



**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**

**MARIA FILIPA DA CONCEIÇÃO MALHEIRO PINTO DE  
ALMEIDA**

***OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DOS AGES PELA  
PIRIDOXAMINA NA LESÃO ISQUÉMICA  
INDUZIDA POR METILGLIOXAL***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE CARDIOLOGIA/FISIOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSOR DOUTOR LINO GONÇALVES  
DR. PAULO MATAFOME**

**[FEVEREIRO/2011]**

# **OS EFEITOS DA INIBIÇÃO DOS AGES PELA PIRIDOXAMINA NA LESÃO ISQUÉMICA INDUZIDA POR METILGLIOXAL**

Maria Filipa Almeida<sup>3</sup>, Daniela Santos Silva<sup>1</sup>, Paulo Matafome<sup>1,2</sup>, Cristina Sena<sup>1</sup>; Lino Gonçalves<sup>3,4</sup>, Raquel Seiça<sup>1</sup>

- 1- Laboratório de Fisiologia, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- 2- Centro de Oftalmologia, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- 3- Unidade de Investigação Básica em Cardiologia, IBILI, FMUC
- 4- Serviço de Cardiologia, Hospitais da Universidade de Coimbra

## **Contactos**

Morada: Pólo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, 1º andar, gab 1.03, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 300-354 Coimbra, Portugal.

Telefone: 910670393

Email: mariafilipaalmeida@gmail.com

## **Trabalho financiado por**

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)

## **RESUMO**

A prevalência da diabetes tem aumentado significativamente e as suas complicações cardiovasculares são uma das principais causas de morte em diabéticos. A hiperglicemia é a grande iniciadora dos fenómenos patológicos que surgem na doença e parte do seu papel nefasto ocorre através da acumulação de produtos de glicação avançada (AGEs). O metilglioxal (MG) é um  $\alpha$ -oxoaldeído altamente reactivo e precursor de AGEs, cujos níveis estão aumentados no sangue de pacientes diabéticos. Assim, os nossos objectivos foram especificar o papel do metilglioxal e a sua influência na resposta à isquemia determinando se a inibição da formação de AGEs pela piridoxamina melhora a sobrevivência miocárdica após isquemia. Para tal, ratos Wistar foram divididos em três grupos, um controlo (W), um em que foi administrado MG (WMG) e outro que após administração de MG foi dada piridoxamina (WMPir). Após a colheita os corações foram imediatamente colocados em perfusão; um subgrupo perfundiu durante uma hora (controlos) e outro foi submetido a isquemia durante 30 minutos (isquémicos). Através da determinação de diversos parâmetros, os nossos resultados mostraram que o grupo WM apresenta níveis de AGEs e RAGEs mais elevados, correlacionando-se isto com uma resposta inferior à isquemia (avaliação de vias de sobrevivência e apoptose), quando comparado com o grupo W. A administração de piridoxamina pareceu aproximar as características do grupo WMPir às do grupo W, apresentado menores níveis de AGEs e RAGEs que o WM e respondendo melhor à isquemia. Estes resultados permitem concluir que a acumulação de MG no tecido cardíaco compromete a resposta a uma lesão isquémica e que alguns dos seus efeitos são inibidos pela piridoxamina, tornando o MG num alvo terapêutico e a terapêutica com piridoxamina uma mais-valia.

