



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

DANIELA SOFIA LOURENÇO NETO

**COMPLICAÇÕES MACROVASCULARES DA
DIABETES TIPO 2: PAPEL DOS AGES E DO RAGE**

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISILOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROFESSORA DOUTORA CRISTINA MARIA TRISTÃO SENA
PROFESSORA DOUTORA RAQUEL MARIA FINO SEIÇA**

02/2013



Título:

Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

Autores:

Daniela Sofia Lourenço Neto¹

Cristina Maria Tristão Sena²

Raquel Maria Fino Seiça²

¹ **Afiliação:** Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Endereço: Rua dos Combatentes, N.º 142, 3045-332 Coimbra

² **Afiliação:** Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço: Subunidade I – Pólo 3, Universidade de Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, Celas, Coimbra, Portugal



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

“A cura está ligada ao tempo e, às vezes, também às circunstâncias.”

Hipócrates, Século V a.C.



ÍNDICE

Resumo.....	5
Palavras-Chave.....	7
Abstract.....	8
Keywords.....	9
Lista de Abreviaturas.....	10
Lista de Tabelas.....	11
Lista de Figuras.....	12
Introdução.....	14
Materiais e Métodos.....	16
Animais e tratamento.....	16
Recolha de amostras.....	17
Avaliação dos níveis de AGEs e RAGE na aorta.....	17
Avaliação dos níveis de <i>stress</i> oxidativo: anião superóxido.....	20
Estudos funcionais de vasodilatação dependente do endotélio.....	20
Análise estatística.....	21
Resultados.....	22
Função endotelial.....	22
AGEs e RAGE.....	25
Marcadores de <i>stress</i> oxidativo.....	31
Discussão.....	34
Conclusão.....	38
Agradecimentos.....	39



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

Referências Bibliográficas..... 40



RESUMO

A diabetes mellitus é uma patologia em crescendo por todo o mundo. Doentes com diabetes mellitus têm morbidade e mortalidade cardiovascular aumentadas. A patogenia da doença cardiovascular na diabetes mellitus é multifatorial, estando a disfunção endotelial implicada na sua patogénese. Esta alteração da função vascular ocorre, precocemente, antes da manifestação da doença vascular, caracterizando-se por redução do vasorrelaxamento dependente do endotélio. Há evidências que afirmam que a disfunção endotelial é provocada, em grande parte, pelo aumento dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), que se verifica em condições de hiperglicemia.

Este trabalho pretendeu avaliar os efeitos da administração do metilglioxal (MG), um intermediário da formação dos produtos finais de glicação avançada, na evolução da disfunção endotelial e principais alterações associadas e da administração de piridoxamina (PM), um derivado da vitamina B6 e inibidor da formação de AGEs, ao nível do endotélio e em diferentes marcadores de glicação e *stress* oxidativo.

Foram estabelecidos seis grupos de estudo (ratos com 6 meses): dois grupos de controlo, ratos normais (Wistar, W) e ratos diabéticos, Goto-Kakizaki (GK); dois grupos submetidos ao tratamento com MG, ratos W+MG e ratos GK+MG; dois grupos submetidos ao tratamento com MG e PM, ratos W+MG+PM e ratos GK+MG+PM. Foram avaliados a capacidade de vasodilatação dependente do óxido nítrico, os níveis de *stress* oxidativo, com o recurso à avaliação do anião superóxido, e os níveis de AGEs e RAGE na aorta. O MG induziu disfunção endotelial nos ratos Wistar e agravou a disfunção endotelial nos ratos GK; aumentou os níveis de AGEs e o *stress* oxidativo nos ratos Wistar e GK. Observou-se ainda, um aumento dos níveis de RAGE nos GK diabéticos e nos ratos Wistar tratados com MG. O tratamento com piridoxamina melhorou parte dos parâmetros avaliados. Este estudo permitiu



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

conhecer algumas das alterações vasculares na diabetes mellitus tipo 2 e os efeitos benéficos da PM nestas lesões, contribuindo para o desenvolvimento de novas abordagens preventivas e terapêuticas nesta patologia.



Palavras-Chave:

Diabetes mellitus tipo 2

Produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Recetor para AGEs (RAGE)

Disfunção endotelial

Stress oxidativo

Metilglioxal (MG)

Piridoxamina (PM)



ABSTRACT

Diabetes mellitus is a growing disease worldwide. Patients with diabetes mellitus have increased cardiovascular morbidity and mortality. The pathogenesis of cardiovascular disease in diabetes mellitus is multifactorial and endothelial dysfunction has been implicated in its pathogenesis. This abnormal function of the vasculature precedes cardiovascular disease and is associated with impaired endothelium-dependent vasorelaxation. Evidences prove that this vascular dysfunction is mainly caused largely by increased advanced glycation end products (AGEs), which occur under hyperglycemic conditions.

This work intended to study the effects of methylglyoxal, an intermediate of advanced glycation end product formation, in the development of endothelial dysfunction and associated major changes, and the role of pyridoxamine, a derivative of vitamin B6 and an inhibitor of AGEs formation, on endothelial function and oxidative *stress* levels.

Six groups were studied (rats with 6 month old): two control groups, normal Wistar rats (W) and diabetic Goto-Kakizaki rats (GK); two groups were treated with MG, W rats with MG and GK rats with MG (W+MG and GK+MG, respectively); two groups were treated with MG and PM, W+MG+PM and GK+MG+PM. The endothelium-dependent vasodilation, levels of oxidative *stress* through the vascular content of superoxide anion, and AGEs and RAGE levels were evaluated, showing significant increase on endothelial dysfunction, oxidative *stress* and AGEs levels in the groups submitted to treatment with MG and a significant improvement in some of the parameters after the PM introduction.

This study allowed understand some of the vascular abnormalities associated with type 2 diabetes and the beneficial effects of PM, helping to the development of new preventive and therapeutic approaches in this disease.



Keywords:

Type 2 diabetes mellitus

Advanced glycation end products (AGEs)

AGEs receptor (RAGE)

Endothelial dysfunction

Oxidative *stress*

Methylglyoxal (MG)

Pyridoxamine (PM)



LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs – Produtos finais de glicação avançada

RAGE – Recetor para AGEs

MG – Metilglioxal

PM – Piridoxamina

W – Wistar

GK – Goto-Kakizaki

ROS – Espécies reativas de oxigénio

CML – N^ε-(Carboximetil)lisina

L-Name – *Nitro-Arginine Methyl Ester*

ACh - acetilcolina



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções utilizadas na técnica de *Western blot*. 18



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Registo de tensão de uma artéria aorta: efeito da fenilefrina e de diferentes doses de acetilcolina..... 22
- Figura 2.** Curvas dose-efeito de acetilcolina, em ratos Wistar (W), ratos diabéticos (GK), ratos Wistar com metilglioxal (W+MG) e GK com metilglioxal (GK+MG)..... 23
- Figura 3.** Curvas dose-efeito de acetilcolina, em ratos Wistar (Wistar), ratos diabéticos (GK), ratos GK com metilglioxal (GK+MG) e GK com metilglioxal e piridoxamina (GK+MG+P)..... 24
- Figura 4.** Curvas dose-efeito de acetilcolina, em ratos Wistar (W), ratos Wistar com metilglioxal (W+MG) e em ratos Wistar com metilglioxal e piridoxamina (W+MG+PM)... 25
- Figura 5.** Localização, por imunofluorescência, de AGEs na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm **p < 0.01, ***p < 0.001 vs ratos W; §§§p < 0.001 vs grupo W+MG; φφφ p < 0.001 vs rato GK controlo. 26
- Figura 6.** Localização, por imunofluorescência, do receptor para AGEs (RAGE) na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm ***p < 0.001 vs ratos W; §p < 0.05, §§§p < 0.001 vs grupo W+MG. 27
- Figura 7. Localização, por imunofluorescência, de N-carboximetil-lisina (CML) na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm **p < 0.01,



***p < 0.001 vs ratos W; §§§p < 0.001 vs grupo W+MG; ¶¶¶ p < 0.001 vs rato GK controlo.

..... 28

Figura 8. Localização, por imunofluorescência, de AGEs na parede da aorta de ratos GK+MG+PM. 29

Figura 9. Efeitos do metilglioxal nos níveis de expressão de AGEs totais na parede da artéria aorta. Média \pm epm ***p < 0.001 vs ratos W; §§§p < 0.001 vs grupo W+MG; ¶¶¶ p < 0.001 vs rato GK controlo. 30

Figura 10. Efeitos da piridoxamina nos níveis de expressão de AGEs totais na parede da artéria aorta em ratos GK tratados com MG. 31

Figura 11. Localização, por imunofluorescência, do anião superóxido na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência do brometo de etídio nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm ***p < 0.001 vs ratos W; §§§p < 0.001 vs grupo W+MG; ¶¶¶ p < 0.001 vs rato GK controlo. 32

Figura 12. Efeitos da piridoxamina na localização, por imunofluorescência, do anião superóxido na parede da aorta de ratos GK tratados com MG..... 33



