

***Efeitos do Metilglioxal e da Piridoxamina na bioenergética e  
no estado redox das mitocôndrias de cérebro de rato***

Ricardo Marinho<sup>1</sup>, Susana Cardoso<sup>2,3</sup>, Cristina Carvalho<sup>2,3</sup>, Anabel Simões, Emanuel Candeias<sup>3</sup>, Raquel M. Seça<sup>4,5</sup>, Cristina M. Sena<sup>4,5</sup>, Paula I. Moreira<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, <sup>2</sup> Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, <sup>3</sup> Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, <sup>4</sup> Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, <sup>5</sup> Instituto Biomédico de Investigação de Luz e de Imagem (IBILI), Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

# Índice

Índice.....	2
Índice de Ilustrações.....	3
Índice de Tabelas.....	3
Índice de Abreviaturas .....	4
Resumo.....	6
Abstract .....	8
Introdução.....	10
Materiais e Métodos .....	12
Resultados .....	19
Discussão.....	25
Agradecimentos.....	32
Bibliografia.....	33

## **Índice de Ilustrações**

Figura 1 - Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina na cadeia respiratória. ....	21
Figura 2 - Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina no sistema fosforilativo.....	22
Figura 3 - Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina no estado oxidativo .....	23
Figura 4- Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina nas defesas antioxidantes não enzimáticas .....	24
Figura 5- Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina nas defesas antioxidantes enzimáticas ..	25

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 - Caracterização dos grupos experimentais.....	19
---	----

## Índice de Abreviaturas

$\varepsilon$  – coeficiente de extinção molar

$\lambda$  – comprimento de onda

ADP – difosfato de adenosina

Ag – prata

AgCl – cloreto de prata

AGEs – produtos finais de glicação avançada

ALEs – produtos finais de peroxidação lipídica avançada

ATP – trifosfato de adenosina

BSA – albumina de soro bovino

DM – diabetes mellitus

EGTA – ácido Etileno Glicol Tetracético

FELASA – “Federation of European Laboratory Animal Science Associations ”

GPx – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

GSH – glutathione

GSSG – dissulfeto de glutathione

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogénio

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – ácido fosfórico

HCl- ácido clorídrico

HClO<sub>4</sub> – ácido perclórico

HEPES – ácido 2- [4- (2-hidroxiethyl) 1-piperazinil] -etanosulfónico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

ICR – índice de controlo respiratório

KCl – cloreto de potássio

KCN – cianeto de potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – fosfato monopotássico  
KOH – hidróxido de potássio  
Log – logaritmo  
MDA – malondialdeído  
MG – metilglioxal  
 $\text{MnCl}_2$  – cloreto de manganês  
MnSOD – superóxido dismutase dependente de manganês  
NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina  
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  – fosfato monossódico  
NaOH – hidróxido de sódio  
NBT – nitro-tetrazólio  
 $\text{O}_2^{\cdot-}$  – radical superóxido  
OPT – o-ftalaldeído  
PM – piridoxamina  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
rpm – rotações por minuto  
SEM – erro padrão da média  
TBA – ácido tiobarbitúrico  
 $\text{TPP}^+$  – catião lipofílico tetrafenilfosfônio  
Tris – tris(hidroximetil)aminometano  
U – unidade  
UV – radiação ultravioleta  
VIS – radiação visível  
 $\alpha$  – tocoferol – vitamina E  
 $\Delta\Psi_m$  – potencial transmembranar

## Resumo

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são formados a partir da reação não enzimática entre açúcares redutores e grupos amina de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. Os AGEs estão implicados na patogénese da diabetes e das complicações e no processo fisiológico do envelhecimento, sendo o metilglioxal (MG) um dos principais intermediários dos AGEs. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da administração crónica de MG e do tratamento com piridoxamina (PM), um derivado da vitamina B6 com capacidade de inibir a glicação, na bioenergética e no estado oxidativo das mitocôndrias de cérebro. Para tal, foram criados 4 grupos de ratos: 1) ratos Wistar controlo; 2) ratos Wistar tratados com MG, por via oral, durante 10 semanas (50 mg MG/Kg peso corporal/dia nas primeiras 6 semanas e 60 mg MG/Kg peso corporal/dia nas últimas 4 semanas); 3) ratos tratados com MG (protocolo anterior) e, posteriormente, tratados com 1g/l PM, por via oral, durante 4 semanas e 4) ratos Wistar tratados apenas com 1g/l PM, por via oral, durante 4 semanas. Findo os períodos de tratamento, os animais foram sacrificados e as mitocôndrias de cérebro isoladas. Avaliámos vários parâmetros mitocondriais: a cadeia respiratória [estados 3 e 4 da respiração, índice de controlo respiratório (ICR), e razão ADP/O], o sistema fosforilativo [potencial transmembranar ( $\Delta\Psi_m$ ), despolarização induzida pelo APD, tempo de repolarização e níveis de ATP], a atividade da aconitase mitocondrial e das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), os níveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), de malondialdeído (MDA; marcador de peroxidação lipídica) e de glutathione e vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (antioxidantes não enzimáticos). O tratamento com MG provocou um decréscimo significativo do ICR, da razão ADP/O e das atividades da aconitase e GR e aumentou os níveis de  $H_2O_2$ . O tratamento com

PM não contrariou os efeitos deletérios do MG e, além disso, a PM levou a um decréscimo significativo do  $\Delta\Psi_m$  e do ICR. Por outro lado, a administração da PM a ratos controle diminuiu significativamente a atividade da aconitase mitocondrial e os níveis de MDA e aumentou a razão ADP/O, a despolarização induzida pelo ADP, os níveis de  $\alpha$ -tocoferol e as atividades da GPx e MnSOD. Não foram observadas alterações significativas nos outros parâmetros analisados. Concluindo, os nossos resultados mostram que níveis elevados de MG têm efeitos deletérios na função e estado oxidativo das mitocôndrias de cérebro e que a PM foi incapaz de reverter os efeitos do MG.

Palavras-chave: Diabetes; mitocôndrias de cérebro; metilglioxal, *stress* oxidativo, piridoxamina

## Abstract

Advanced glycation end products (AGEs) are originated by a non-enzymatic reaction between reducing sugars and amino groups of proteins, lipids and nucleic acids. AGEs are involved in aging, age-related diseases and diabetes-associated complications, methylglyoxal (MG) being an important precursor in AGEs formation. This study was intended to investigate the effects of chronic administration of MG and treatment with pyridoxamine (PM), a powerful glycation inhibitor that belongs to vitamin B6 family, on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative status. For that purpose, 4 groups of rats were created: 1) a group of control Wistar rats; 2) a group of Wistar rats orally treated with MG during 10 weeks (first 6 weeks with 50 mg MG/Kg body weight/day and the last 4 weeks with 60 mg MG/Kg body weight/day); 3) a group of Wistar rats treated with MG (same protocol as before) and then orally treated with 1g/l of PM during 4 weeks and 4) Wistar rats treated only with 1g/l of PM during 4 weeks. After the treatment periods, the animals were sacrificed and the brain mitochondrial fractions were obtained. We evaluated several mitochondrial parameters: the respiratory chain [states 3 and 4 of respiration, respiratory control ratio (RCR), and ADP/O index], the phosphorylation system, [transmembrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), ADP-induced depolarization, repolarization lag phase and ATP levels], the activity of mitochondrial aconitase and antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and manganese superoxide dismutase (MnSOD), the levels of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), malondialdehyde (MDA), and glutathione and vitamin E ( $\alpha$ -tocoferol) (non-enzymatic antioxidants). MG treatment induced a statistical significant decrease in RCR, ADP/O index and activity of aconitase and GR and an increase in  $H_2O_2$  levels. The administration of PM to MG-treated rats did not counteract those effects and, additionally,



promoted a significant decrease in  $\Delta\Psi_m$  and RCR. Furthermore, its administration to the control group caused a significant decrease in the activity of aconitase, in MDA levels and significantly increased ADP/O index,  $\alpha$ -tocopherol levels and the activity of both GPx and MnSOD. No statistically significant changes were observed in the other parameters analysed. In conclusion, our results show that chronic exposure to MG had deleterious effects in the function and oxidative status of brain mitochondria, and that PM was unable to reverse the effects of MG.

Keywords: Diabetes, brain mitochondria, methylglyoxal, oxidative *stress*, pyridoxamine

## Introdução

A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica, crónica e heterogénea, caracterizada por hiperglicemia, resultante do défice na secreção de insulina pelo pâncreas, resistência à ação da insulina ou ambos, podendo este défice ser herdado ou adquirido. A DM está associada a um aumento da morbidade e da mortalidade dos doentes por estar na origem de várias complicações: 1) a nível vascular, podendo ser microvasculares, como a retinopatia e nefropatia diabéticas<sup>1</sup> e isquémia das extremidades, ou macrovasculares, que estão associados à aterosclerose, podendo levar ao enfarte do miocárdio e a acidentes vasculares cerebrais<sup>2</sup>; 2) a nível do sistema nervoso periférico, podendo levar à neuropatia diabética; bem como a nível central, aumentando o risco para o desenvolvimento de demências, nomeadamente das demências vascular e de Alzheimer<sup>3</sup>.