**Palavras chave:** Diabetes, AGEs, Metilglioxal, isquemia cardíaca, piridoxamina

## **ABSTRACT**

Diabetes prevalence continues to increase and its cardiovascular complications are a major cause of morbidity and mortality amongst diabetic patients. It has become clear that hyperglycemia is the initiating cause of tissue damage and increased evidence has suggested that part of this damage is done through the accumulation of advanced glycation end products (AGE). Methylglyoxal (MG) is an  $\alpha$ -oxoaldehyde that is one of the most reactive AGE precursor and which levels are elevated in diabetic patients. Therefore, our goal was to specify the role of MG and its influence in heart response to ischemia and also to determine if the inhibition of AGE formation by pyridoxamine improves cardiomyocyte survival. To accomplish this, Wistar rats were divided in three groups, one control (W), one subjected to MG administration (WMG) and another to pyridoxamine treatment (WMPir) after MG administration. After harvest, rat's hearts were immediately mounted in the perfusion system; a subgroup was perfused during 1 hour (controls) and other was subjected to 30 minutes of ischemia (ischemic). WM group showed higher levels of AGE and AGE receptors (RAGE), correlating with poor response to ischemia when looking to survival and apoptosis parameters, in comparison to W group. Pyridoxamine administration approached WMPir characteristics to the W group, namely lower levels of AGE and RAGE than WM and better response to ischemia. Concluding, MG accumulation in the heart is a determinant of poor response to ischemia and some of its effects are reverted by pyridoxamine. Thus, MG is a good therapeutic target and the addition of pyridoxamine to the therapy is a surplus value.

**Keywords:** Diabetes, AGEs, methylglyoxal, heart ischemia, pyridoxamine.

## **A - INTRODUÇÃO**

A Diabetes mellitus mais do que uma entidade nosológica única é um conjunto de disfunções metabólicas cuja face visível comum é a hiperglicemia.(Kumar, Abbas et al. 2005). Segundo Negre-Salvayre et al (2009) e Yan et al (2004), a sua incidência aumenta a um ritmo alarmante e os efeitos invalidantes das suas inúmeras complicações representam uma causa importante de morbidade e mortalidade, principalmente no mundo Ocidental.

A diabetes é um factor de risco major para o desenvolvimento de doença cardíaca e, de acordo com Wang et al (2010), vários estudos experimentais e clínicos demonstraram uma forte ligação entre Diabetes e a morbidade/mortalidade cardiovascular traduzida por maiores áreas de enfarte e insuficiências cardíacas pós reperfusão mais graves. Vemos que, em indivíduos diabéticos, os Enfartes Agudos do Miocárdio (EAM) e Acidentes vasculares cerebrais (AVC) ocorrem mais frequentemente e com maior severidade do que em indivíduos não diabéticos (Yan et al, 2004). A evidência é cada vez maior de que a causa iniciadora deste conjunto de complicações resulta da acumulação de produtos de glicação avançada (AGEs) a longo prazo. Vários trabalhos têm sugerido que estas moléculas e a interacção das mesmas com os seus receptores (RAGEs) provocam stress oxidativo e inflamação vascular, estando assim envolvidas na patogénese da aterosclerose (Yamagishi et al 2008).

A glicação é uma reacção química (não enzimática) entre açucares redutores e grupos amina alterando ou impedindo a função biológica das moléculas. A glicação ocorre através de uma cascata de reacções que resultam em produtos intermediários (produtos Amadori e Maillard). Por outro lado, a acumulação de glicose nas células conduz à formação de outros intermediários do metabolismo, como o metilglioxal (MG), um composto que reage rapidamente com grupos amina e leva à formação de AGEs (Negre-Salvayre et al 2009). O MG é um dicarbonilo muito reactivo, sendo um produto intermediário do metabolismo da glicose e circulando em maiores concentrações no plasma de pacientes diabéticos. O facto de

existirem níveis elevados de MG em doentes mal controlados permite sugerir que este contribui para as complicações desta doença (Wang et al,2010) .

Vários autores mostraram haver uma possível relação entre o MG e várias situações que, de uma maneira ou de outra, se correlacionam e resultam da hiperglicémia (Browners et al 2010, Yuen et al 2010, Wang et al 2010,Thangarajah et al 2010, Vander Jagt e Hunsaker 2002). Também no nosso laboratório observámos que, comparando as consequências da isquemia induzida por MG em ratos normais com as observadas em ratos diabéticos Goto-Kakizaki (GK), o aumento da acumulação de AGEs e sobre-expressão de RAGE se associa a um aumento da apoptose. Os nossos dados revelam que a acumulação de MG e de AGEs está associada a um outcome pobre após isquemia pelo aumento da morte celular.