INTRODUÇÃO

A hiperglicemia associada à diabetes mellitus tipo 2 tem diversas consequências nos tecidos do organismo, entre elas a glicação não-enzimática e a oxidação de proteínas, lípidos e nucleótidos, resultando na formação de produtos de finais de glicação avançada (AGEs). Estes são formados a partir de interações amino-carbonilo não enzimáticas, entre açúcares redutores ou lípidos oxidados e proteínas, aminofosfolípidos ou ácidos nucleicos.^(3,4)

Estes compostos modificam, de forma irreversível, as propriedades químicas e funcionais das estruturas biológicas, pois estão associados à formação de radicais livres e consequente aumento do *stress* oxidativo, à formação de ligações cruzadas com proteínas, à interação com recetores celulares, a alterações morfofuncionais e ao aumento da expressão de mediadores inflamatórios. São, por isso e também, altamente prejudiciais à integridade e função vasculares. Os mecanismos de ação podem ser divididos em extracelulares e intracelulares. Nos extracelulares, os AGEs interagem e modificam as propriedades funcionais de moléculas fundamentais da matriz extracelular. Nos intracelulares, existem os dependentes e os independentes de recetores. Na diabetes, a diminuição do diâmetro do lúmen dos vasos, pode dever-se entre outras causas, à acumulação de proteínas plasmáticas na região sub-endotelial, (ex. albumina e lipoproteínas de baixa densidade), que aí ficam retidas devido às ligações cruzadas entre os AGEs e o colagénio, causando diminuição da elasticidade vascular.^(3,4) Por outro lado, os AGEs interagem com recetores na membrana de células como os macrófagos, as células endoteliais e as células mesangiais, aumentando os níveis de *stress* oxidativo, de processos pró-trombóticos e a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Em condições fisiológicas, há um equilíbrio entre a formação de AGEs (existem fontes endógenas e exógenas de AGEs), e a sua eliminação (através de sistemas enzimáticos,



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

proteólise extracelular, células *scavenger* e clearance renal). Este equilíbrio está comprometido em algumas situações patológicas^(3,4), pelo que, faz todo o sentido o estudo destes produtos para tentar minimizar ou mesmo eliminar a sua produção excessiva e/ou atenuar os seus efeitos.

A redução dos níveis de AGEs e consequentemente da disfunção endotelial a eles associada, pode ser conseguida intervindo a diversos níveis, nomeadamente, ao nível da dieta (reduzindo os níveis de AGEs exógenos consumidos), pela administração de anti-oxidantes, de inibidores da formação de AGEs, de AGEs *cross-link breakers* e de inibidores do recetor de AGEs, e recorrendo, também, à potenciação de mecanismos de *clearance* (lizosimas e RAGE solúvel) e à inibição da sinalização induzida pela ligação dos AGEs ao seu recetor.⁽⁶⁾

A piridoxamina é um derivado da vitamina B6 e um inibidor da formação de AGEs, bloqueando a degradação oxidativa dos produtos *Amadori*. Também tem um papel importante na redução da degradação oxidativa, pela inibição das espécies reativas de oxigénio (ROS), na neutralização dos produtos carbonilo altamente reativos e tóxicos, na redução da dislipidemia e da modificação química e *cross-links* do colagénio e na correção do equilíbrio ácido-base.⁽⁷⁾ Em alguns modelos animais, como os ratos obesos Zucker, foi descrito que a piridoxamina tem a capacidade de reduzir os lípidos e retardar a progressão da nefropatia diabética associada.⁽⁸⁾

A combinação da eficácia com a baixa toxicidade sugere que a piridoxamina pode ser útil para retardar a progressão das complicações vasculares associadas à diabetes, sendo um dos objetos de estudo neste trabalho. Assim, procurou-se mimetizar a progressão da diabetes, administrando metilglioxal, avaliou-se as consequências na função endotelial e na agressão oxidativa e os efeitos benéficos da terapêutica com a piridoxamina a este nível.



MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS E TRATAMENTO

Neste estudo, todos os procedimentos animais foram conduzidos de acordo com a Lei Portuguesa de Experimentação com Animais de Laboratório (2004).

Foram estudados ratos não diabéticos Wistar (W) e os espontaneamente diabéticos tipo 2 Goto-Kakizaki (GK), com 6 meses de idade, obtidos das colónias locais (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal).

Constituíram-se seis grupos de estudo (n=6-16/grupo): ratos Wistar normais controlo (W), ratos GK diabéticos controlo (GK), ratos W com metilglioxal (W+MG), ratos GK com metilglioxal (GK+MG), ratos W com metilglioxal e piridoxamina (W+MG+PM) e ratos GK com metilglioxal e piridoxamina (GK+MG+PM). O metilglioxal (MG = 50-75 mg/Kg de peso) foi administrado por via oral (água do biberão), durante 3 meses (dos 3 aos 6 meses de vida). A piridoxamina foi, também, administrada pela mesma via (PM-1g/L, Sigma, EUA), durante o último mês de tratamento. A quantidade de água ingerida, com metilglioxal e com piridoxamina, foi quantificada durante o tratamento.

Os animais foram mantidos num ambiente restrito sob temperatura e humidade controladas (22-24°C e 50-60%, respetivamente), ventilação adequada e ciclos alternados de luz (12 horas) e obscuridade (12 horas), tendo tido livre acesso a ração (dieta *standard* laboratorial AO4-Panlab, Barcelona, Espanha) e a água (utilizada como veículo de administração nos grupos tratados).



RECOLHA DE AMOSTRAS

No final do tratamento, as amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca com os animais anestesiados com cloridrato de quetamina (75 mg/kg) e cloridrato de clorpromazina (3 mg/kg), (administração intramuscular). Na recolha das amostras foram utilizados tubos BD Vacutainer com e sem EDTA (4,5 mg), de modo a obter plasma e soro, respetivamente. As amostras foram centrifugadas a 2500 r.p.m, à temperatura de 4°C, durante 10 minutos, aliqüotadas e armazenadas a -20°C.

Posteriormente, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Uma vez expostos os órgãos, a aorta foi removida e limpa de tecido adiposo. Seccionou-se pequenas fatias horizontais da artéria aorta torácica, uma foi conservada em meio de conservação (Shandon Cryomatrix, Thermo Scientific, EUA) ou em formaldeído tamponado a 10% para estudos histológicos subsequentes, enquanto um anel da artéria torácica foi utilizado para o estudo funcional. A aorta abdominal foi congelada, de imediato, em azoto líquido e armazenada a -80°C (para estudos de *Western blot*).

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE AGEs E RAGE NA AORTA

Foram obtidos segmentos de artéria aorta, com cerca de 200 mg, sendo homogeneizados em 2 mL de tampão de lise (Tabela 1) e, seguidamente, sonicados.

Procedeu-se, então, a duas centrifugações (20', 14000xg, 4°C), recolhendo-se, sucessivamente, o sobrenadante. Calculou-se a concentração de proteína pelo método do BCA (*BCA protein assay*, Pierce, USA) e as amostras foram aliqüotadas e, após adicionado tampão *Sample*, armazenadas a -80°C.

A identificação e quantificação dos AGEs totais foi efetuada utilizando a técnica de *Western blot*. A β -actina serviu de controlo interno da quantidade de proteína das amostras.



Tabela 1 - Soluções utilizadas na técnica de *Western Blot*

Tampão de lise

25 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 20 mM NaF; 2 mM Na₃VO₄; 10 mM β-glicerofosfato; 2,5 mM pirofosfato de sódio; 10 mM PMSF e 20 μl cocktail inibidor de proteases por 0,5 g de tecido.

Tampão *Sample*

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,6; 20% SDS 10%; 2,5 mL glicerol; 0,05% Bromefenol Blue

Tampão *Resolving*

0,75 mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 8,8

Tampão *Stacking*

0,25 mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 6,8

Tampão *Running*

125 mM Tris-Base; 480 mM Glicina; 9 mM SDS; pH 8,8

Tampão CAPS

50 mM CAS; 2% NaOH; pH 11; 10% metanol

Tampão TBS

250 mM Tris; 1,5 mM NaCl; pH 7,6

Tampão TBST

Solução TBS; 1% Tween-20



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

Os géis de acrilamida para separação das proteínas por peso molecular foram polimerizados no sistema de polimerização (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA), com os tampões *Resolving* e *Stacking* (Tabela 1). Após as amostras terem sido desnaturadas e sonicadas, correram-se os géis no sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell* (Bio-Rad, EUA) com Running buffer, usando um padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards, Dual Color*, Bio-Rad, EUA), a voltagem constante de 160 V.

Após a ativação das membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride membrane*, Bio-Rad, EUA) com metanol, as proteínas foram transferidas para estas no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, EUA), a amperagem constante de $\pm 300\text{mA}$, em tampão *CAPS* (Tabela 1).

As membranas foram bloqueadas com solução TBST-BSA a 5% (Tabela 1), à temperatura ambiente, durante 2 horas e depois lavadas com TBST (Tabela 1). Após o bloqueio, procedeu-se à incubação das membranas *overnight* a 4°C, com os respetivos anticorpos primários. Repetiu-se a lavagem com TBST e, de seguida, incubou-se as membranas com os respetivos anticorpos secundários durante 2 horas, com agitação constante e à temperatura ambiente.