A DM caracteriza-se por anomalias da função mitocondrial em vários órgãos, nomeadamente no cérebro<sup>4</sup>. As mitocôndrias são organelos extremamente importantes para os neurónios uma vez que produzem a maior parte da energia necessária ao normal funcionamento destas células<sup>5</sup>. Contudo, associada a esta produção de energia, há também a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS – *reactive oxygen species*) cujo excesso, em condições fisiológicas, é neutralizado pelas defesas antioxidantes das células. No entanto, perturbações a nível mitocondrial podem levar a falência energética, *stress* oxidativo e ativação de vias de morte celular<sup>6</sup>. As complicações da DM resultam das condições adversas provocadas pela hiperglicemia e potenciam fenómenos de *stress* oxidativo, cuja ocorrência se poderá dever à ativação de 4 vias: a via dos polióis, a via da proteína cinase C, a via das hexosaminas e a via dos produtos finais de glicação avançada (AGEs – *advanced glycation end products*)<sup>6</sup>.

Os AGEs são compostos heterogêneos e complexos que interagem com várias biomoléculas incluindo constituintes sanguíneos, enzimas e moléculas biologicamente ativas. Endogenamente, os AGEs são formados pelo processo de glicação onde açúcares reduzidos reagem não enzimaticamente com grupos amina livres presentes em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos formando as bases de Schiff que, por sua vez, levam à formação de produtos de Amadori e posteriormente aos AGEs<sup>7</sup>. Os precursores dos AGEs, o glioxal e o metilglioxal (MG), encontram-se em níveis aumentados no plasma e em vários tecidos em doentes diabéticos. Estudos prévios também mostraram que o MG atua a morte celular por apoptose em neurónios do hipocampo, via recetor Fas e via mitocondrial<sup>8</sup>, e que o declínio cognitivo está positivamente correlacionado com os níveis elevados de MG no plasma<sup>9</sup>. Além disso, estudos mostram níveis elevados de MG e glioxal no líquido cefalorraquidiano de indivíduos com doença de Alzheimer bem como níveis elevados das enzimas glioxalase 1 e 2, que têm um papel chave na destoxificação destes produtos<sup>10</sup>.

Existem vários agentes que têm a capacidade de impedir a formação dos AGEs, destacando-se de entre eles a piridoxamina (PM), uma das três formas naturais que derivam da vitamina B6, e um intermediário crítico nas reações de transaminação efetuadas por enzimas dependentes de vitamina B6<sup>11</sup>. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a PM inibe a produção do radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), reduz a peroxidação lipídica e a glicação e aumenta a atividade da  $(Na^+-K^+)$ -ATPase em hemácias expostas a níveis elevados de glicose<sup>12</sup>, diminuindo substancialmente os níveis séricos de compostos carbonilo reativos, tais como o glioxal e o MG<sup>13</sup>. Outros estudos mostraram que indivíduos diabéticos apresentam uma deficiência em PM<sup>14</sup>, e que suplementos de vitamina B6 são benéficos na prevenção da neuropatia<sup>15</sup> e da retinopatia diabéticas<sup>16</sup>.

Face a estes dados, os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o efeito do MG na bioenergética e no *status* oxidativo de mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos Wistar e; 2)

avaliar o potencial efeito protetor da PM a nível das mitocôndria de cérebro. Desta forma, analisámos vários parâmetros: a cadeia respiratória (estados 3 e 4 da respiração, índice de controlo respiratório (ICR) e razão ADP/O); o sistema fosforilativo [potencial transmembranar ( $\Delta\Psi_m$ ), despolarização induzida pelo ADP, tempo de repolarização e níveis de ATP]; níveis de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutathionas e malondialdeído (MDA) e atividade das enzimas aconitase mitocondrial, glutathion redutase (GR), glutathion peroxidase (GPx) e superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD).

## **Materiais e Métodos**

**Reagentes-** O MG (2-oxopropanal) e a PM foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os reagentes usados neste trabalho eram do maior grau de pureza disponível comercialmente.

**Tratamentos dos animais** - Ratos Wistar machos foram mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, em condições de luz (ciclo de 12 h dia/noite) e humidade controladas e com acesso livre a água e ração. Os ratos, com 12 semanas de idade, foram tratados, por via oral, com MG durante 10 semanas; nas primeiras 6 semanas, cada animal ingeriu 50 mg MG/kg peso corporal/dia e nas restantes 4 semanas 60 mg de MG/kg peso corporal/dia. Após o tratamento com MG, os animais foram divididos em 2 grupos: 1) os animais foram tratados, por via oral, com 1g/l de PM durante 4 semanas; 2) animais não tratados com PM. Além destes 2 grupos de animais, também foram feitos estudos em ratos Wistar controlo e ratos Wistar expostos a 1g/l de PM durante 4 semanas. Os animais foram sacrificados com 26 semanas de idade. A manipulação e o sacrifício dos animais seguiram os

procedimentos aprovados pela “Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)”.

**Determinação da glicemia** - Os níveis de glicose foram avaliados no sangue da veia da cauda usando um glicómetro comercial (Glucometer-Elite, Bayer, Portugal).

**Isolamento das mitocôndrias de cérebro** – As mitocôndrias foram isoladas dos cérebros dos ratos usando o método de Moreira et al.<sup>17,18</sup>, com algumas modificações. Resumidamente, o rato foi decapitado e todo o cérebro, exceto o cerebelo, foi rapidamente removido, lavado e homogeneizado, a 4°C, em 10 ml de meio de isolamento (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 5 mM HEPES [ácido 2- [4- (2-hidroxietil) 1-piperazinil] –etanosulfónico], 1 mM EGTA [ácido etileno glicol tetracético], 1 mg/ml BSA [albumina de soro bovino], pH 7.4) contendo 5 mg de protease bacteriana tipo VIII (Subtilisina). Adicionou-se meio de isolamento aos homogeneizados de cada cérebro, até atingir os 30 ml, e foram centrifugados a 2500 rpm (Centrífuga Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed) durante 5 min. O “pellet” (sedimento), incluindo os sinaptossomas, foi ressuspensionado em 10 ml de meio de isolamento contendo 0.02% de digitonina e centrifugado a 10000 rpm durante 10 min. Após a centrifugação, o “pellet” castanho contendo as mitocôndrias (sem a camada de sinaptossomas) foi ressuspensionado em 10 ml do meio de isolamento e centrifugado a 10000 rpm durante 5 min. O novo “pellet” foi ressuspensionado em 10 ml de meio de lavagem (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 5 mM HEPES, pH 7.4) e centrifugado a 10000 rpm durante 5 min. O “pellet” mitocondrial final foi ressuspensionado em 150 µl de meio de lavagem e a concentração da fração mitocondrial foi determinada através do método de Biureto, calibrado com BSA<sup>19</sup>.

**Avaliação da cadeia respiratória mitocondrial** - O consumo de oxigénio pelas mitocôndrias foi registado com um eléctrodo de oxigénio do tipo Clark<sup>20</sup>, ligado a um registador, numa câmara fechada com agitação magnética e temperatura constantes. As reacções decorreram a

30 °C, em 1 ml do meio de reação (100 mM sacarose, 100 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM HEPES e 10 μM EGTA, pH 7.4) com 0.8 mg de proteína. O estado 3 da respiração (consumo de oxigênio na presença de substrato e ADP) foi iniciado com a adição de ADP (75 nmol/mg proteína). Os estados 3 e 4 (consumo de oxigênio depois da fosforilação do ADP) da respiração, o índice de controlo respiratório (ICR = estado 3 / estado 4) e a razão ADP/O (um indicador da capacidade das mitocôndrias em manter o consumo de oxigênio acoplado à fosforilação do ADP durante o estado 3 da respiração) foram determinados de acordo com Chance e Williams<sup>21</sup>.