Se o MG leva à formação de AGEs, se estes estão implicados no desenrolar de complicações na doença diabética, a inibição da formação dos mesmos poderia, hipoteticamente, trazer benefícios aos doentes. Um inibidor potente da formação de AGEs a partir de compostos Amadori é a Piridoxamina, um elemento da família da vitamina B6.

Desta forma o nosso objectivo foi tentar especificar o papel do MG e a sua influência na resposta à isquemia e determinar se a inibição da formação de AGEs melhora a sobrevivência miocárdica após isquemia. Para o atingirmos, ratos Wistar normais, foram tratados com piridoxamina, após tratamento com MG, e os corações sujeitos a isquemia “ex-vivo”. Esta abordagem permitiu avaliar uma possível futura estratégia terapêutica para atenuar ou travar as lesões causadas pela hiperglicemia no coração diabético.

## **B - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Materiais**

Todos os sais e solventes orgânicos utilizados possuem o mais alto grau de pureza analítica e foram adquiridos à Merck Darmstad – Alemanha, à Sigma-Aldrich – EUA ou à Pancreac Química SA- Espanha. Os anticorpos utilizados foram Anti- AGEs monoclonal antibody (Trans Genic Inc., Japão) Anti-RAGE rabbit polyclonal antibody (Abcam, Reino Unido), Rabbit polyclonal Bax (Santa Cruz Biotechnology, EUA), mouse monoclonal Bcl-2 (C-2) antibody (Santa Cruz Biotechnology, EUA), rabbit phospho-Akt (Ser 473), rabbit Akt antibody, SAPK/JNK rabbit antibody e Phospho-SAPK/JNK mouse antibody (Cell Signalling, USA).

### **Modelos animais**

Neste trabalho foram estudados ratos normais Wistar obtidos a partir da colônia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. A colônia foi mantida sob temperatura e humidades controladas, ventilação adequada e ciclos alternados de luz e obscuridade (12h). Os animais tiveram livre acesso à ração (dieta standard laboratorial A04-Panlab, Barcelona, Espanha) e a água, sendo esta, nos grupos tratados, utilizada como veículo de administração. Os ratos foram divididos em 3 grupos experimentais de 8 animais sacrificados com 6 meses. O grupo controlo de ratos W não experimentou tratamento, os outros dois grupos foram submetidos à administração de metilglioxal (Sigma,EUA), durante 8 semanas (65 mg/Kg/dia); após esse período, um deles foi tratado com Piridoxamina (Sigma,EUA; 1g/L) durante 4 semanas (WMPir) e outro mantido com água durante esse período (WM).

### **Análises *in vivo* e perfil lipídico**

O peso corporal foi determinado no final do tratamento e, nos grupos WM e WMPir, ao longo do tratamento com o objectivo de ajustar a dose de MG e piridoxamina.

A glicemia (mg/dL) foi determinada na veia da cauda, no final do tratamento, através do método da glicose-oxidase utilizando um glicómetro e tiras-teste (*Glucometer Elite* – Bayer SA, Portugal). Foram avaliados os níveis de glicose em jejum ( 16-18 horas) e 2 horas após administração intraperitoneal de 1,8g/Kg de glicose a 30% (Braun, Queluz de Baixo, Portugal).

Os níveis de hemoglobina-A<sub>1C</sub> foram determinados no sangue total da veia da cauda, usando um analisador automático (*DCA 2000 Analyser*, Bayer, Health Care Diagnostics Division).

Os níveis de colesterol (total e HDL) e triglicérideos foram determinados usando kits comerciais (Olympus-Diagnóstica, Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal).

