomonte J, Thung SN, Zeng F, Fisher EA, Vlassara H. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2082-9.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006 Jun;29(6):1420-32.

Kelley DE, McKolanis TM, Hegazi RA, Kuller LH, Kalhan SC. Fatty liver in type 2 diabetes mellitus: relation to regional adiposity, fatty acids, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Oct;285(4):E906-16.

Kilhovd BK, Berg TJ, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation end products are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*. 1999 Sep;22(9):1543-8.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002 Nov-Dec;30(6):620-50.

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jun 10;94(12):6474-9.

Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med*. 1992;12(1):63-81.

Lam TK, Poci A, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Bryan J, Aguilar-Bryan L, Schwartz GJ, Rossetti L. Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. *Nat Med*. 2005 Mar; 11(3):320-7.

Lapolla A, Traldi P, Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem.* 2005 Feb;38(2):103-15.

Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1;93(20):11047-52.

Lin RY, Reis ED, Dore AT, Lu M, Ghodsi N, Fallon JT, Fisher EA, Vlassara H. Lowering of dietary advanced glycation endproducts (AGE) reduces neointimal formation after arterial injury in genetically hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis.* 2002 Aug;163(2):303-11.

Lingohr MK, Bull RJ, Kato-Weinstein J, Thrall BD. Dichloroacetate stimulates glycogen accumulation in primary hepatocytes through an insulin-independent mechanism. *Toxicol Sci.* 2002 Aug;68(2):508-15.

Lo TW, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J Biol Chem.* 1994 Dec 23;269(51):32299-305.

Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 10;101(32):11767-72.

Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1991 Sep 19;325(12):836-42.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 2008 Aug;57(8):1071-7.

Miyata T, Ishikawa N, van Ypersele de Strihou C. Carbonyl stress and diabetic complications. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Sep;41(9):1150-8.

Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science*. 1981 Jan 30;211(4481):491-3.

Müller S, Ronfani L, Bianchi ME. Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J Intern Med*. 2004 Mar;255(3):332-43.

Narayan KM, Boyle JP, Thompson TJ, Sorensen SW, Williamson DF. Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *JAMA*. 2003 Oct 8;290(14):1884-90.

Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992 Jul 25;267(21):14998-5004.

O'Brien J, Morrissey PA. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1989;28(3):211-48.

Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes*. 1997 Nov;46(11):1768-74.

Oliveira, JEP. COnsenso brasileiro sobre diabetes 2002: Diagnostico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003. p.72.

Paul RG, Bailey AJ. The effect of advanced glycation end-product formation upon cell-matrix interactions. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Jun;31(6):653-60.

Peckham SC, Entenman C, Carrol HW. The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *J Nutr.* 1962 Jun;77:187-97.

Peppia M, Brem H, Ehrlich P, Zhang JG, Cai W, Li Z, Croitoru A, Thung S, Vlassara H. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes.* 2003 Nov;52(11):2805-13.

Pichon L, Huneau JF, Fromentin G, Tomé D. A high-protein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. *J Nutr.* 2006 May;136(5):1256-60.

Pocai A, Lam TK, Obici S, Gutierrez-Juarez R, Muse ED, Arduini A, Rossetti L. Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):1081-91.

Prada PO, Hirabara SM, de Souza CT, Schenka AA, Zecchin HG, Vassallo J, Velloso LA, Carneiro E, Carvalheira JB, Curi R, Saad MJ. L-glutamine supplementation induces insulin resistance in adipose tissue and improves insulin signalling in liver and muscle of rats with diet-induced obesity. *Diabetologia.* 2007 Sep;50(9):1949-59.

Puoane T, Steyn K, Bradshaw D, Laubscher R, Fourie J, Lambert V, Mbananga N. Obesity in South Africa: the South African demographic and health survey. *Obes Res.* 2002 Oct;10(10):1038-48.

Raj DS, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: a Nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis.* 2000 Mar;35(3):365-80.

Reaven GM. Are insulin resistance and/or compensatory hyperinsulinemia involved in the etiology and clinical course of patients with hypertension? *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995 May;19 Suppl 1:S2-5.

Rossi-Espagnet A, Goldstein GB, Tabibzadeh I. Urbanization and health in developing countries: a challenge for health for all. *World Health Stat Q.* 1991;44(4):185-244.

Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Douvdevani A, Gelman S. Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res.* 2000 Dec;8(9):673-5.

Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 10;100(12):7265-70.

Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997 Feb 1;99(3):457-68.

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M, et al. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are

present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14987-97.

Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001 Oct;108(7):949-55.

Sebeková K, Faist V, Hofmann T, Schinzel R, Heidland A. Effects of a diet rich in advanced glycation end products in the rat remnant kidney model. *Am J Kidney Dis.* 2003 Mar;41(3 Suppl 1):S48-51.

Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem.* 1989 Dec 25;264(36):21597-602.

Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijärvi A, Halavaara J, Yki-Järvinen H. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jul;87(7):3023-8.

Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2003 Sep 12;278(37):34834-44.

Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S. Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med.* 2003 Jul;20(7):575-9.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2001 Feb;44(2):129-46.

Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA, Hennig B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr.* 1996 Jun;15(3):289-94.

Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med.* 2006 Jan;12(1):75-80.

Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Oct;25(10):2062-8.

Takeuchi M, Kikuchi S, Sasaki N, Suzuki T, Watai T, Iwaki M, Bucala R, Yamagishi S. Involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2004 Feb;1(1):39-46.

Targher G, Bertolini L, Zoppini G, Zenari L, Falezza G. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. *Diabet Med.* 2005 Aug;22(8):999-1004.

Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M, Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):246-57.

Thorburn AW, Gumbiner B, Bulacan F, Wallace P, Henry RR. Intracellular glucose oxidation and glycogen synthase activity are reduced in non-insulin-

dependent (type II) diabetes independent of impaired glucose uptake. *J Clin Invest.* 1990 Feb;85(2):522-9.

Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem J.* 2003 Nov 1;375(Pt 3):581-92.

Thornalley PJ. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol.* 2002;50:37-57.

Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:111-7.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose Control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS33). *Lancet*, v.352, p.837-853, 1998.

Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1043:461-6.

Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002 Feb;251(2):87-101.

Vlassara H, Uribarri J. Glycooxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? *Rev Endocr Metab Disord.* 2004 Aug;5(3):181-8.

Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, Peppia M, Rayfield EJ. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major

risk factor for diabetic angiopathy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15596-601.

Walker M. Obesity, insulin resistance, and its link to non-insulin-dependent diabetes mellitus. Metabolism. 1995 Sep;44(9 Suppl 3):18-20.

Wang Q, Jiang L, Wang J, Li S, Yu Y, You J, Zeng R, Gao X, Rui L, Li W, Liu Y. Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. Hepatology. 2008 Dec 8.

Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, et al. Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Aug 2;91(16):7742-6.

World Organization Diabetes mellitus (WHO Tech Rep Series), 1997. WHO, Geneva. Dezembro.

Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. Biochem J. 1987 Jul 1;245(1):243-50.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest. 2003 Dec;112(12):1821-30.

Yang J, Wong RK, Park M, Wu J, Cook JR, York DA, Deng S, Markmann J, Najj A, Wolf BA, Gao Z. Leucine regulation of glucokinase and ATP synthase

sensitizes glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2006 Jan;55(1):193-201.

Yki-Järvinen H, Sutinen J, Silveira A, Korshennikova E, Fisher RM, Kannisto K, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A. Regulation of plasma PAI-1 concentrations in HAART-associated lipodystrophy during rosiglitazone therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Apr 1;23(4):688-94.

Zheng F, He C, Cai W, Hattori M, Steffes M, Vlassara H. Prevention of diabetic nephropathy in mice by a diet low in glycoxidation products. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002 May-Jun;18(3):224-37.

Zhou Z, Wang K, Penn MS, Marso SP, Lauer MA, Forudi F, Zhou X, Qu W, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM, Lincoff AM, Topol EJ. Receptor for AGE (RAGE) mediates neointimal formation in response to arterial injury. *Circulation*. 2003 May 6;107(17):2238-43. Epub 2003 Apr 28.

Stirban A, Negrean M, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting C, Kleesiek K, Mueller-Roesel M, Koschinsky T, Uribarri J, Vlassara H, Tschoepe D. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006 Sep;29(9):2064-71.