**Avaliação do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )** – O  $\Delta\Psi_m$  foi monitorizado através da distribuição transmembranar do catião lipofílico tetrafenilfosfônio (TPP<sup>+</sup>) com um eletrodo seletivo para TPP<sup>+</sup> preparado de acordo com Kamo et al.<sup>22</sup>. Um eletrodo saturado de Ag/AgCl (Tacussel, model MI 402) foi usado como eletrodo de referência. A entrada do TPP<sup>+</sup> na mitocôndria foi avaliada pelo decréscimo da concentração de TPP<sup>+</sup> no meio de reação. A diferença de potencial entre o eletrodo seletivo e o de referência foi medida com um eletrómetro e registada continuamente (Linear 1200 recorder). A resposta da voltagem do eletrodo para log [TPP<sup>+</sup>] foi linear com um desvio de 59±1, estando de acordo com a equação de Nernst. As reações ocorreram numa câmara fechada com agitação magnética contendo 1 ml de meio de reação (100 mM de sacarose, 100 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 μM EGTA, 5 mM HEPES, pH7.4) com 3 μM de TPP<sup>+</sup>. Esta concentração de TPP<sup>+</sup> foi escolhida de forma a atingir uma elevada sensibilidade nas medições e evitar possíveis efeitos tóxicos nas mitocôndrias<sup>23</sup>. O  $\Delta\Psi_m$  foi estimado usando a seguinte equação:  $\Delta\Psi_m$  (mV) = 59 log(v/V) - 59 log(10ΔE/59-1)<sup>22,24</sup> onde v, V, e ΔE representam o volume da mitocôndria, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial do eletrodo em relação à linha de base, respetivamente. Esta equação foi derivada assumindo que a distribuição do TPP<sup>+</sup> entre as mitocôndrias e o meio de reação segue a equação de Nernst, e que a lei de conservação de

massa é aplicável. Assumiu-se que o volume da matriz mitocondrial era de 1.1  $\mu\text{l}/\text{mg}$  proteína e não foram feitas correções para a contribuição da ligação passiva do  $\text{TPP}^+$  às membranas mitocondriais, uma vez que o objetivo desta experiência era mostrar diferenças relativas no potencial e não valores absolutos. Desta forma, antecipamos um ligeiro aumento nos valores de  $\Delta\Psi\text{m}$ . Contudo, este aumento só é significativo no caso de o valor de  $\Delta\Psi\text{m}$  ser inferior a 90 mV, portanto, distante das nossas medições. As mitocôndrias (0.8 mg/ml) foram energizadas com 5 mM succinato (substrato do complexo II da cadeia respiratória) na presença de 2  $\mu\text{M}$  rotenona (inibidor do complexo I da cadeia respiratória). Após a estabilização da distribuição do  $\text{TPP}^+$ , (aproximadamente 1 min de registo), as flutuações de  $\Delta\Psi\text{m}$  foram registadas.

**Determinação dos níveis dos nucleótidos de adenina** – No final de cada medição de  $\Delta\Psi\text{m}$ , 250  $\mu\text{l}$  de cada amostra foram centrifugados a 14000 rpm (Centrifugadora de Eppendorf 5415C) durante 2 minutos com 250  $\mu\text{l}$  de 0.3 M de  $\text{HClO}_4$ . Os sobrenadantes foram neutralizados com 10 M KOH em 5M Tris (tris(hidroximetil)aminometano) e novamente centrifugados a 14000 rpm durante 2 minutos. Nestes sobrenadantes foram quantificados os nucleótidos de adenina usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi usado o sistema Beckman-System Gold, modelo 126 de bombas binárias e modelo 166 de detetores de UV controlados por um computador. Foi utilizada a coluna Lichrospher 100 RP-18 (5 $\mu\text{l}$ ) da Merck e as leituras foram feitas com  $\lambda=254$  nm. Foi feita uma eluição isocrática com 100 mM de tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 6.5) e 1.2% metanol e com um fluxo de 1ml/min. O tempo necessário para cada análise foi de 5 minutos. Os nucleótidos de adenina foram identificados pelo seu comportamento cromatográfico (tempo de retenção, espectro de absorção e correlação com padrões)

**Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)** - Os níveis de MDA foram determinados por HPLC<sup>25</sup>. A cromatografia líquida foi feita num aparelho HPLC da Gilson com uma coluna de fase reversa (RP18 Spherisorb, S5 OD2). As amostras foram eluídas a partir da coluna com fluxo = 1ml/min e a leitura foi feita a  $\lambda=532$  nm. A concentração de MDA nas amostras foi calculada recorrendo a uma curva padrão preparada com o complexo MDA-ácido tiobarbitúrico (TBA) e expressa em mmol/mg de proteína.

**Determinação da atividade da aconitase** - A atividade da aconitase foi determinada de acordo com Krebs e Holzach<sup>26</sup>. Resumidamente, a fração mitocondrial (200  $\mu$ g) foi diluída em 0.6 ml de tampão contendo 50 mM Tris-HCl e 0.6 mM MnCl<sub>2</sub> (pH 7.4) e sonicada durante 10 segundos. A atividade da enzima foi avaliada num espectrofotômetro (Jasco V560 UV/VIS Spectrophotometer) a  $\lambda=240$  nm, a 25°C, na presença de 20 mM isocitrato. A atividade da enzima foi calculada usando um coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ )=3.6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressa em U/mg proteína/min. Definiu-se como uma unidade (U) a quantidade de enzima necessária para produzir 1 $\mu$ M de *cis*-aconitato por minuto.

**Avaliação dos níveis de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** - Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram avaliados por fluorimetria, seguindo o método descrito por Barja<sup>27</sup>. Resumidamente, 0.2 mg de mitocôndrias foram incubadas a 37°C com 10 mM de succinato em 1.5 ml de tampão fosfato, pH 7.4, contendo 0.1 mM EGTA, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 145 mM KCl, 30 mM Hepes, 0.1 mM ácido homovanílico e 6 U/ml peroxidase de rábano. Após 15 minutos, a reação foi terminada com 0.5 ml de solução “stop” fria (0.1 M glicina, 25 mM EDTA-NaOH, pH 12). As leituras foram feitas a um  $\lambda$  de excitação = 312 nm e  $\lambda$  de emissão =420 nm. Os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram calculados usando uma curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e expressos em pmol/mg proteína/15min.



**Determinação dos níveis de glutathiona (GSH) e de dissulfeto de glutathiona (GSSG)** – Os níveis de GSH e GSSG foram determinados por fluorescência depois da reação do sobrenadante contendo  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -EDTA ou  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , respectivamente, da solução homogeneizada e desproteïnizada com o-ftalaldeído (OPT), pH 8.0, de acordo com Hissin e Hilf<sup>28</sup>. Resumidamente, as mitocôndrias de cérebro (0.5 mg) foram ressuspensas em 1.5 ml de tampão fosfato (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM EDTA, pH 8.0) e 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  4.5% e rapidamente centrifugadas a 50000 rpm (Ultracentrífuga Beckman, TL-100) durante 30 minutos. Para a determinação da GSH, 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante foram adicionados a 1.8 ml de tampão fosfato e 100  $\mu\text{l}$  de OPT. Após a mistura cuidadosa dos componentes e incubação a temperatura ambiente durante 15 minutos, a solução foi transferida para uma cuvete de quartzo e a fluorescência foi avaliada a  $\lambda$  de emissão = 420 nm e  $\lambda$  de excitação = 350 nm. Relativamente ao GSSG, 250  $\mu\text{l}$  de sobrenadante foram adicionados a 100  $\mu\text{l}$  de N-etilmaleimida e incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos. Depois da incubação, 140  $\mu\text{l}$  da solução foram adicionados a 1.76 ml de tampão NaOH (100 mM) e 100  $\mu\text{l}$  de OPT. Após mistura e nova incubação a temperatura ambiente durante 15 minutos, a solução foi transferida para uma cuvete de quartzo e a fluorescência foi avaliada a  $\lambda$  de emissão = 420 nm e  $\lambda$  de excitação = 350 nm. Os níveis de GSH e GSSG foram determinados a partir de comparações com curvas padrão para GSH e GSSG.

**Avaliação dos níveis de vitamina E-** Os níveis de vitamina E ( $\alpha$  – tocoferol) das mitocôndrias foram avaliados por HPLC, como previamente descrito por Vatassery e Younoszai<sup>29</sup>. Resumidamente, 0.5 mg de mitocôndrias foram adicionadas a 1.5 ml de dodecil sulfato de sódio (SDS) (10 mM) e 2 ml de etanol. Posteriormente, foram adicionados 2 ml de hexano e 50  $\mu\text{l}$  de KCl (3M), e a mistura foi agitada durante cerca de 3 minutos. O extrato foi centrifugado a 2000 rpm (Centrífuga refrigerada Sorvall RT6000) e 1 ml da fase superior,

contendo n-hexano (camada de n-hexano), foi recuperado e desidratado sob uma corrente de N<sub>2</sub> e mantida a -80°C. Posteriormente, o extrato foi diluído em n-hexano, e o conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol foi avaliado com o recurso a HPLC de fase reversa. Uma coluna de Spherisorb S10w (4.6 x 200 nm) foi eluída com n-hexano modificado com 0.9% de metanol, a um fluxo de 1.5 ml/min. A leitura foi feita com um detetor UV a 287 nm. Os níveis de vitamina E foram expressos em mmol/mg proteína.