Após remoção do anticorpo secundário em excesso, as membranas foram incubadas durante aproximadamente 2 minutos com o substrato enzimático ECF (*Mouse ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, UK) e reveladas através do leitor de fluorescência (Typhoon, GE Healthcare, USA). A quantificação das bandas foi calculada com o programa ImageQuant, Molecular Dynamics, EUA.

Após efetuadas crio-secções, com cerca de 7 μm de espessura, do material conservado em meio de congelação, estas foram deixadas a secar durante 30 minutos e procedeu-se à respetiva marcação com anticorpo contra AGEs totais, N^ε-(Carboximetil)lisina



(CML) e recetor para AGEs (RAGE). Seguiu-se a marcação com anticorpo secundário e a determinação da fluorescência.

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE *STRESS* OXIDATIVO: ANIÃO SUPERÓXIDO NA AORTA

Cortes histológicos de segmentos de aorta, com cerca de 30 μm de espessura, do material conservado em meio de congelação, foram incubados com a sonda fluorescente para anião superóxido (*Dihydroethidium (hydroethidine) (DHE)*, *Molecular Probes, Invitrogen, USA*), a uma concentração de 2 μM , durante 30 minutos, a 37°C e em ambiente humidificado. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e fixadas durante 10 minutos com paraformaldeído a 4%, à temperatura ambiente. As crio-secções foram, novamente, lavadas em PBS e procedeu-se à montagem das preparações, tendo sido colocados 50 μl de meio de montagem (*DPX, Panreac, Espanha*) sobre cada lâmina e cobrindo-se as crio-secções com lamelas, deixando secar no escuro. Por fim, as lâminas foram seladas com verniz e procedeu-se à análise por microscopia de fluorescência.

ESTUDOS FUNCIONAIS DE VASODILATAÇÃO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

Anéis vasculares da aorta torácica de cada animal, foram cuidadosamente removidos e limpos de tecido conjuntivo, de forma a preservar o endotélio.⁽⁵⁾

O endotélio foi mecanicamente removido de segmentos distintos da aorta dos mesmos animais. Os anéis foram suspensos em câmara de perfusão com 10 ml de capacidade, contendo solução de Krebs-Henseleit a pH 7.4 A solução foi mantida a 37°C e oxigenada com uma mistura de gases contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os anéis foram



montados em 2 ganchos de metal, ligados a um suporte de um lado e a um transdutor de força (*PowerLab*) do outro lado. Os anéis foram distendidos a uma tensão de 1g, estabelecida previamente como tensão ideal, através de curvas de comprimento-tensão. Os anéis da aorta foram perfundidos por um período de 15 minutos.

Os anéis da aorta, com e sem endotélio, foram contraídos com fenilefrina (10^{-7} M). Após a estabilização da contração, foi adicionada acetilcolina (ACh) ao banho, de forma cumulativa, a fim de se obterem concentrações de 10^{-6} , 10^{-4} , 10^{-3} M e a serem produzidas curvas dose-efeito na presença e na ausência de L-Nitro-Arginina Methyl Ester (L- NAME), um inibidor das sintetases do óxido nítrico. Os resultados foram expressos como percentagem de relaxamento em relação à concentração de fenilefrina.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados com valor médio \pm epm (erro padrão da média). A análise estatística foi realizada através do programa GraphPad Prism version 3.0 por ANOVA one-way, seguida de teste comparativo de Bonferroni. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.



RESULTADOS

FUNÇÃO ENDOTELIAL

Na avaliação da vasodilatação dependente do endotélio, foi observado que tanto na ausência de endotélio como na presença de L-NAME, um inibidor da sintetase do óxido nítrico, não ocorreu qualquer relaxamento (Figura 1).

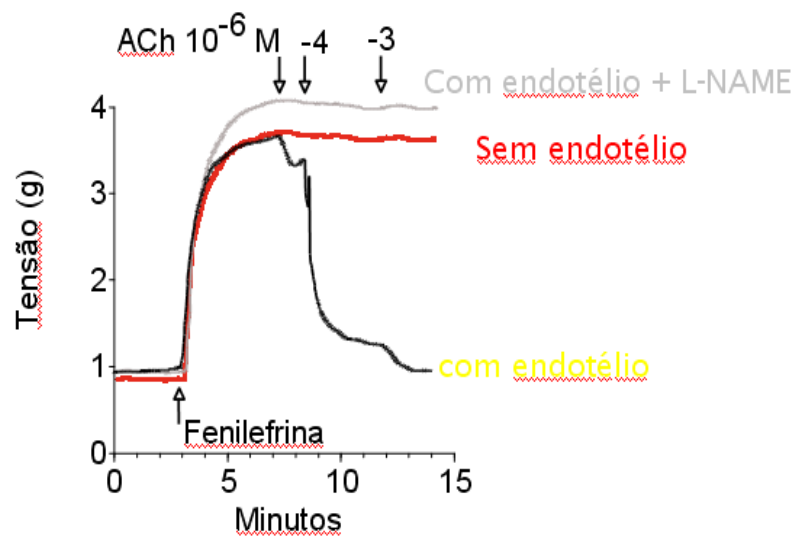


Figura 1. Registo de tensão de uma artéria aorta: efeito da fenilefrina e de diferentes doses de acetilcolina.



Na avaliação do efeito do MG na função do vaso, foi observada uma diminuição do mesmo relaxamento, em 35% nos GK+MG quando comparados com os ratos GK, uma redução de 20% nos W+MG em comparação com os ratos W e, também, uma redução de 20% nos ratos diabéticos GK em relação aos ratos controlo W (Figura 2).

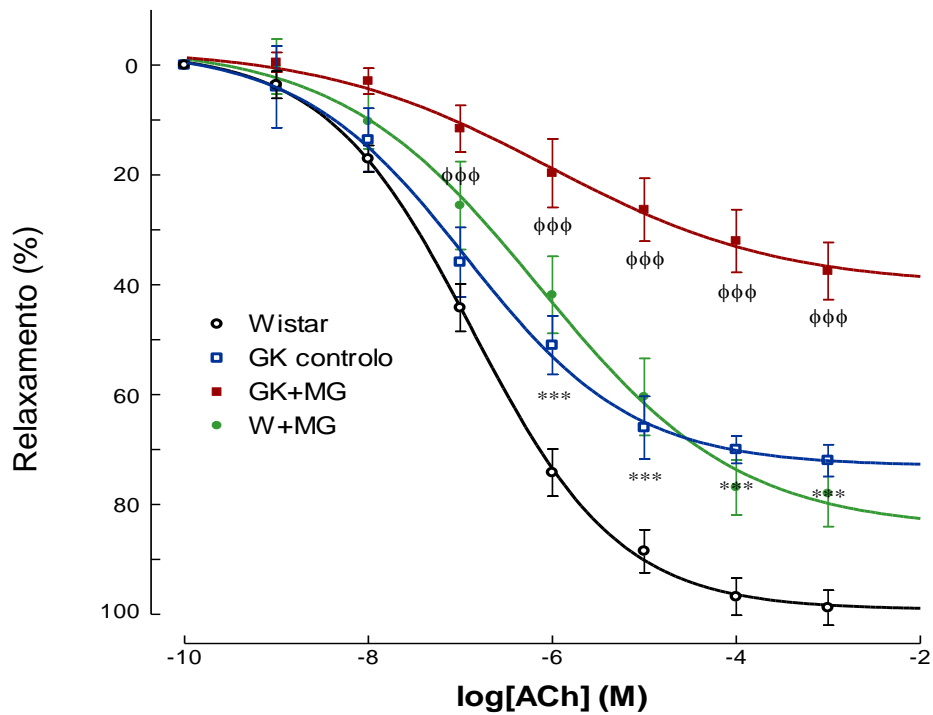


Figura 2. Curvas dose-efeito de acetilcolina, em ratos Wistar (W), ratos diabéticos (GK), ratos Wistar com metilgloxal (W+MG) e GK com metilgloxal (GK+MG). Média \pm epm *** $P < 0,001$ vs. ratos W; φφφ $P < 0,001$ vs. ratos GK.



Em relação aos efeitos da PM na função endotelial vascular, foi evidenciada uma melhoria da mesma de cerca de 20% nos ratos GK com MG e PM (GK+MG+PM) em comparação com o grupo GK+MG (Figura 3); observou-se, igualmente, uma melhoria da função endotelial nos ratos W com MG e PM (W+MG+PM) quando comparada com a do grupo W+MG (Figura 4).