### **Colheitas de amostras**

As colheitas de sangue foram realizadas, através de punção cardíaca, nos animais submetidos a jejum de 16-18h e anestesiados, por via intramuscular, com cloridrato de quetamina (Parke-Davis, EUA) e cloridrato de clorpromazina (Laboratórios Vitória, Portugal) nas doses de 75 mg/Kg e 3 mg/Kg. O sangue foi centrifugado (10 minutos, 2500xg, 4°C) e o plasma e o soro guardados a -80°C.

Os corações foram recolhidos no momento do sacrifício e colocados de imediato num sistema de perfusão (Sistema tipo *Langerdorff*).

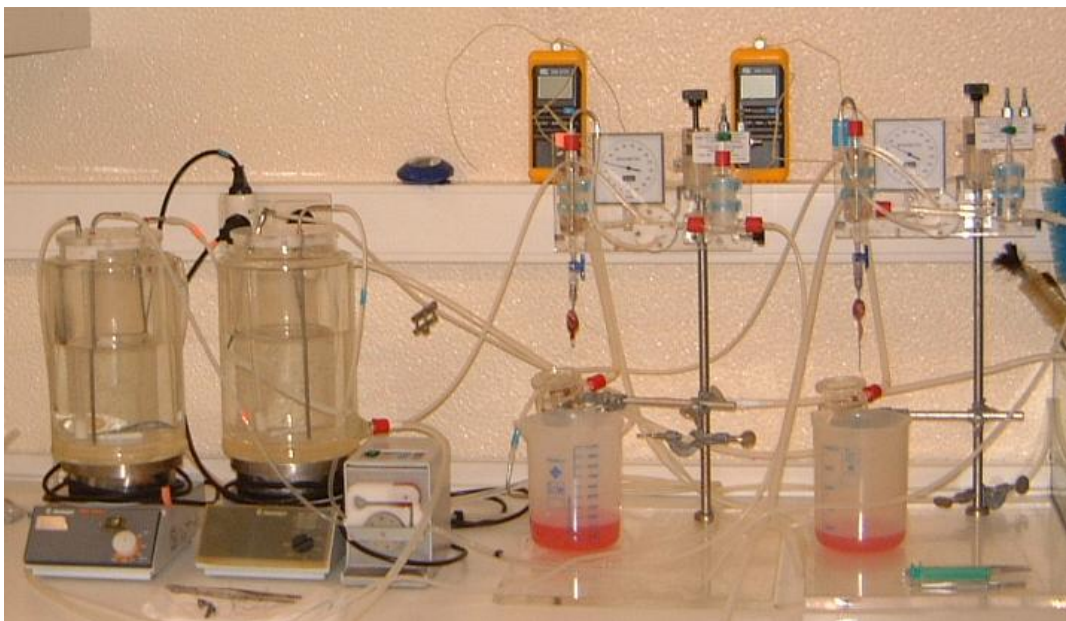
### **Sistema de perfusão *Langerdorff***

Foi utilizado o sistema de perfusão *Langerdorff* (modelo U-100, Hugo Sachs Elektronik/harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany – Figura 1 ), em que se recorre à



perfusão reversa do coração, via artéria aorta, que permite manter os corações próximos das condições fisiológicas e viáveis durante algumas horas. Assim os corações foram perfundidos com um tampão de Krebs-Hanseleit com a seguinte composição: 118mM NaCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,7mM KCl, 1,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2mM MgSO<sub>4</sub>, 10mM HEPES, 1,25mM CaCl<sub>2</sub> e 10 mM glicose (ph 7,4). Este tampão foi oxigenado e mantido à temperatura de 37°C, circulando a uma pressão e fluxo de aproximadamente 80 mmHg e 20 mL por minuto.

Os corações dos diferentes grupos experimentais foram divididos em: 1) subgrupo controlo (aproximadamente 60 minutos de perfusão) , 2) subgrupo submetido a isquémia (20 minutos de perfusão, seguidos de 30 minutos de isquemia com solução de perfusão sem glicose nem oxigénio).