**Quantificação da atividade da glutatona redutase (GR)** – Para quantificar a atividade da GR, 0.1 mg de cada amostra foram incubadas, durante 1 minuto, com 0.2 mM de tampão fosfato (contendo 0.2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 2 mM EDTA, pH 7.0) e 2 mM NADPH. A leitura foi feita com  $\lambda=340$  nm e iniciada com a adição de 20 nM de GSSG, a 30° C, numa câmara de agitação magnética, durante 4 minutos, e comparada com um “branco” preparado sem GSSG, usando um espectrofotômetro Jasco V560 UV/VIS<sup>30</sup>. A atividade da GR foi determinada usando um  $\epsilon=6220$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressa em mmol/min/mg proteína.

**Quantificação da atividade da glutatona peroxidase (GPx)** – A atividade da GPx foi determinada por espectrofotometria, de acordo com Flohé<sup>31</sup>. Resumidamente, a atividade da GPx foi medida após uma incubação de 5 minutos, no escuro, de 0.1 mg de cada amostra com 0.5 mM de tampão fosfato (0.25 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.5 mM EDTA, pH 7.0), 0.5 mM EDTA, 1 mM GSH e 2.4 U/ml GR. A leitura iniciou-se após a adição de 0.2 mM NADPH e 1.2 mM hidroperóxido de terc-butilo, a 30° C, numa câmara com agitação magnética, durante 5 minutos, num espectrofotômetro Jasco V560 UV/VIS. A atividade da GPx foi determinada usando um  $\epsilon= 6220$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e expressa em mmol/min/mg proteína

**Quantificação da atividade da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD)**  
– A atividade da MnSOD foi quantificada por espectrofotometria usando um  $\lambda=550$ nm, de

acordo com Flohé e Günzler<sup>32</sup>. A amostra (0.1 mg) foi incubada com 0.07 mM de hipoxantina, 0.025 Triton X-100, 0.1 mM azul de nitro-tetrazólio (NBT) e 1.33 mM KCN, a reação foi iniciada com a adição de 0.025 U/ml de xantina oxidase. A leitura decorreu durante 3 minutos, a 25°C, numa câmara com agitação magnética. As medições foram efetuadas num espectrofotómetro Jasco V560 UV/VIS, contra um “branco” preparado na ausência de hipoxantina. A atividade da MnSOD foi calculada usando uma curva padrão, preparada com diferentes concentrações de SOD.

**Análise estatística** - Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) do número de experiências indicado. A significância estatística foi determinada usando o teste ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* Tukey-Kramer, para comparações múltiplas. Um valor  $p < 0.05$  é considerado estatisticamente significativo.

## Resultados

### *Caracterização dos animais*

Os tratamentos com MG e/ou PM não provocaram alterações significativas no peso corporal, peso do cérebro e na glicemia em jejum (Tabela 1).

**Tabela 1** - Caracterização dos grupos experimentais.

	<b>Controlo</b>	<b>PM</b>	<b>MG</b>	<b>MG+PM</b>
<b>Peso Corporal (g)</b>	429.6 $\pm$ 17.2	484.3 $\pm$ 21.7	431.2 $\pm$ 17.8	432.6 $\pm$ 11.9
<b>Peso do Cérebro (g)</b>	2.0 $\pm$ 0.03	2.05 $\pm$ 0.02	2.00 $\pm$ 0.03	1.99 $\pm$ 0.03
<b>Glicemia em Jejum (mg/dl)</b>	63.3 $\pm$ 1.0	67.1 $\pm$ 2.4	62.9 $\pm$ 1.5	64.3 $\pm$ 2.0

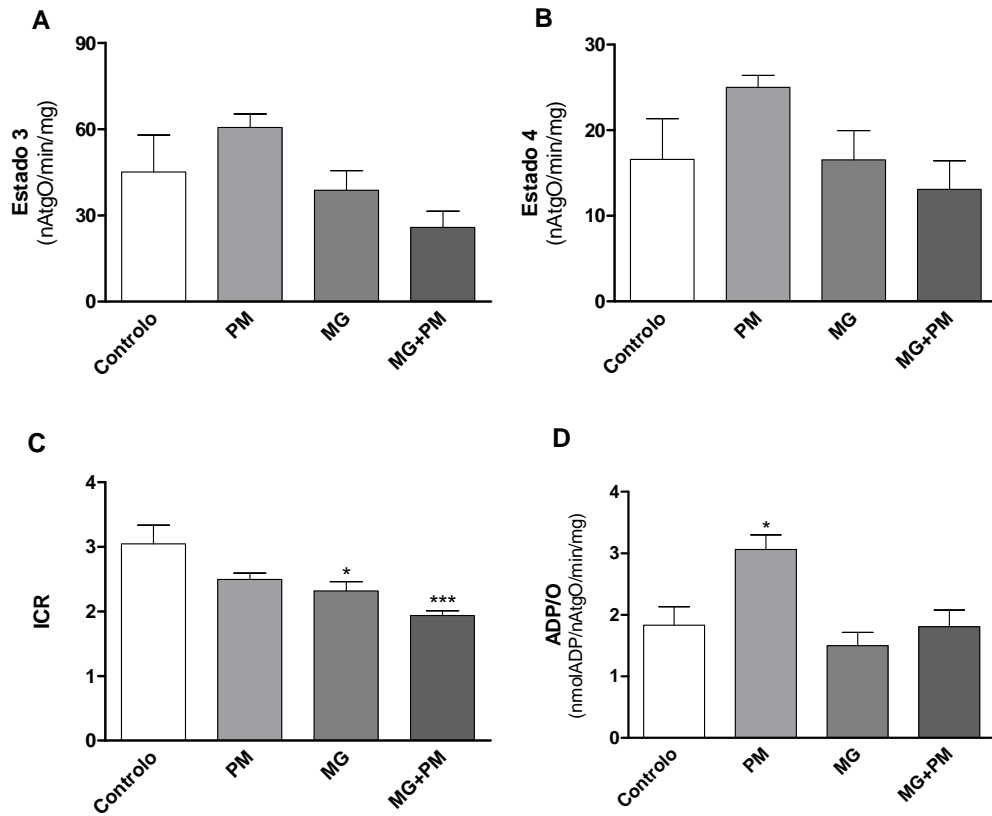
Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 7-12 animais/grupo experimental. PM – piridoxamina; MG – metilglioxal

*Efeitos do MG e/ou da PM na cadeia respiratória e no sistema fosforilativo das mitocôndrias do cérebro*

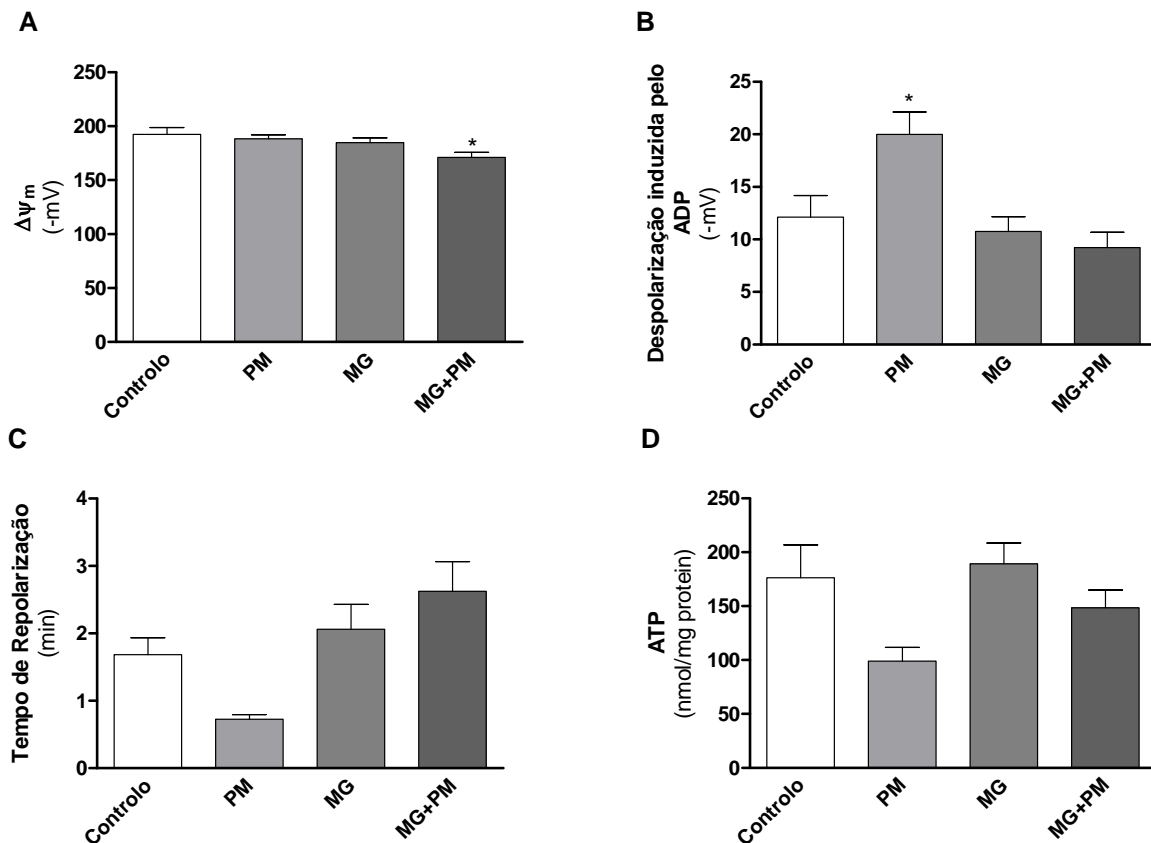
A cadeia respiratória mitocondrial bombeia prótons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranar. O acoplamento da transferência de elétrons, através dos complexos mitocondriais, com o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar gera uma força motriz, que é uma combinação de um gradiente elétrico ( $\Delta\Psi_m$ ) e um gradiente químico ( $\Delta pH$ ). O  $\Delta\Psi_m$  é essencial para a fosforilação oxidativa, cujo resultado é a fosforilação do ADP via ATP sintetase.