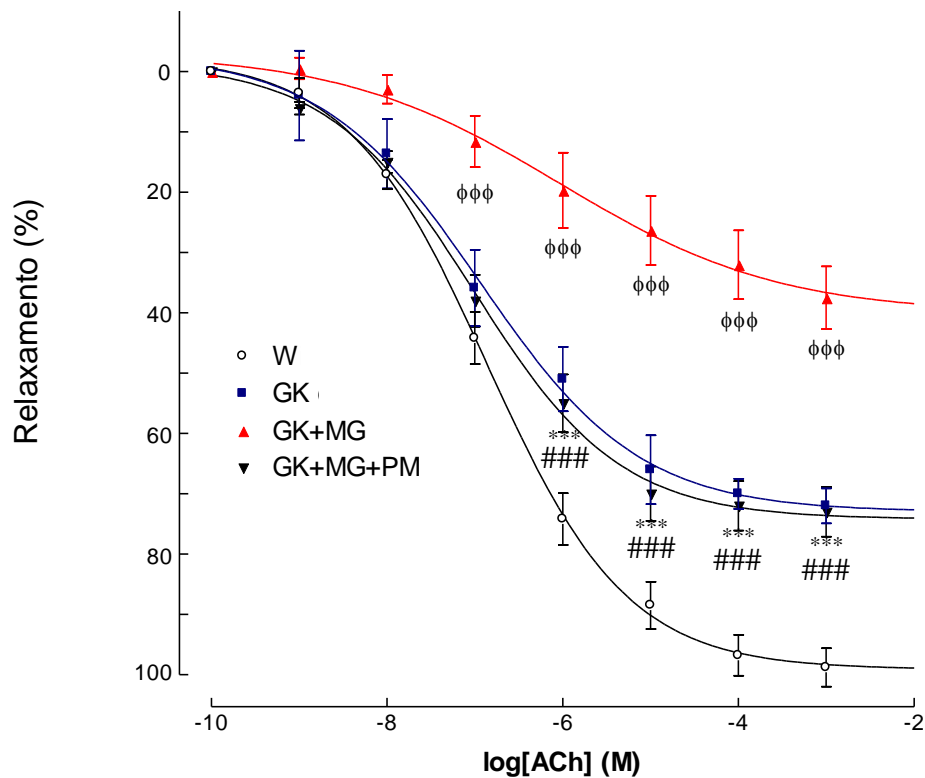


Figura 3. Curvas dose-efeito de acetilcolina, em ratos Wistar (Wistar), ratos diabéticos (GK), ratos GK com metilglioxal (GK+MG) e GK com metilglioxal e piridoxamina (GK+MG+P).

Média \pm epm *** P<0,001 vs ratos W; φφφ P<0,001 vs grupo GK; ### P<0,001 vs grupo GK+MG.

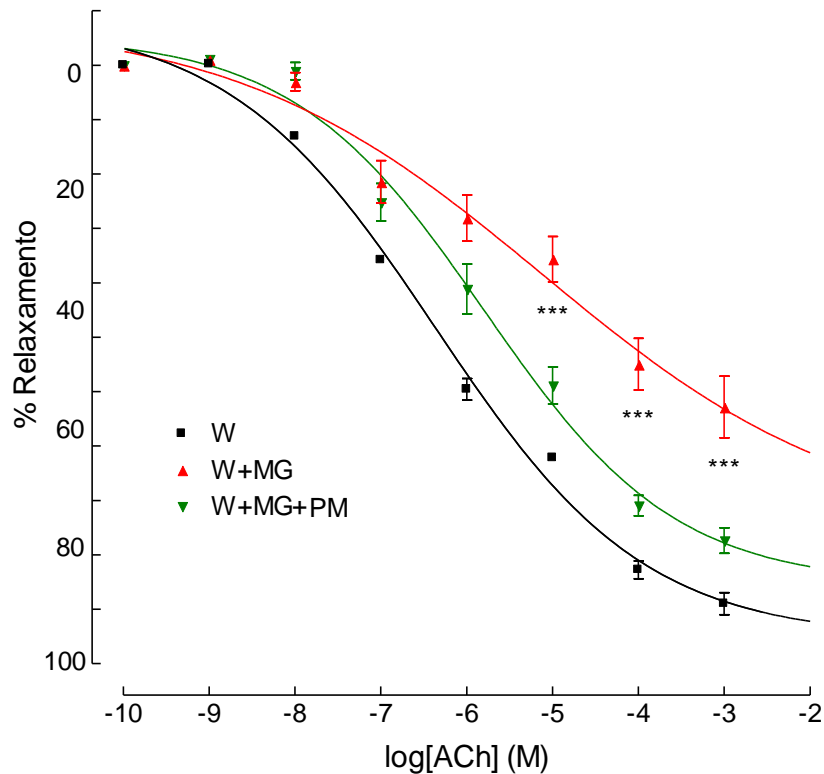


Figura 4. Curvas dose-efeito de acetilcolina, em ratos Wistar (W), ratos Wistar com metilglioxal (W+MG) e em ratos Wistar com metilglioxal e piridoxamina (W+MG+PM).

Média \pm epm *** P<0,001 vs. ratos W.

AGEs e RAGE

Demonstrou-se um aumento acentuado dos níveis de AGEs totais (Figura 5), RAGE (Figura 6) e CML (Figura 7) na parede dos vasos dos ratos Wistar com MG (W+MG), relativamente ao grupo Wistar (W). Comparando os grupos GK e GK com MG (GK+MG) esse aumento é menos visível, uma vez que os ratos GK, por si só, já apresentam um aumento destes compostos. Observou-se uma diminuição acentuada da quantidade de AGEs totais na parede dos vasos dos GK com MG e PM (GK+MG+PM) (Figura 8) quando comparada com a dos GK com MG (GK+MG) (Figura 5).

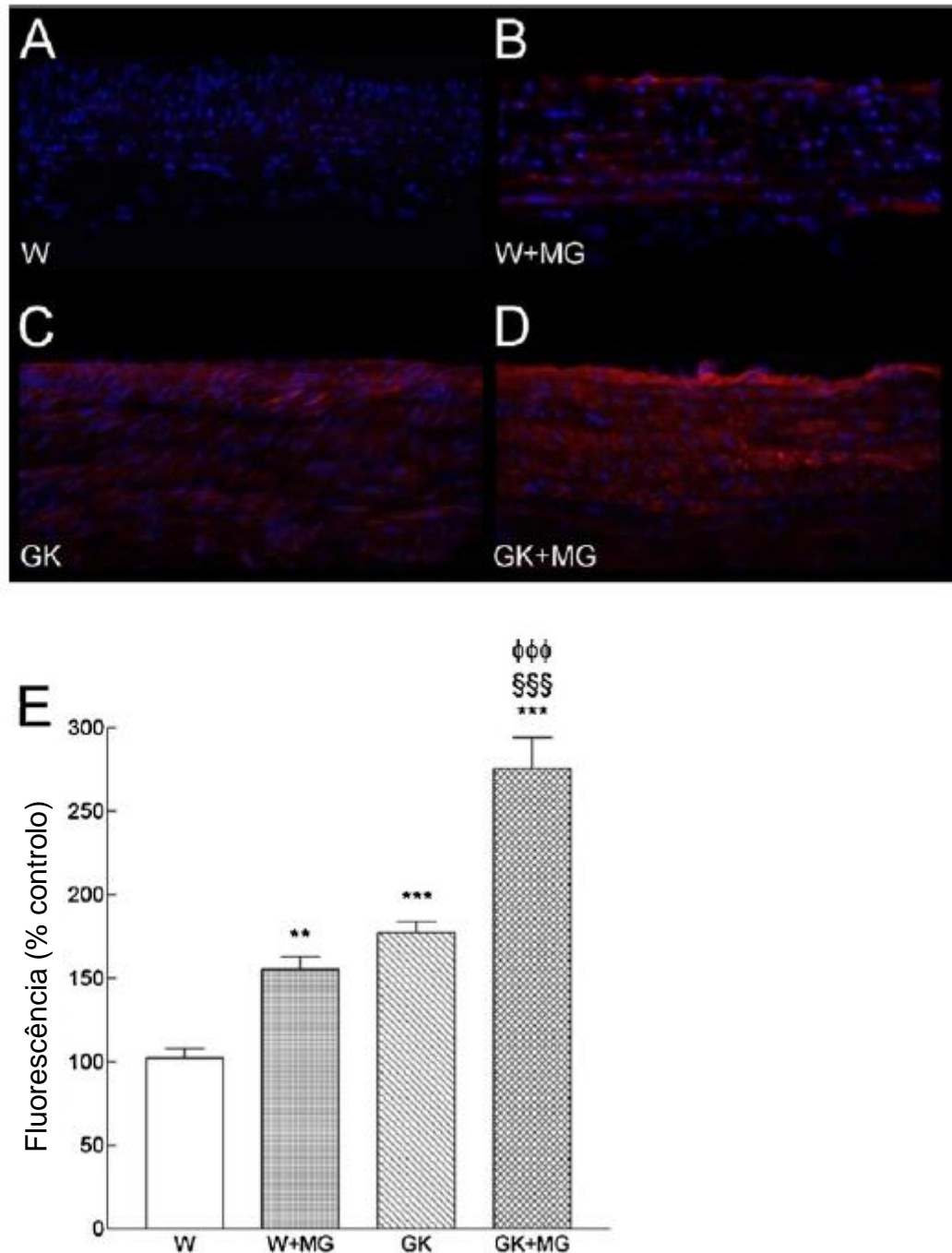


Figura 5. Localização, por imunofluorescência, de AGEs na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs ratos W; \$\$\$ $p < 0.001$ vs grupo W+MG; φφφ $p < 0.001$ vs rato GK controlo.