**Figura1:** Sistema de perfusão de Langerdorff.

### **Western Blotting**

A identificação e quantificação das proteínas Bcl-2, Bax, Akt total e fosforilada, JNK total e fosforilada e AGEs foram efectuadas utilizando a técnica de *Western Blotting*. A  $\beta$ -actina

serviu como controlo interno da quantidade de proteína das amostras. A quantificação das bandas foi calculada com o programa Image Quant, Molecular Dynamics, EUA.

200mg de tecido foram homogeneizadas (homogeneizador modelo ATM, FLAC Instruments, Itália; poder e pistão F03h03, Thomas Scientific) em 1,5 mL de tampão de lise com a seguinte composição: 25mM Tris-HCl (pH 7,6); 150mM NaCl; 1% Triton X- 100; 1mM EDTA; 1 mM EGTA; 20mM NAF; 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 10mM β-glicerolfosfato; 2,5mM Pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 20 µl cocktail inibidor de proteases por 0,5 g de tecido. Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados duas vezes (20', 14000xg, 4°C), recolhendo-se, sucessivamente, o sobrenadante. Calculou-se a concentração de proteína pelo método BCA (*BCA protein assay*, Pierce, USA) e as amostras foram armazenadas a -80°C, em alíquotas com tampão *Sample* (Tabela I).

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 I).

Os géis correram no sistema apropriado (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA), com tampão *Running* (Tabela I), com padrão de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards, Dual Color*, Bio-Rad, EUA) e amostras previamente desnaturadas e sonicadas.

As proteínas foram transferidas para membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride membrane*, Bio-Rad, EUA) previamente activadas, no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, EUA), a amperagem constante de ±300mA, em tampão *CAPS* (Tabela I).

As membranas foram bloqueadas com solução TBST-BSA 5% (Tabela I), a 4°C durante a noite, depois lavadas com TBST (Tabela I). Após o bloqueio, as membranas incubaram durante a noite a 4°C com os respectivos anticorpos primários. Depois lavaram--se com TBST e incubaram-se as com os respectivos anticorpos secundários (*Anti-rabbit/ mouse IgG alkaline phosphatase linked goat antibody*, GE Healthcare,UK) com agitação constante e à

temperatura ambiente, durante 2 horas. Após remoção do anticorpo secundário em excesso, as membranas foram incubadas com o substrato enzimático ECF (Mouse *ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, UK) e revelados por leitor de fluorescência (Typhoon, GE Healthcare, USA).

**Tabela I-** Soluções utilizadas em Western Blot

---

**Tampão Resolving**

0,75mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH8,8

**Tampão Stacking**

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

**Tampão Sample**

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

**Tampão Running**

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

**Tampão CAPS**

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

**Tampão TBS**

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

**Tampão TBST**

Solução TBS+1% Tween-20

---

**Imunohistoquímica**

A distribuição dos AGEs e das proteínas RAGEs, Bax e Bcl-2 foi analisada por esta técnica. Após secagem, as crio-seções foram fixadas com acetona (-20°C). Depois foram re-

hidratadas em tampão salino de fosfato (PBS). Seguiu-se a permeabilização dos cortes com PBS+0,25% Triton, a que se seguiram lavagens com PBS. Os cortes foram bloqueados com PBS+1% BSA+10% soro e posteriormente incubados com os anticorpos primários em PBS+1% BSA (50 µl por secção), durante a noite, a 4°C. Após lavagens, seguiu-se a incubação com os anticorpos secundários (Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG e Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen, EUA) que foi feita em PBS+1%BSA (50 µl por crio-secção), durante uma hora à temperatura ambiente e no escuro.