A Fig. 1 mostra que a administração do MG causou um decréscimo significativo do ICR, sendo este efeito potenciado pela PM (Fig. 1C). A PM, per se, causou um aumento significativo na razão ADP/O quando comparados com o grupo controlo (Fig. 1D). Não foram observadas alterações significativas nos estados 3 e 4 da respiração (Figs. 1A e 1B).

Relativamente aos parâmetros do sistema fosforilativo, apenas a PM provocou um aumento significativo na despolarização induzida pelo ADP, quando comparado com os animais controlo (Fig. 2B).



**Figura 1** - Efeitos do metilglioal e da piridoxamina na cadeia respiratória: estado 3 (A) e estado 4 (B) da respiração, índice de controlo respiratório (ICR) (C) e razão ADP/O (D). Significância estatística: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$  quando comparado com os ratos Wistar controlo. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 4-6 animais. PM - piridoxamina; MG - metilglioal



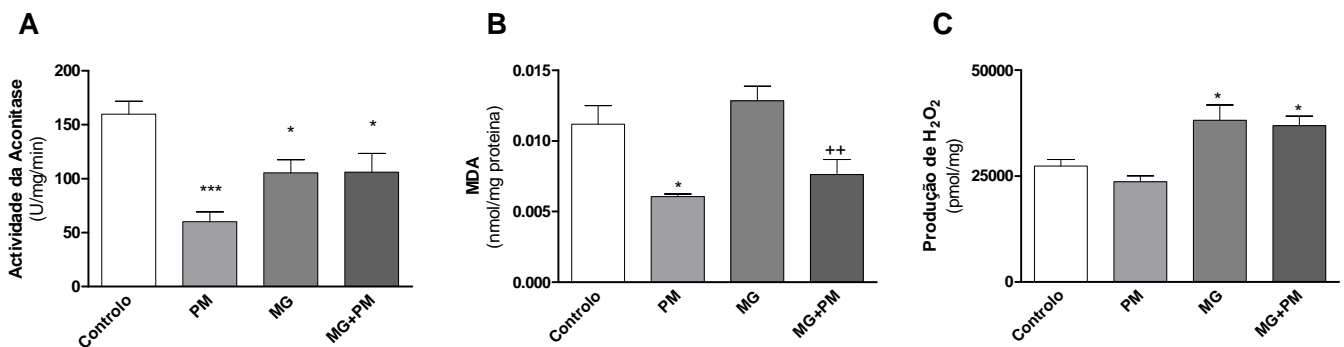
**Figura 2** - Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina no sistema fosforilativo: potencial transmembranar ( $\Delta\Psi_m$ ) (A), depolarização induzida pelo ADP (B), tempo de repolarização (C) e níveis de ATP (D). Significância estatística: \* $p < 0.05$  quando comparado com grupo controlo. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 4-6 animais. PM - Piridoxamina; MG - Metilglioxal

### *Efeitos da MG e/ou da PM no estado oxidativo das mitocôndrias de cérebro*

Dados da literatura mostram que o efeito citotóxico do MG é mediado pelas ROS culminando na morte celular por apoptose, fenómenos que estão na base de eventos neurodegenerativos<sup>33</sup>.

Tendo em conta estes dados, avaliámos o estado oxidativo das mitocôndrias dos nossos grupos experimentais. Para tal, começámos por determinar a atividade da aconitase, uma enzima mitocondrial que funciona como um sensor de ROS e espécies reativas de nitrogénio nas células, uma vez que a sua atividade é afetada pelos níveis destas espécies reativas.

Curiosamente, um decréscimo significativo na atividade desta enzima foi encontrado em todos os grupos experimentais, quando comparado com o grupo de animais controle (Fig. 3A). No entanto, o decréscimo mais acentuado foi observado no grupo de animais tratados apenas com PM. Por outro lado, ratos tratados com MG mostraram um ligeiro aumento nos níveis de MDA, um indicador de dano oxidativo dos lípidos (Fig. 3B). Além disso, a PM diminuiu significativamente os níveis de MDA nos animais expostos ao MG (Fig. 3B). No entanto, a PM não conseguiu reverter o aumento da produção de  $H_2O_2$  em ratos tratados com MG (Fig. 3C).



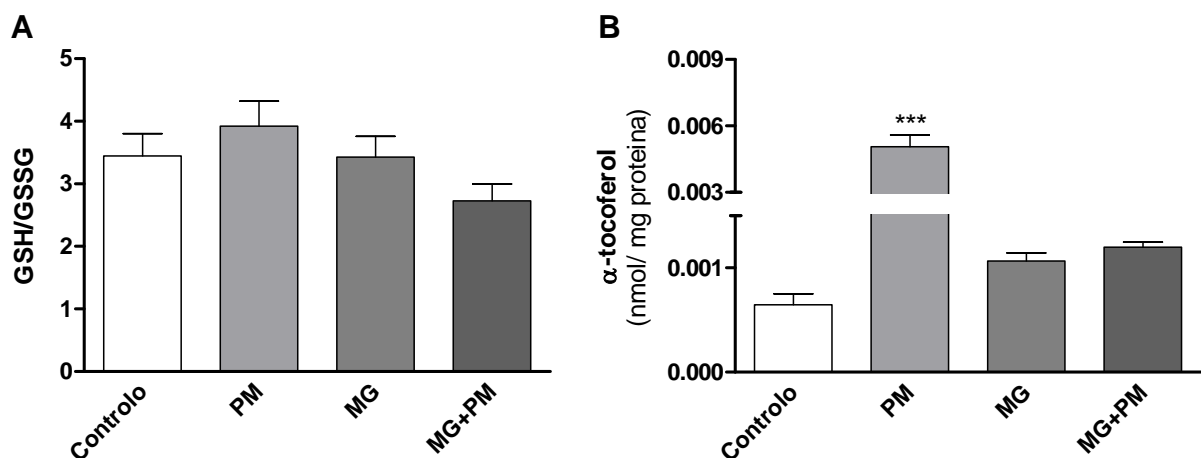
**Figura 3** - Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina no estado oxidativo das mitocôndrias de cérebro: atividade da aconitase (A), níveis de MDA (B) e produção de  $H_2O_2$  (C). Significância estatística: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$  quando comparado com ratos Wistar controle; \*\*  $p < 0.01$  quando comparado com ratos tratados com MG. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 5-6 animais. PM - piridoxamina; MG metilglioxal

### *Efeitos do MG e/ou da PM nas defesas antioxidantes das mitocôndrias de cérebro*

Para avaliar o possível efeito deletério do MG a nível das defesas antioxidantes das mitocôndrias de cérebro, começámos por analisar os níveis das defesas antioxidantes não enzimáticas (glutathione e  $\alpha$ -tocoferol) e a atividade das enzimas antioxidantes (GPx, GR e MnSOD). A Fig. 5 mostra que a razão GSH/GSSG não é significativamente afetada pela administração de MG e/ou PM (Fig. 4A), enquanto que os níveis de  $\alpha$ -tocoferol foram significativamente aumentados no grupo de animais tratados apenas com PM, e ligeiramente