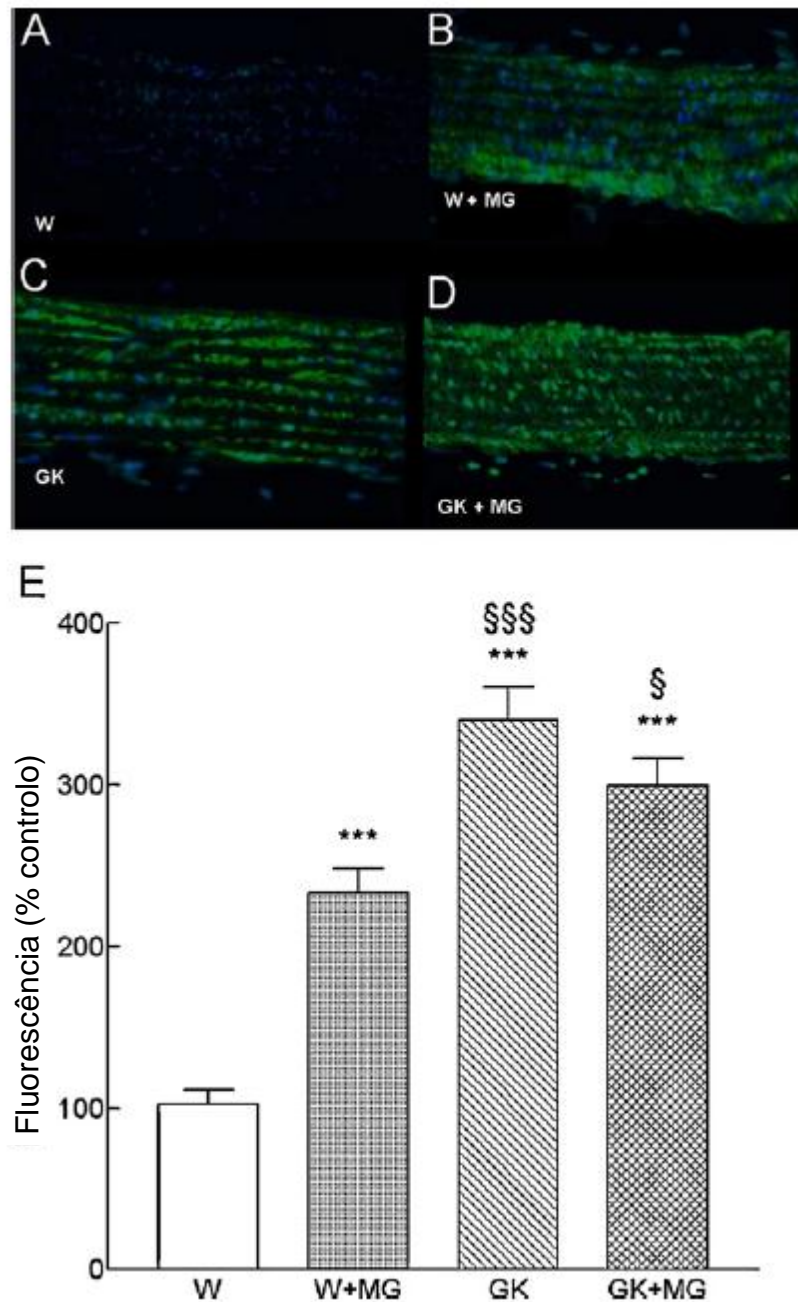


Figura 6. Localização, por imunofluorescência, do receptor para AGEs (RAGE) na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm ***p < 0.001 vs ratos W; §p < 0.05, §§§p < 0.001 vs grupo W+MG.

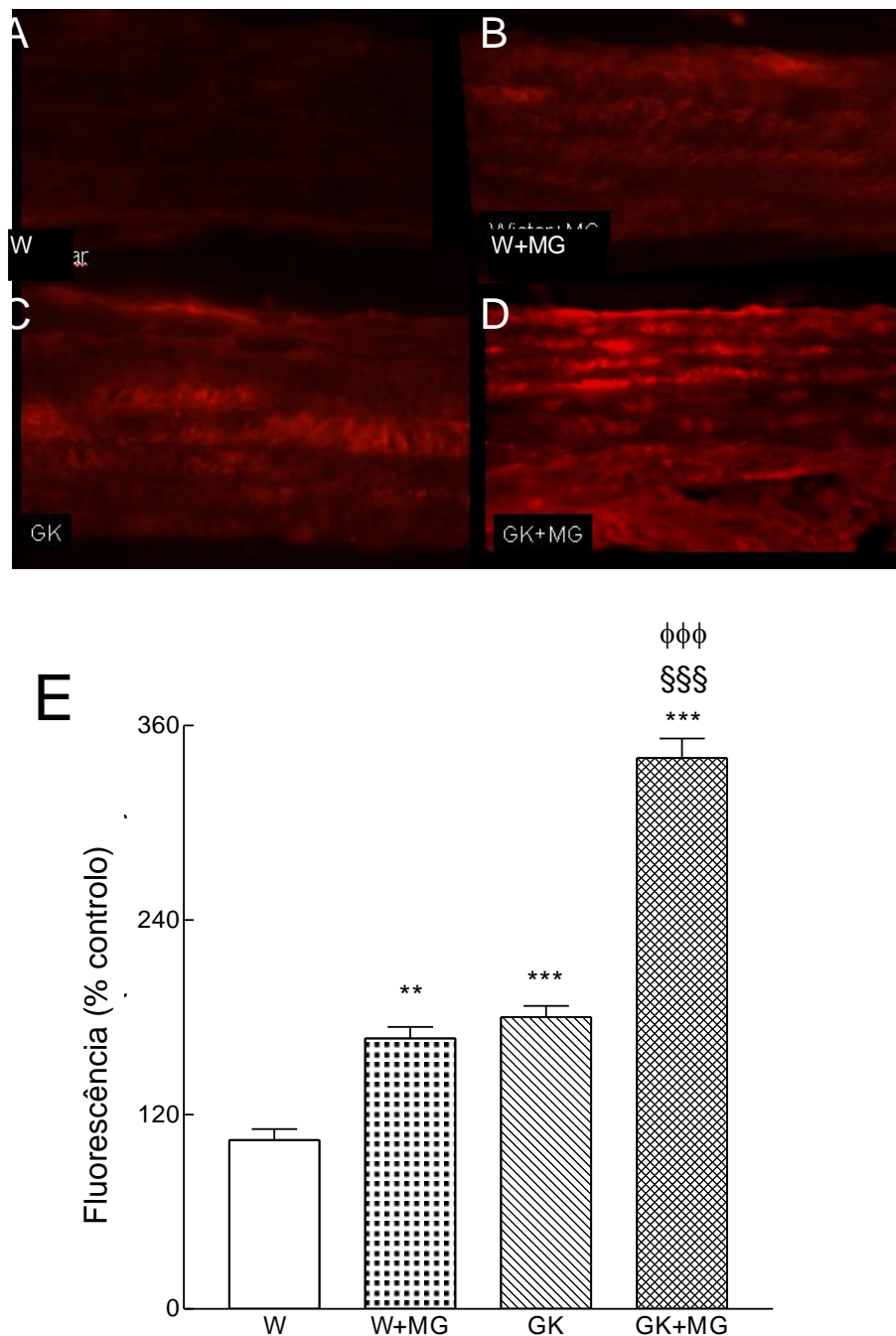


Figura 7. Localização, por imunofluorescência, de N-carboximetil-lisina (CML) na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs ratos W; §§§ $p < 0.001$ vs grupo W+MG; φφφ $p < 0.001$ vs rato GK controlo.

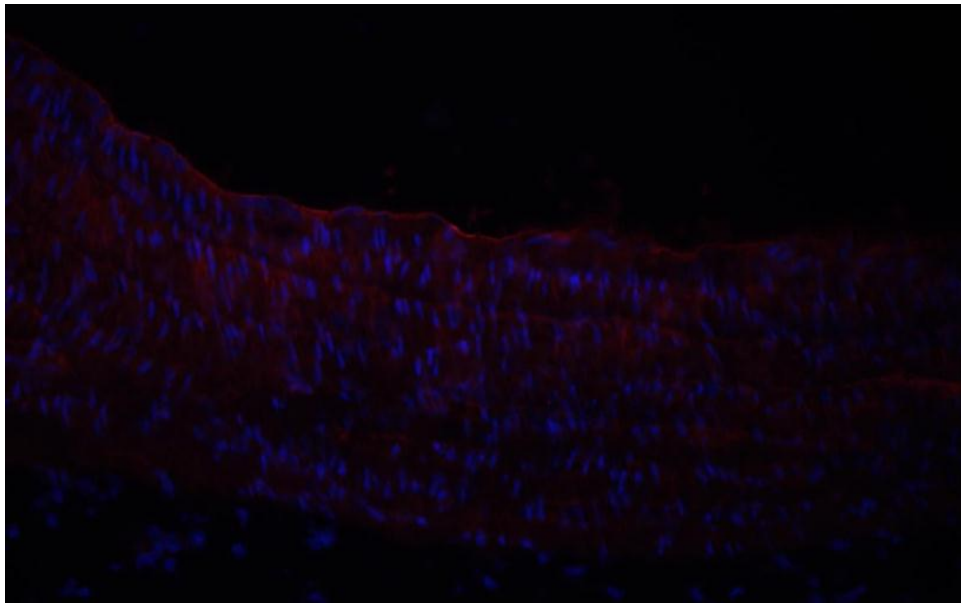


Figura 8. Localização, por imunofluorescência, de AGEs na parede da aorta de ratos GK+MG+PM.