Raval AP, Dave KR, Prado R, Katz LM, Busto R, Sick TJ, Ginsberg MD, Mochly-Rosen D, Pérez-Pinzón MA. Protein kinase C delta cleavage initiates an aberrant signal transduction pathway after cardiac arrest and oxygen glucose deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Jun;25(6):730-41.

Russell AP. Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Dec;28 Suppl 4:S66-71.

Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Nov;24 Suppl 4:S28-32.

McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002 Jan;51(1):7-18.

Albers JW, Herman WH, Pop-Busui R, Martin CL, Cleary P, Waberski B. Subclinical neuropathy among Diabetes Control and Complications Trial participants without diagnosable neuropathy at trial completion: possible predictors of incident neuropathy? *Diabetes Care*, 30: 2613-2618, 2007.

Blasiak J, Arabski M, Krupa R, Wozniak K, Zadrozny M, Kasznicki J, Zurawska M, Drzewoski J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutation Research*, 554: 297-304, 2004.

Cerf ME. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Medical Science Monitor: International medical journal of experimental and clinical research*, 13: RA12-7, 2007.

Dolnikoff M, Martin-Hidalgo A, Machado UF, Lima FB, Herrera E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Internacional Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25: 426-433, 2001.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol*;186:421-31, 1990.

Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. *Diabetologia*, 50: 1365-1374, 2007.

Gedik CM, Grant G, Morrice PC, Wood SG, Collins AR. Effects of age and dietary restriction on oxidative DNA damage, antioxidant protection and DNA repair in rats. *European Journal of Nutrition*, 44: 263-272, 2005.

Giovannucci E. Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence. *Journal of Nutrition*, 131: 3109S-3120S, 2001.

Hamelet J, Demuth K, Paul JL, Delabar JM, Janel N. Hyperhomocysteinemia due to cystathionine beta synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice. *J Hepatol*;46:151–9, 2007.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. Nov 21;420(6913):333-6, 2002.

Hofmann SM, Dong HJ, Li Z, Cai W, Altomonte J, Thung SN, Zeng F, Fisher EA, Vlassara H. Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse. *Diabetes*, 51: 2082-2089, 2002.

Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine Reviews*, 29: 494-511, 2008.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*;30:620–50, 2002.

Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology & Medicine*, 12: 63-81, 1992.

Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, 48: 176-181, 1999.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990;186:464–78.

Ma YQ, Thomas GN, Ng MC, Critchley JA, Cockram CS, Chan JC, Tomlinson B. Association of two apolipoprotein A-I gene MspI polymorphisms with high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels and indices of obesity in selected healthy Chinese subjects and in patients with early-onset type 2 diabetes. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, 59: 442-449, 2003.

Marshall JA, Hamman RF, Baxter J. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *American Journal of Epidemiology*, 134: 590-603, 1991.

Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. Aug;57(8):1071-7, 2008.

Raval J, Lyman S, Nitta T, Mohuczy D, Lemasters JJ, Kim JS, et al. Basal reactive oxygen species determine the susceptibility to apoptosis in cirrhotic hepatocytes. *Free Radic Biol Med*;41:1645–54, 2006.

Sandu O, Song K, Cai W, Zheng F, Uribarri J, Vlassara H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes*, 54: 2314-2319, 2005.

Sauter NS, Schulthess FT, Galasso R, Castellani LW, Maedler K. The antiinflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist protects from high-fat diet-induced hyperglycemia. *Endocrinology*, 149: 2208-2218, 2008.

Slim RM, Toborek M, Watkins BA, Boissonneault GA, Hennig B. Susceptibility to hepatic oxidative stress in rabbits fed different animal and plant fats. *J Am Coll Nutr*;15:289–94,1996.

Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine*, 12: 75-80, 2006.

Tesfaye S, Kempler P. Painful diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 48: 805-807, 2005.

Tiehuis AM, Vincken KL, van den Berg E, Hendrikse J, Manschot SM, Mali WP, Kappelle LJ, Biessels GJ. Cerebral perfusion in relation to cognitive function and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 51: 1321-1326, 2008.

Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*, 53 Suppl 3: S215-219, 2004.

Velho G, Petersen KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel P, Shulman GI. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest*. Oct 15;98(8):1755-61, 1996.