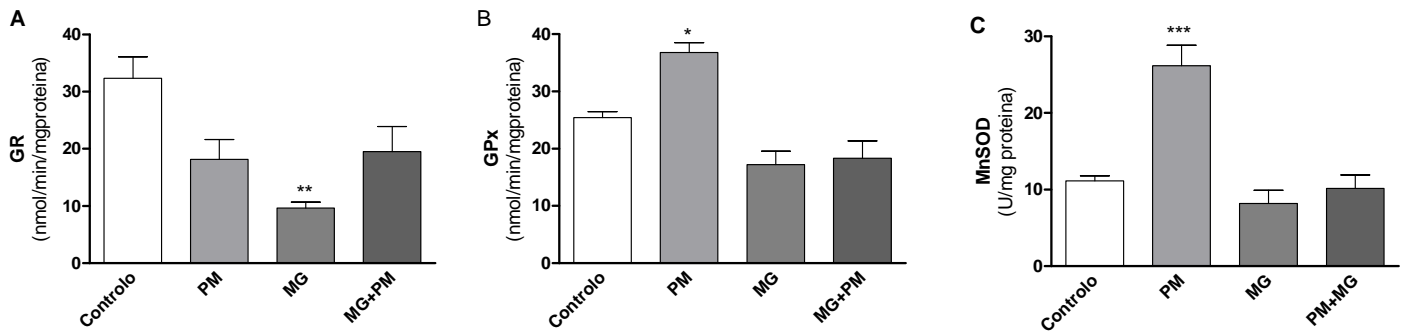
aumentados nos grupos de animais tratados com MG, quer tenham sido tratados ou não com PM (Fig. 4B).

Relativamente às enzimas antioxidantes, foi observada uma diminuição da atividade da GR em mitocôndrias de ratos tratados com MG e PM, em comparação com grupos controlo (Fig. 5A). Além disso, observou-se um ligeiro aumento da atividade de GR no grupo de ratos sujeitos a MG e tratados com PM, quando comparado com ratos expostos a MG (Fig. 5A). Relativamente à enzima GPx, observou-se um aumento significativo da sua atividade no grupo de animais tratados com PM e um ligeiro decréscimo da atividade nos animais sujeitos ao tratamento com MG, a qual permaneceu inalterada após o tratamento com PM (Fig. 5B). Nos animais tratados com PM também se observou um aumento significativo da atividade da MnSOD (Fig. 5C).



**Figura 4-** Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina nas defesas antioxidantes não enzimáticas: GSH/GSSG (A) e níveis de  $\alpha$ -tocopherol (B). Significância estatística: \*\*\*  $p < 0.001$  quando comparado com ratos controlo. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 5-8 animais. PM - piridoxamina; MG - metilglioxal





**Figura 5-** Efeitos do metilglioxal e da piridoxamina nas defesas antioxidantes enzimáticas: atividade da glutatona redutase (GR) (A), da glutatona peroxidase (GPx) (B) e da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (C). Significância estatística: \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*  $p < 0.05$  quando comparado com ratos controlo. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de 5-8 animais. PM - piridoxamina; MG - metilglioxal

## Discussão

A hiperglicemia leva a modificações químicas de biomoléculas que culminam na formação dos AGEs, os quais têm um papel preponderante na patogénese da diabetes, aterosclerose e doenças neurodegenerativas, assim como no próprio processo do envelhecimento<sup>34</sup>. De facto, vários fármacos usados no tratamento da diabetes tipo 2 têm propriedades que reduzem/impedem a formação dos AGEs. Entre os fármacos mais conhecidos encontram-se a metformina<sup>35</sup>, os antagonistas dos recetores da angiotensina II e os inibidores da enzima de conversão da angiotensina<sup>36</sup>, cujo efeito anti-AGEs tem mostrado efeitos positivos no tratamento da nefropatia diabética. A PM também já se encontra em ensaios clínicos de fase III para determinar a sua eficácia contra a nefropatia diabética.

Neste estudo, e de modo a simular a formação contínua dos AGEs que ocorre na diabetes, usámos um protocolo experimental discutido previamente por Sena e colaboradores<sup>37</sup>, onde a administração crónica de MG, por via oral, numa dose progressiva (50 mg MG/Kg de peso corporal nas primeiras 6 semanas e 60 mg MG/Kg de peso corporal nas 4 semanas seguintes), mimetiza a alegada produção contínua de MG no organismo;

evitando picos elevados de MG no plasma que estão associados a outras formas de administração como as injeções subcutânea ou intraperitoneal<sup>37</sup>.

Dos resultados obtidos, podemos inferir que níveis elevados de MG afetam a função das mitocôndrias do cérebro e levam a um desequilíbrio do estado oxidativo destes organelos. No entanto, a administração de PM em ratos tratados com MG não foi capaz de reverter os efeitos deletérios do MG.

As mitocôndrias são organelos centrais nas células eucarióticas uma vez que, além de serem responsáveis por utilizar cerca de 95% do oxigênio inspirado para gerar a maior parte do ATP celular, controlam diversos mecanismos celulares, incluindo a modulação de vias redox e dos níveis de cálcio intracelular e a morte celular<sup>38</sup>. *In vitro*, o MG afeta a função das mitocôndrias de rim levando a uma diminuição do ICR, de uma forma dependente da sua concentração<sup>39</sup>. Da mesma forma, células de neuroblastoma SH-SY5Y expostas a MG mostraram uma diminuição do potencial membranar mitocondrial e dos níveis de ATP intracelular<sup>40</sup>. Neste estudo, a administração de MG provocou um decréscimo significativo do ICR nas mitocôndrias de cérebro mas, ao contrário do que seria de esperar, o efeito não foi revertido pelo tratamento com PM (Fig. 1C). Além disso, a PM provocou um decréscimo significativo no  $\Delta\Psi_m$  das mitocôndrias isoladas de ratos tratados com MG (Fig. 2A). As alterações no  $\Delta\Psi_m$  potenciam a disfunção mitocondrial e ativam vias de morte celular<sup>41</sup>. Diretamente relacionado com a redução na produção de energia por parte da mitocôndria, o *stress* oxidativo causado por uma produção mitocondrial excessiva de ROS desempenha um papel importante nas complicações da diabetes, do envelhecimento e das doenças neurodegenerativas<sup>42</sup>. No cérebro, as ROS podem estar envolvidas em numerosas funções celulares e, dependendo dos seus níveis, tanto podem estar envolvidos na morte como na sobrevivência das células. A literatura mostra que níveis elevados de MG têm efeitos deletérios em culturas de neurónios corticais<sup>33</sup> e hipocampais<sup>43</sup> através de um mecanismo que

envolve *stress* oxidativo e produção de ROS, nomeadamente  $\text{H}_2\text{O}_2$ <sup>33</sup>. O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  são dois produtos tóxicos da respiração e metabolismo da glicose que podem causar várias lesões nas células. Neste estudo, a administração de MG também levou a um aumento significativo da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Fig. 3C), que não foi revertido pela PM (Fig. 3C). A avaliação do estado oxidativo das nossas preparações mitocondriais foi também efetuada através da análise da atividade da aconitase mitocondrial, um importante sensor de *stress* oxidativo. A exposição prolongada das mitocôndrias a oxidantes leva a uma dissociação do “cluster”  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ , que existe no centro ativo da enzima, e à consequente libertação de  $\text{Fe}^{2+}$ , carbonilação e inativação da enzima, estabelecendo-se assim uma ligação direta entre o *stress* oxidativo e a inativação da aconitase mitocondrial<sup>44,45</sup>. No nosso estudo, o tratamento com MG levou a um decréscimo significativo da atividade da aconitase das mitocôndrias de cérebro e, mais uma vez, a PM não conseguiu reverter esse efeito (Fig. 3A). Curiosamente, a administração da PM *per se* provocou uma diminuição significativa da atividade da aconitase (Fig. 3A). De acordo com a literatura, o mecanismo de ação da PM inclui a inibição da formação dos AGEs através do bloqueio da degradação oxidativa de produtos de Amadori, que resultam da reação de Maillard, a redução de produtos tóxicos derivados da degradação de glicose e de lípidos e a neutralização das ROS<sup>11</sup>. Contudo, estudos prévios também mostram que a ingestão excessiva de vitamina B6 durante grandes períodos de tempo pode ter efeitos deletérios no córtex cerebral, provocando um aumento do número de mitocôndrias danificadas, grânulos e vacúolos de lipofuscina, assim como uma diminuição da densidade sináptica<sup>46</sup>. Todavia, esta questão é controversa, com estudos demonstrando que ratos sujeitos a uma dieta deficiente em vitamina B6 apresentam perda da integridade dendrítica e edema axonal no córtex cerebral<sup>47</sup>. Em humanos, doses elevadas de um derivado da vitamina B6 (piridoxina) provocaram alterações nos testes de retenção visual e na capacidade de trabalho<sup>48</sup>. Por fim, noutros

estudos, não foi encontrado nenhum benefício da toma de vitamina B6 no que se refere a melhorias de humor ou funções cognitivas em idosos<sup>49</sup>.