Na identificação e quantificação dos AGEs totais por *Western Blot*, foi demonstrado um aumento de 51% ($p < 0.001$) no grupo W+MG e de 53% ($p < 0.01$) no grupo GK+MG, quando comparado com os respetivos controlos (Figura 9), tendo diminuído no grupo GK+MG+PM (Figura 10).

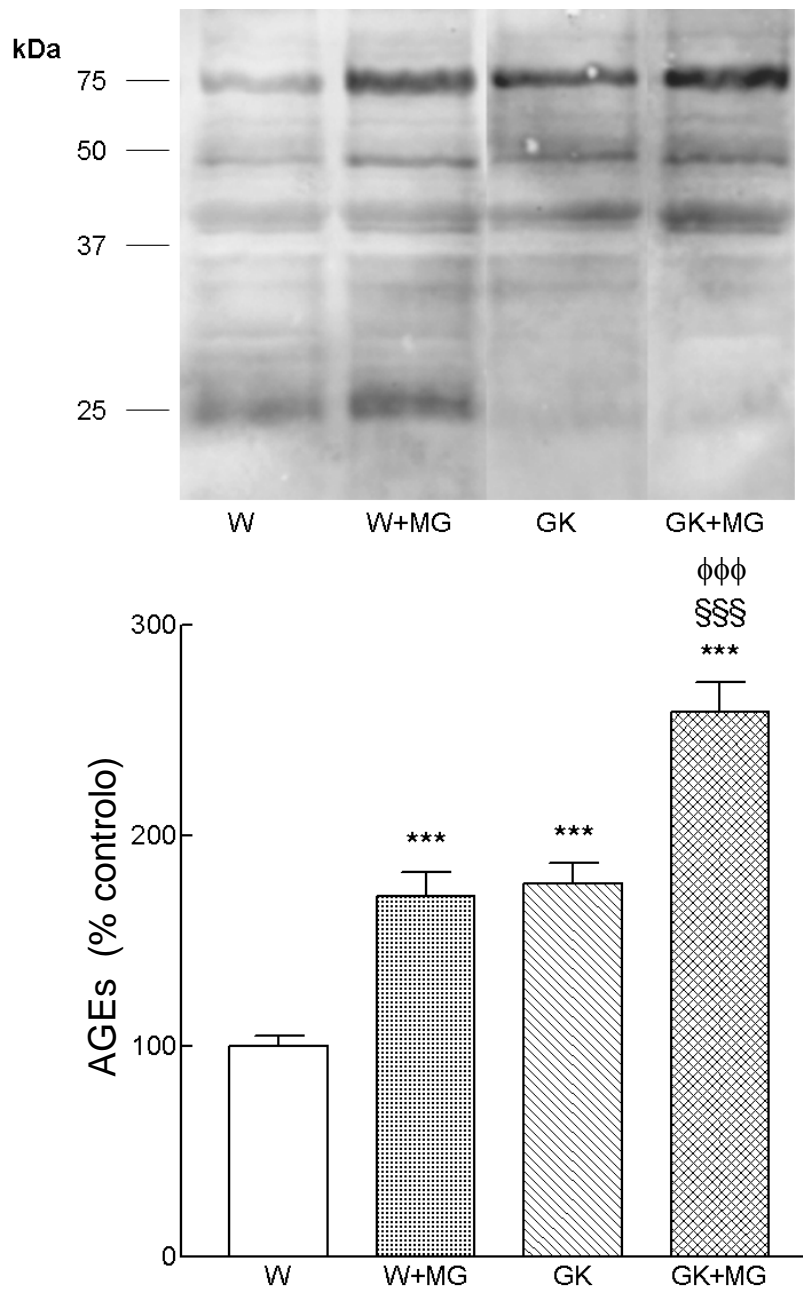


Figura 9. Efeitos do metilgloxal nos níveis de expressão de AGEs totais na parede da artéria aorta. Média \pm epm ***p < 0.001 vs ratos W; §§§p < 0.001 vs grupo W+MG; φφφ p < 0.001 vs rato GK controlo.

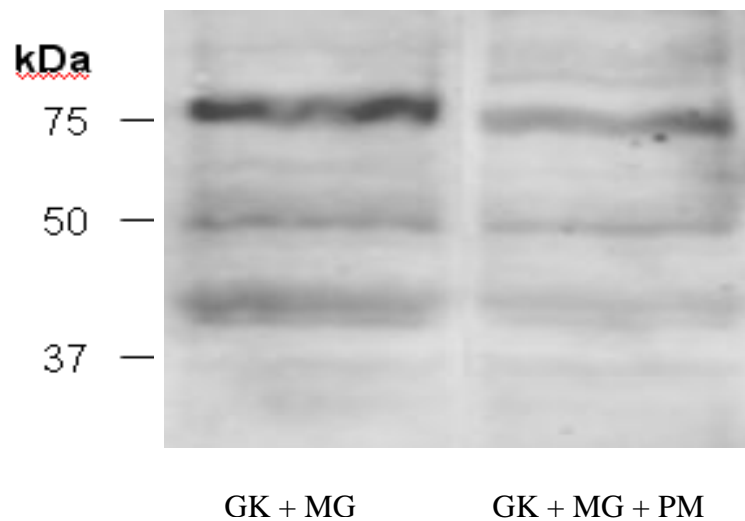


Figura 10. Efeitos da piridoxamina nos níveis de expressão de AGEs totais na parede da artéria aorta em ratos GK tratados com MG.

MARCADORES DE *STRESS* OXIDATIVO

Neste estudo verificou-se que a quantidade de fluorescência emitida após oxidação do dihidroetídeo pelos iões superóxido ($O_2^{\bullet-}$), presentes na parede vascular e traduzindo os níveis de *stress* oxidativo, foi mais intensa na parede dos vasos dos GK quando comparada com a dos ratos Wistar (Figura 11). Verificou-se, também, que há um aumento da intensidade da fluorescência na parede vascular no grupo GK+MG em relação à do grupo GK e que diminui no grupo GK+MG+PM (Figura 12).