Repetiram-se lavagens, colocou-se uma gota de meio de montagem (*DPX*, Pancreac, Espanha) sobre cada lâmina e cobriram-se as secções com lamelas, deixando secar no escuro. A análise dos cortes foi realizada num microscópio de fluorescência ( *Leica DMIRE2*, Leica Microsystems, Alemanha).

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$ erro padrão da média (epm). Os dados obtidos foram analisados pelo teste *t* Student para amostras não emparelhadas, sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados significativos.

## **C - RESULTADOS**

### **-Caracterização geral**

Não se verificaram diferenças significativas no peso corporal dos três grupos. O tratamento com MG e piridoxamina não alterou significativamente o peso corporal em relação ao grupo controlo (Tabela II).

Os valores de glicemia, em jejum e duas horas após administração de glicose, bem como de hemoglobina glicada não variaram entre os três grupos (Tabela II).

## **-Perfil lipídico**

Não se encontraram diferenças significativas nos níveis séricos de triglicerídeos, de colesterol total ou de colesterol HDL (tabela II).

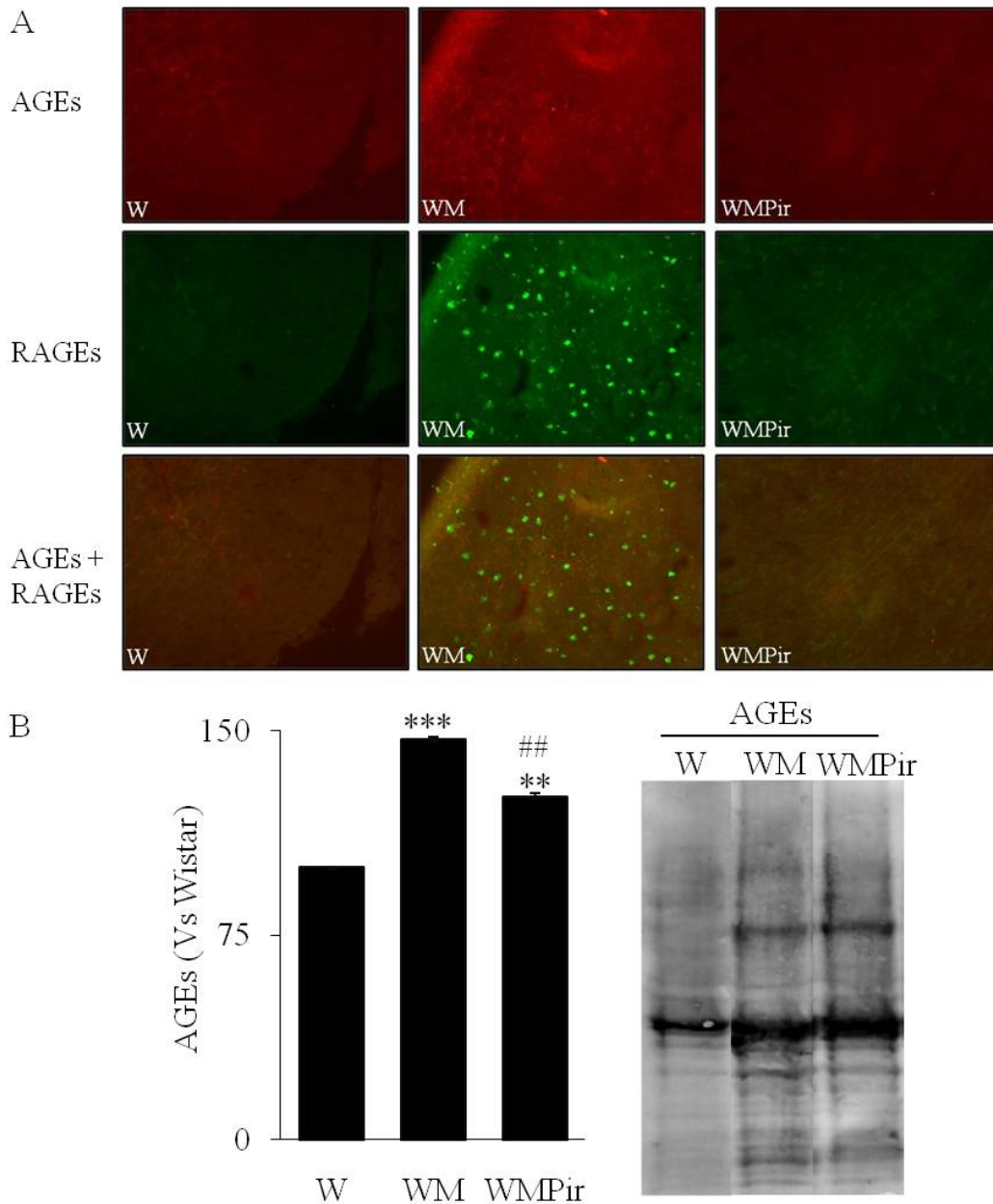
**Tabela II:** Peso corporal (g), Glicemia (mg/dL) em jejum e duas horas após administração intraperitoneal de glicose (1,8g/Kg), HbA1c (%), Triglicerídeos e Colesterol total e HDL (mg/dL). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  epm (erro padrão da média), n=8.