O cérebro contém grandes quantidades de ferro e cobre que, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podem catalisar a formação dos radicais hidroxilo, espécies altamente reativas que podem causar graves lesões oxidativas<sup>50</sup>. O MDA, um dicarbonilo insaturado reativo, é um dos mais importantes intermediários na peroxidação lipídica, tendo a capacidade de interagir com várias macromoléculas tais como proteínas estruturais e ácidos nucleicos<sup>51</sup>. Em condições fisiológicas, a PM inibe a formação de produtos finais de peroxidação lipídica avançada (ALEs – “advanced lipoxidation end product”) através da destoxificação direta do MDA<sup>52</sup>. De facto, no nosso estudo, observámos um perfil semelhante nos ratos controlo tratados com PM quando comparado com o grupo controlo (Fig. 3B). Por outro lado, a administração do MG causou um aumento não significativo nos níveis de MDA (Fig. 3B), sendo este efeito revertido pelo tratamento com a PM (Fig. 3B), confirmando a capacidade da PM de inibir a formação de ALEs.

A exposição a radicais livres levou os organismos a desenvolverem um conjunto de mecanismos de defesa entre os quais se encontram as defesas antioxidantes<sup>50</sup>. Os nossos dados mostram que não há alterações significativas na razão GSH/GSSG entre ratos tratados com MG e o grupo controlo (Fig. 4A), apesar de haver um decréscimo significativo na atividade da GR (Fig. 5A), a enzima responsável pela regeneração da GSH. Por outro lado, um decréscimo ligeiro na razão GSH/GSSG foi encontrado no grupo de ratos tratado com MG e PM, quando comparado com o grupo de animais tratados apenas com MG (Fig. 4A). Da mesma forma, um estudo prévio mostrou que a diminuição dos níveis de GSH nos eritrócitos de ratos diabéticos era ligeiramente potenciada pelo tratamento com PM<sup>53</sup>. Os autores justificam o resultado com o fato da PM aumentar a atividade da glioxalase I em situações de hiperglicemia, levando a um consumo elevado de GSH. Mostrou-se que a formação

intracelular de AGEs envolve um processo dependente de ROS e que a inibição de processos oxidativos previne a formação intracelular dos mesmos<sup>54</sup>. A reserva mitocondrial de GSH é o principal antioxidante deste organelo e é considerada vital para a sobrevivência das células<sup>55</sup>, tendo um papel importante na remoção de radicais livres e na reciclagem de outros antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol<sup>50</sup>. O  $\alpha$ -tocoferol é um importante antioxidante fisiológico que protege as células do *stress* oxidativo, nomeadamente da peroxidação lipídica. No nosso estudo, os animais controlo tratados com PM mostraram níveis significativamente aumentados de  $\alpha$ -tocoferol nas mitocôndrias (Fig. 4B), o que está de acordo com os níveis baixos de MDA observados nestes animais (Fig. 3B).

A dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  promovido pela MnSOD leva à formação de  $H_2O_2$ , que por sua vez é decomposto pela enzima GPx, na matriz mitocondrial, usando como substrato a GSH e obtendo como produtos finais GSSG e  $H_2O$ . A catalase é outra enzima capaz de converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Tal como observado por DiLoreto e colaboradores<sup>8</sup>, nas nossas preparações mitocôndrias a atividade da GPx está ligeiramente diminuída no grupo de animais tratados com MG (Fig. 7B), enquanto a MnSOD se mantém inalterada (Fig. 7C). O tratamento com PM não alterou os perfis observados nos ratos tratados com MG, mas aumentou significativamente a atividade da GPx (Fig. 5B) e da MnSOD (Fig. 5C) nos ratos controlo. Quando a produção de ROS é prolongada, as reservas endógenas de antioxidantes são incapazes de neutralizar o excesso de espécies reativas, levando ao dano celular. Deste modo, os nossos dados mostram que a PM foi incapaz de reverter os efeitos oxidativos do MG. No entanto, em condições fisiológicas, a PM exerce alguns efeitos positivos nas mitocôndrias de cérebro visto que foi capaz de reduzir os níveis de MDA (Fig. 3B) aumentar a atividade das enzimas GPx (Fig. 5B) e MnSOD (Fig. 5C) e aumentar os níveis de  $\alpha$ -tocoferol (Fig. 4B). Por outro lado, face a um insulto oxidativo, neste caso a administração de MG, a PM não é capaz de reverter as alterações que ocorrem nas mitocôndrias de cérebro. No

entanto, estudos prévios mostraram a eficácia da PM contra os efeitos deletérios do MG e a sua administração mostrou ter capacidade de atenuar a nefropatia e neuropatia em vários modelos animais de diabetes<sup>56-58</sup>. Outros estudos sugerem que a neurotoxicidade induzida pelo MG pode ser ultrapassada com o co-tratamento com aminoguanidina, enquanto o mesmo já não ocorre com o pré-tratamento<sup>33</sup>. A utilização deste fármaco surgiu devido aos seus efeitos benéficos como supressor da formação dos AGEs contudo, estudos clínicos posteriores mostraram que a aminoguanidina tem efeitos adversos graves relacionados com o sequestro de pirodoxal, um derivado da vitamina B6<sup>59</sup>, sendo que uma possível associação com a PM poderia potenciar os efeitos benéficos e contrariar os efeitos adversos. Do mesmo modo, o composto OPB-9195 ((+/-)-2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide) também com forte potencial na prevenção da formação dos AGEs foi descontinuado por provocar a depleção da vitamina B6<sup>59</sup>. Seguindo esta linha de raciocínio, os derivados da vitamina B6 parecem ter um papel central na prevenção da formação dos AGEs e suas complicações. Muellenbach e colaboradores<sup>60</sup>, mostraram que a co-administração de PM e ácido  $\alpha$ -lipóico, durante 6 ou 22 semanas, a ratos Zucker obesos melhorou significativamente o perfil metabólico dos animais, quando comparado com os efeitos de cada um dos compostos isoladamente. Também se mostrou que o antioxidante N-acetilcisteína é ineficaz quando administrado 1h após a exposição de células PC12 indiferenciadas ao MG, levando os autores a sugerir a existência de uma breve janela de ação contra o desequilíbrio redox provocado pelo MG<sup>61</sup>. De realçar que no nosso protocolo experimental, o tratamento com a PM foi iniciado após 10 semanas do exposição ao MG, e se de facto existir uma janela terapêutica estreita, os resultados poderiam ter sido diferentes, no cérebro, se a PM tivesse sido administrada numa fase mais precoce. De facto, ao tentarmos aprofundar o mecanismo de ação da PM, encontramos na literatura que este composto interage diretamente com o MG formando um dímero MG-PM que impede a interação do MG com outras proteínas,

impedindo os seus efeitos deletérios <sup>53</sup>. Posto isto, e sabendo que o MG é bastante reativo, suspeitamos que após 10 semanas de exposição ao MG, a PM já não teve capacidade para reverter os danos causados pelo composto.

Em suma, os nossos resultados mostram que níveis altos de MG levam a uma disfunção e um desequilíbrio redox das mitocôndrias do cérebro. Além disso, nas nossas condições experimentais, a PM não foi capaz de reverter os efeitos nocivos provocados pelo MG a nível cerebral. De realçar que não se pode excluir a possível existência de efeitos específicos da PM em cada tecido assim como a influência do protocolo experimental utilizado<sup>37</sup>.

## **Agradecimentos**

- À Professora Doutora Paula Moreira, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade, amizade e generosidade reveladas ao longo destes anos, assim como pelas críticas, correções, sugestões relevantes feitas durante a orientação.

- À Professora Doutora Cristina Sena, minha co-orientadora, pela competência científica e orientação dada, bem como pela disponibilidade então demonstrada.

- À Susana Cardoso, pela competência científica, pela atenção, amizade, apoio e principalmente paciência disponibilizada quer no laboratório quer na elaboração posterior da tese, mostrando ser uma valiosa ajuda para a realização do mesmo.

- À Cristina Carvalho, Anabel Simões e Emanuel Candeias pela simpatia, disponibilidade e ajuda prestada.

- À Professora Doutora Raquel Seiça, responsável pelo Laboratório de Fisiologia da FMUC, e às pessoas que trabalham na área de Fisiologia pela ajuda que deram no tratamento e caracterização dos animais.

- Ao Dr. Paulo Maia e Ana Rita Batista que amavelmente se disponibilizaram para rever a tese.

- E por fim quero agradecer à minha família pela paciência e compreensão sempre demonstrados e de uma forma muito particular, aos meus pais, que de uma forma carinhosa e amiga, sempre me estimularam ao longo destes anos e me incentivaram a percorrer este caminho, que me traz grande satisfação pessoal e que sem eles nunca teria chegado a este ponto.