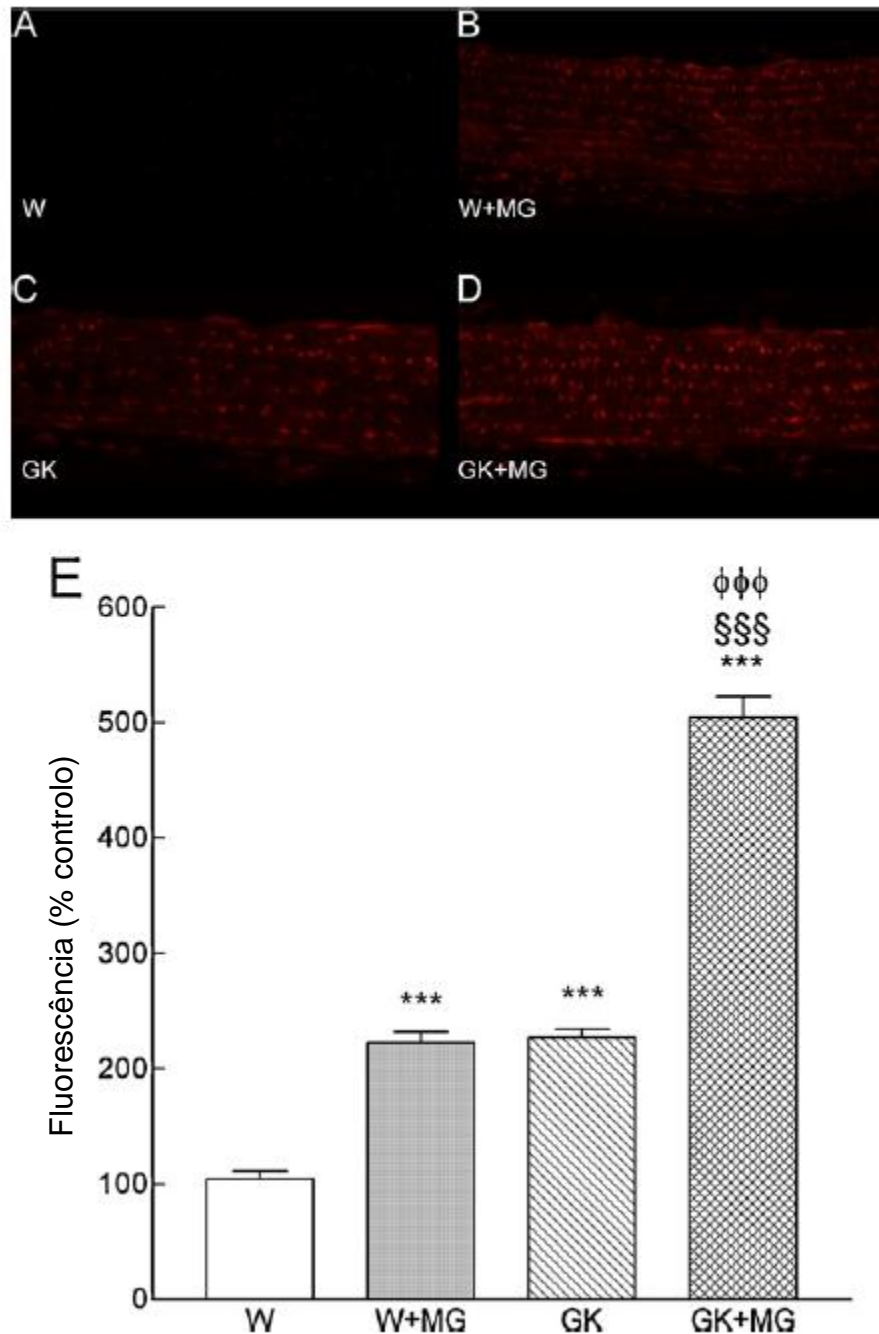


Figura 11. Localização, por imunofluorescência, do anião superóxido na parede da aorta de ratos Wistar (W, painel A), Wistar com MG (W+MG, painel B), GK (painel C) e GK com MG (GK+MG, painel D). No painel E está representada a avaliação quantitativa da imunofluorescência do brometo de etídio nos diferentes grupos de animais. Média \pm epm ***p < 0.001 vs ratos W; §§§p < 0.001 vs grupo W+MG; φφφ p < 0.001 vs rato GK controlo.

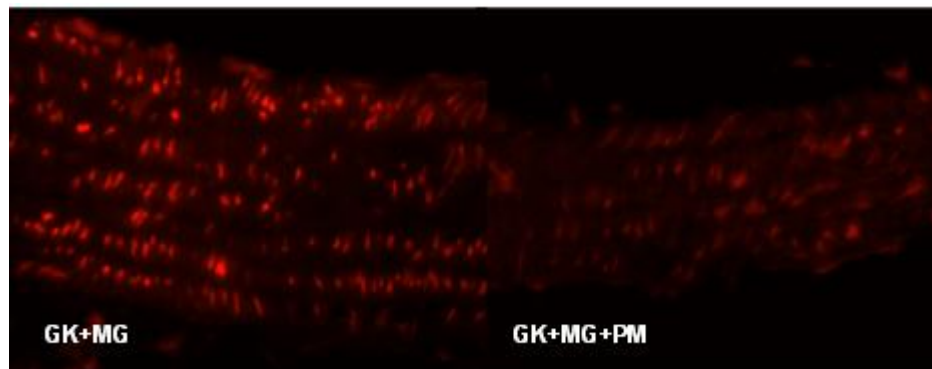


Figura 12. Efeitos da piridoxamina na localização, por imunofluorescência, do anião superóxido na parede da aorta de ratos GK tratados com MG.



DISCUSSÃO

Neste estudo, a administração de metilglioxal induziu disfunção endotelial nos ratos Wistar e agravou a disfunção endotelial nos ratos GK, aumentou os níveis de AGEs e o *stress* oxidativo nos ratos Wistar e GK. Observou-se, ainda, um aumento dos níveis de RAGE nos ratos GK e nos ratos Wistar tratados com MG. O tratamento com piridoxamina melhorou, em parte, os parâmetros avaliados.

Os ratos GK constituem um modelo animal espontaneamente diabético tipo 2, não obeso, insulino-resistente, com hiperglicemia crónica e hiperinsulinemia em jejum. Foi evidenciado em estudos anteriores, que estes animais apresentam disfunção endotelial aos 4 meses.⁽⁹⁾ Neste modelo animal, a redução da vasodilatação dependente do endotélio foi observada experimentalmente em anéis de aorta isolados ⁽²⁹⁾ e em artérias mesentéricas ⁽²³⁾, indicando que a disfunção endotelial associada à diabetes afeta quer vasos de resistência quer de condução, como a aorta. Estudos prévios já demonstraram que a diabetes mellitus contribui para a disfunção endotelial e o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas por mecanismos oxidativos, pró-inflamatórios e pró-ateroscleróticos.^(2, 10, 11, 12, 13)

A diabetes mellitus está associada a insuficiência renal e doença cardiovascular. A hiperglicemia, característica da diabetes mellitus, decorre com um aumento da produção e acumulação de AGEs. A presença e o aumento destes compostos estão associados a uma maior severidade de vasculopatia associada à diabetes, a uma produção aumentada de espécies reativas do oxigénio e, conseqüentemente, a um aumento dos níveis de *stress* oxidativo e de inflamação e a uma ativação excessiva de recetores RAGE que vão desencadear a ativação de uma cascata de mediadores patogénicos que irão potenciar os efeitos dos AGEs.⁽⁶⁾



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

A diabetes mellitus conduz a uma instabilidade entre a ação oxidante e antioxidante, favorecendo o lado oxidativo^(14, 15, 16), podendo ser avaliado através de marcadores de *stress* oxidativo, como o ião superóxido. O anião superóxido provoca uma menor biodisponibilidade de NO com conseqüente diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio.⁽¹⁷⁾ Neste trabalho demonstrou-se que a administração exógena de MG, a ratos Wistar, conduziu a disfunção endotelial. Outros autores observaram lesões vasculares, após tratamento com MG, o que está de acordo com os nossos resultados.^(20, 21)

O metilglioxal, um intermediário da formação dos produtos finais de glicação avançada, está associado a um aumento da produção de ROS e de AGEs e conseqüente ativação de um maior número de recetores RAGE, provocando dano tecidual, genotoxicidade e teratogenicidade.⁽¹⁸⁾ Demonstrou-se, que associado ao aumento dos níveis de *stress* oxidativo, ocorre agravamento da disfunção endotelial e aumento dos níveis de AGEs na parede da aorta com a administração deste composto em ratos GK, de acordo com o que foi anteriormente descrito por outros autores em diferentes modelos animais.^(20, 21, 22)

A elevada produção de ROS tem sido correlacionada com a redução dos níveis de NO, libertados a partir do endotélio⁽³⁰⁾, que por sua vez condiciona uma diminuição do relaxamento induzido pela acetilcolina. O tratamento com a piridoxamina melhora o relaxamento induzido pela ACh, tanto em ratos W+MG como GK+MG, sugerindo que este composto pode aumentar a biodisponibilidade de NO devido a efeitos *scavenging* de ROS.

A piridoxamina, um derivado da vitamina B6, cujo mecanismo de ação inclui: i) *scavenging* de uma variedade de carbonilos tóxicos derivados da glicose e da peroxidação lipídica derivados da degradação de açúcares e de lípidos, ii) inibição da formação de AGEs pelo bloqueio da degradação oxidativa de intermediários Amadori na reação de Maillard pela ligação de iões metálicos que catalizam a reação, iii) *trapping* de ROS.^(23, 24)



Estudos anteriores, mostraram que a administração de piridoxamina diminui os níveis de *stress* oxidativo sistémicos em modelos animais C57BL/6J.⁽²⁶⁾ Foi, também, descrito que a piridoxamina inibe a modificação de proteínas pelos produtos de peroxidação lipídica, *in vitro*.⁽²⁷⁾ Esta inibição é explicada pela capacidade da piridoxamina sequestrar intermediários carbonilo. Vários estudos demonstraram que a piridoxamina inibe a peroxidação lipídica em ratos STZ e Zucker, respetivamente.^(27, 28) No presente estudo, verificou-se uma diminuição dos níveis de *stress* oxidativo no grupo GK tratado com MG sujeito à administração de piridoxamina, o que pode ser explicado pelo fato de a piridoxamina, dada a sua capacidade de sequestrar intermediários reativos, diminuir a peroxidação lipídica.