## Bibliografia

1. Hudson, B. I. *et al.* Diabetic vascular disease: it's all the RAGE. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1588–600 (2005).
2. Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H. & Reusch, J. E. B. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes care* 29, 1420–32 (2006).
3. Srikanth, V. *et al.* Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 32, 763–77 (2011).
4. Moreira, P. I., Santos, M. S., Seica, R. & Oliveira, C. R. Brain mitochondrial dysfunction as a link between Alzheimer's disease and diabetes. *Journal of the neurological sciences* 257, 206–14 (2007).
5. Moreira, P. I. *et al.* Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta* 1802, 212–20 (2010).
6. Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Augé, N., Pamplona, R. & Portero-Otín, M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & redox signaling* 11, 3071–109 (2009).
7. Maillard D. Action des acides amine´s sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *Compt Rend Hebd Seances Acad Sci* 154, 66– 68 (1912).
8. Di Loreto, S. *et al.* Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 245–57 (2008).
9. Beeri, M. S. *et al.* Serum concentration of an inflammatory glycotoxin, methylglyoxal, is associated with increased cognitive decline in elderly individuals. *Mechanisms of ageing and development* 132, 583–7 (2011).
10. Kuhla, B. *et al.* Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1043, 211–6 (2005).
11. Voziyan, P. a & Hudson, B. G. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 1671–81 (2005).
12. Jain, S. K. & Lim, G. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free radical biology & medicine* 30, 232–7 (2001).
13. Nagaraj, R. H. *et al.* 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. *Archives of biochemistry and biophysics* 402, 110–9 (2002).

14. Davis, R. E., Calder, J. S. & Curnow, D. H. Serum pyridoxal and folate concentrations in diabetics. *Pathology* 8, 151–6 (1976).
15. Khalifah, R. G., Baynes, J. W. & Hudson, B. G. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochemical and biophysical research communications* 257, 251–8 (1999).
16. Cohen, K. L., Gorecki, G. A., Silverstein, S. B., Ebersole, J. S. & Solomon, L. R. Effect of pyridoxine (vitamin B6) on diabetic patients with peripheral neuropathy. *Journal of the American Podiatry Association* 74, 394–7 (1984).
17. Moreira, P. I., Santos, M. S., Moreno, A. & Oliveira, C. Amyloid beta-peptide promotes permeability transition pore in brain mitochondria. *Bioscience reports* 21, 789–800 (2001).
18. Moreira, P. I., Santos, M. S., Moreno, A., Rego, A. C. & Oliveira, C. Effect of amyloid beta-peptide on permeability transition pore: a comparative study. *Journal of neuroscience research* 69, 257–67 (2002).
19. Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry* 177, 751–66 (1949).
20. Estabrook R Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Meth Enzymol* 41–47 (1967).
21. Chance, B. & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 221, 477–89 (1956).
22. Kamo, N., Muratsugu, M., Hongoh, R. & Kobatake, Y. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenyl phosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *The Journal of membrane biology* 49, 105–21 (1979).
23. Jensen, B. D. & Gunter, T. R. The use of tertaphenylphosphonium (TPP<sup>+</sup>) to measure membrane potentials in mitochondria: membrane binding and respiratory effects. *Biophys. J* 45:92, (1984).
24. Muratsugu, M., Kamo, N., Kurihara, K. & Kobatake, Y. Selective electrode for dibenzyl dimethyl ammonium cation as indicator of the membrane potential in biological systems. *Biochimica et biophysica acta* 464, 613–9 (1977).
25. Wong, S. H. *et al.* Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clinical chemistry* 33, 214–20 (1987).
26. Krebs, H. A. & Holzach, O. The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *The Biochemical journal* 52, 527–8 (1952).

27. Barja, G. Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31, 347–66 (1999).
28. Hissin, P. J. & Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry* 74, 214–26 (1976).
29. Vatassery, G. T. & Younoszai, R. Alpha tocopherol levels in various regions of the central nervous systems of the rat and guinea pig. *Lipids* 13, 828–31 (1978).
30. Carlberg, I. & Mannervik, B. Glutathione reductase. *Methods in enzymology* 113, 484–90 (1985).
31. Flohé, L. & Günzler, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* 105, 114–21 (1984).
32. Flohé, L. & Otting, F. Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology* 105, 93–104 (1984).
33. Kikuchi, S. *et al.* Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons: synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases. *Journal of neuroscience research* 57, 280–9 (1999).
34. Yamagishi, S. *et al.* Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochimica et biophysica acta* 1820, 663–71 (2012).
35. Beisswenger, P. & Ruggiero-Lopez, D. Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes & Metabolism* 29, 6103 (2003).
36. Miyata, T. & Van Ypersele de Strihou, C. Angiotensin II receptor blockers and angiotensin converting enzyme inhibitors: implication of radical scavenging and transition metal chelation in inhibition of advanced glycation end product formation. *Archives of biochemistry and biophysics* 419, 50–4 (2003).
37. Sena, C. M. *et al.* Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 65, 497–506 (2012).
38. Moreira, P. I. & Oliveira, C. R. Mitochondria as potential targets in antidiabetic therapy. *Handbook of experimental pharmacology* 331–56 (2011).doi:10.1007/978-3-642-17214-4\_14
39. Rosca, M. G., Monnier, V. M., Szweda, L. I. & Weiss, M. F. Alterations in renal mitochondrial respiration in response to the reactive oxoaldehyde methylglyoxal. *American journal of physiology. Renal physiology* 283, F52–9 (2002).
40. De Arriba, S. G. *et al.* Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells--protection by carbonyl scavengers. *Neurobiology of aging* 28, 1044–50 (2007).

41. Kim-Han, J. S. & Dugan, L. L. Mitochondrial uncoupling proteins in the central nervous system. *Antioxidants & redox signaling* 7, 1173–81
42. Rolo, A. P. & Palmeira, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology* 212, 167–78 (2006).
43. Di Loreto, S. *et al.* Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1beta and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain research* 1006, 157–67 (2004).
44. Yan, L. J., Levine, R. L. & Sohal, R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11168–72 (1997).
45. Addabbo, F. *et al.* The Krebs cycle and mitochondrial mass are early victims of endothelial dysfunction: proteomic approach. *The American journal of pathology* 174, 34–43 (2009).
46. Demir, R. *et al.* Effects of excess vitamin B6 intake on cerebral cortex neurons in rat: an ultrastructural study. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* 43, 143–50 (2005).
47. Root, E. J. & Longenecker, J. B. Brain cell alterations suggesting premature aging induced by dietary deficiency of vitamin B6 and/or copper. *The American journal of clinical nutrition* 37, 540–52 (1983).
48. Molimard, R. *et al.* Impairment of memorization by high doses of pyridoxine in man. *Biomedicine / [publiée pour l'A.A.I.C.I.G.]* 32, 88–92 (1980).
49. Malouf, R. & Grimley Evans, J. The effect of vitamin B6 on cognition. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* CD004393 (2003).doi:10.1002/14651858.CD004393
50. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 44–84 (2007).
51. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine* 11, 81–128 (1991).
52. Kang, Z., Li, H., Li, G. & Yin, D. Reaction of pyridoxamine with malondialdehyde: mechanism of inhibition of formation of advanced lipoxidation end-products. *Amino acids* 30, 55–61 (2006).
53. Nagaraj, R. H. *et al.* 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. *Archives of biochemistry and biophysics* 402, 110–9 (2002).

54. Giardino, I., Edelstein, D. & Brownlee, M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 97, 1422–8 (1996).
55. Han, D., Canali, R., Rettori, D. & Kaplowitz, N. Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. *Molecular pharmacology* 64, 1136–44 (2003).
56. Stitt, A. *et al.* The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes* 51, 2826–32 (2002).
57. Zheng, F. *et al.* Combined AGE inhibition and ACEi decreases the progression of established diabetic nephropathy in B6 db/db mice. *Kidney international* 70, 507–14 (2006).
58. Chetyrkin, S. V., Zhang, W., Hudson, B. G., Serianni, A. S. & Voziyani, P. A. Pyridoxamine protects proteins from functional damage by 3-deoxyglucosone: mechanism of action of pyridoxamine. *Biochemistry* 47, 997–1006 (2008).
59. Reddy, V. P. & Beyaz, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug discovery today* 11, 646–54 (2006).
60. Muellenbach, E. M. *et al.* Metabolic interactions of AGE inhibitor pyridoxamine and antioxidant alpha-lipoic acid following 22 weeks of treatment in obese Zucker rats. *Life sciences* 84, 563–8 (2009).
61. Okouchi, M., Okayama, N. & Aw, T. Y. Differential susceptibility of naive and differentiated PC-12 cells to methylglyoxal-induced apoptosis: influence of cellular redox. *Current neurovascular research* 2, 13–22 (2005).