Na diabetes mellitus tipo 2, os danos na vasodilatação podem ser associados com os níveis aumentados de AGEs. Os níveis séricos de AGEs em doentes com diabetes mellitus tipo 2 são inversamente relacionados com nível de vasodilatação dependente e independente do endotélio.⁽⁴⁾ Supõe-se que a formação de AGEs induz a formação de ROS, que por conseguinte reduz os níveis de NO, desenvolvendo-se um estado de *stress* oxidativo.⁽²⁵⁾

Considerando os estudos prévios, pretendeu-se avaliar a prevenção da disfunção endotelial com a inibição da formação de AGEs na presença da piridoxamina, de modo a preservar a produção de NO na aorta. Para tal, avaliaram-se os níveis de AGEs totais e de CML, um dos AGEs melhor caracterizado quimicamente e também um dos mais abundantes. Por sua vez, sabe-se que elevados níveis de CML estão associados a diabetes e a aterosclerose.⁽³¹⁾

Neste estudo, verificou-se que os níveis de AGEs totais e de CML são mais elevados nos animais diabéticos, o que está de acordo com o esperado,⁽³¹⁾ e que o tratamento com metilgloxal aumentou os níveis de AGEs totais e de CML em ambos os modelos animais. A administração de piridoxamina, como era previsível, diminuiu significativamente os níveis de



Daniela Sofia Lourenço Neto
Complicações Macrovasculares da Diabetes Tipo 2: Papel dos AGEs e do RAGE

AGEs totais nos animais sujeitos a esta terapêutica. Os nossos resultados estão de acordo com os de outros estudos, que demonstraram que a piridoxamina inibe a formação de CML e carboxi-etil-lisina.⁽³⁶⁾ Outros estudos observaram que a piridoxamina reage diretamente com intermediários da reação de Maillard, como o glioxal e o glicolaldeído, e inibe a formação de CML.⁽¹⁹⁾ *Stitt* e colaboradores verificaram que a piridoxamina retarda a retinopatia e a acumulação de CML na estrutura vascular da retina.⁽³³⁾

O RAGE, um recetor para AGEs, participa numa grande diversidade de patologias, como é o caso da diabetes. Assim, torna-se um alvo terapêutico atrativo no tratamento de algumas patologias a que se associa.⁽³⁷⁾ Os níveis de expressão de RAGE foram avaliados, e verificou-se uma maior expressão deste no grupo de ratos GK, relativamente ao grupo de ratos W controlo, e um aumento no grupo de ratos W tratado com metilglioxal, de acordo com o esperado. Outros estudos em modelos animais diabéticos mostraram uma elevada expressão de RAGE no endotélio vascular.⁽³⁴⁾

A piridoxamina foi proposta como inibidor da glicação e numerosos estudos têm revelado a sua excelente capacidade para inibir a formação de AGEs *in vivo*.^(24, 28) A sua administração exógena aumenta os seus níveis plasmáticos, sendo, posteriormente, excretada sem alterações metabólicas.⁽²⁸⁾ Este conjunto de propriedades associadas à sua reduzida toxicidade sugere que a piridoxamina pode ser útil para retardar a progressão das complicações vasculares associadas à diabetes.⁽⁷⁾



CONCLUSÃO

O nosso trabalho demonstrou que a diabetes mellitus tipo 2 envolve uma significativa disfunção endotelial, que se traduz por uma reduzida capacidade de vasodilatação dependente do endotélio, sendo um factor predisponente para o desenvolvimento de complicações macrovasculares. Esta disfunção está associada a aumento dos níveis de *stress* oxidativo, como o anião superóxido. Os resultados do presente estudo fornecem, ainda, evidências que nos indicam uma relação entre a disfunção endotelial observada e o aumento de AGEs na parede vascular diabética. Demonstrou-se, também, que o metilglioxal induz disfunção endotelial com características semelhantes às presentes no modelo animal diabético.

Concluimos, também, que a piridoxamina, ao diminuir os AGEs e o *stress* oxidativo, pode ter um papel importante no retardar da progressão da disfunção endotelial associada à diabetes, o que poderá estar na base do desenvolvimento de novos meios terapêuticos.



AGRADECIMENTOS

À Professora Cristina Sena, pela sabedoria e rigor que sempre me transmitiu, pela dedicação, disponibilidade, apoio, afeto e compreensão com que me acolheu, desde o 2.º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

À Professora Raquel Seiça, pela oportunidade de entrar neste projeto, pelo conhecimento, rigor, dedicação, afeto e compreensão com que me presenteou, desde o 2.º ano do Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

A todos os restantes docentes, investigadores e funcionários do Instituto de Fisiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, pela amabilidade e afeto.

Aos meus avós e aos meus pais, que foram imprescindíveis para a progressão dos meus estudos, em especial, nesta etapa tão importante e fundamental para o meu futuro.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lee ET, Keen H, Bennet PJ, Fuller JH, Lu M and WHO Multinational Study Group. Follow-up of the WHO multinational study of vascular disease in diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia* 2001; 44: 3-13.
2. De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.* 2000;130: 963-974.
3. Goh S-Y and Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 1143-1152.
4. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM and Creager MA. Vascular Injury Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic. *Circulation* 2006; 114: 597-605.
5. Jayakody L, Seneratne M, Thomson A, Kapagoda T. Endothelium-dependent relaxation in experimental atherosclerosis in the rabbit. *Circ Res.* 1987; 50: 251-264.
6. Coughlan MT, Cooper ME, Thomas MC. Can you reduce your AGE? Strategies to prevent AGE accumulations in diabetes. *Drug Discovery Today* 2007; 4: 85-92.
7. Metz TO, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003; 419: 41-40.
8. Nathan L. Alderson, Mark E. Chachich, Nancy N. Youssef, Robert J. Beatlhe, Maurice Naghtigal, Suzanne R. Thorpe, and John W. Baynes. The Age inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney International*, vol.63, 2003; 2123-2133.



9. Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakiazaki rats. *Hypertension* 2001; 37: 433-439.
10. Reis ED, Roque M, Dansky H, Fallon JT, Badimon JJ, Cordon-Cardo C. Sulindac inhibits neointimal formation after arterial injury in wild-type and apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; 97: 12764-12769.
11. AlwiShahab. Why Does Diabetes Mellitus Increase The Risk of Cardiovascular Disease? *J Intern Med.* 2006; 38: 40-51.
12. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction a comprehensive appraisal. *Cardivascular Diabetology* 2006; 5: 4-26.
13. Tabit CE, Hamburg NM, Vita J. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11: 61-74.
14. Pailosso G, Esporio R, D'Alessio MA, Barbieri M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab.* 1999; 25: 298-306.
15. Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2009; 156: 713-727.
16. Chang C, Chuang L. the role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res.* 2010; 2: 316-331.
17. Bahia L, Aguiar LG, Villela N, Bottino D, Bouskela E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50: 291-303.
18. Kalapos MP. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico Biological Interactions* 2008; 171: 251-271.



19. Voziyan PA, Metz TO, Baynes JW, Hudson BG. *J Biol Chem.* 2002; 277: 3397-3403.
20. Berlanga J, Cibrian D, Guillen I, Freyre F, Alba JS, Lopez-Saura P, et al. Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. *Clin Sci. (Lond)* 2005; 109: 83-95.
21. Brouwers O, Niessen PM, Haenen G, Miyata T, Brownlee M, Stehouwer CD, et al. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress. *Diabetologia* 2010; 53: 989-1000.
22. Desai KM, Chang T, Wang H, Banigesh A, Dhar A, Liu J, Untereiner A, Wu, L. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy? *Can. J Physiol Pharmacol.* 2010; 88: 273-284.
23. Chang KC, Liang JT, Tsai PS, Wu MS, Hsu KL: Prevention of arterial stiffening by pyridoxamine in diabetes is associated with inhibition of the pathogenic glycation on aortic collagen. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(8): 1419-1426.
24. Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine: the many virtues of a maillard reaction inhibitor. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043: 807-816.
25. Wu ET, Liang, Wu MS, Chang KC. Pyridoxamine prevents age-related aortic stiffening and vascular resistance in association with reduced collagen glycation. *Exp Gerontol.* 2011; 46(6): 482-488.
26. Hagiwara S, Gohda T, Tanimoto M, Ito T, Murakoshi M, Ohara I, Yamazaki T, Matsumoto M, Horikoshi S, Funabiki K, Tomino Y. Effects of pyridoxamine (K-163) on glucose intolerance and obesity in high-fat diet C57BL/6J mice. *Metabolism.* 2009; 58(7): 934-945.



27. Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, Baynes JW. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* 2003; 63(6): 2123-2133.
28. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002; 61(3): 939-950.
29. Sena CM, Nunes E, Louro T, Fernandes R, Boarder MR, Seíça RM. Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *Br J Pharmacol.* 2008; 153 (5): 894-906.
30. Lam TY, Seto SW, Lau YM, Au LS, Kwan YW, Ngai SM, Tsui KW. Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic +db/+db mice. *Eur J Pharmacol.* 2006; 546(3): 134-141.
31. Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(12): 1708-1716.
32. Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci.* 2009; 116(8): 621-637.
33. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes.* 2002; 51(9): 2826-2832.
34. Hudson BI, Hofmann MA, Bucciarelli L, Wendt T, Moser B, Lu Y, Qu W, Stern DM, D'Agati Yan SD, Yan SF, Grant PJ, Schmidt AM. Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Current Science.* 2002; 83(12): 1515-1521.



- 35.** Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A, Biemel KM, Lederer MO, Padayatti PS. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys* 2002; 402(1): 110-119.
- 36.** Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an Inhibitor of Advanced Glycation Reactions, Also Inhibits Advanced Lipoxidation Reactions. *J Biol Chem*, 2000; 275(28): 21177-21184.
- 37.** Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *J Faseb*, 2008; 22(10): 3716-3727.