<b>Parâmetro</b>	<b>W</b>	<b>WMG</b>	<b>WMGPir</b>
<b>Peso (g)</b>	429,6 $\pm$ 17,2	439,5 $\pm$ 17,6	432,6 $\pm$ 11,9
<b>Glicemia em jejum(mg/dL)</b>	63,3 $\pm$ 1,0	62,9 $\pm$ 1,5	64,3 $\pm$ 2,0
<b>Glicemia às 2h (mg/dL)</b>	92,0 $\pm$ 6,1	91,3 $\pm$ 1,8	92,5 $\pm$ 3,1
<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	3,6 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,0	3,7 $\pm$ 0,1
<b>Triglicerídeos(mg/dL)</b>	95,8 $\pm$ 9,1	78,6 $\pm$ 5,6	98,0 $\pm$ 10,8
<b>Colesterol total(mg/dL)</b>	92,5 $\pm$ 5,8	84,7 $\pm$ 4,7	91,3 $\pm$ 4,5
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	53,8 $\pm$ 2,6	49,4 $\pm$ 2,7	53, 4 $\pm$ 1,9

## **-Glicação (AGEs e RAGEs)**

Os ratos WM têm níveis superiores de produtos de glicação avançada (AGEs), quando comparados com os ratos W ( $p < 0,001$ ) (Figura 2A e 2B). A Administração de Piridoxamina (WMPir) resultou numa diminuição dos níveis de AGEs no tecido em relação ao grupo WM ( $p < 0,01$ ), embora sejam ainda superiores ao grupo W ( $p < 0,01$ ) (Figura 2A e 2B).

A marcação histológica dos receptores de AGEs (RAGEs) no tecido cardíaco mostrou que estes se localizam em zonas de acumulação de AGEs seguindo, portanto, o perfil encontrado na determinação destes compostos (Figura 2A).



**Figura 2: AGEs e RAGEs no tecido cardíaco**

A - Imagens representativas dos cortes histológicos cardíacos com marcação para AGEs, RAGEs e AGEs+RAGEs.

Os níveis de AGEs e RAGES presentes no tecido cardíaco dos ratos controlo W, WM e WMPir com 6 meses de vida, foram avaliados pela técnica imuno-histoquímica através da marcação com anticorpos específico para AGEs e RAGES.(n=2,ampliação de 200x)

B - % de AGEs no tecido cardíaco nos grupos controlo W, WM e WMPir avaliados por Western Blot, com marcação específica para esta proteína e respectiva membrana.

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=2.

\*\*\*p<0,001 vs Wc; \*\*p<0,01 vs Wc; ##p<0,01 WMc (teste t de student).

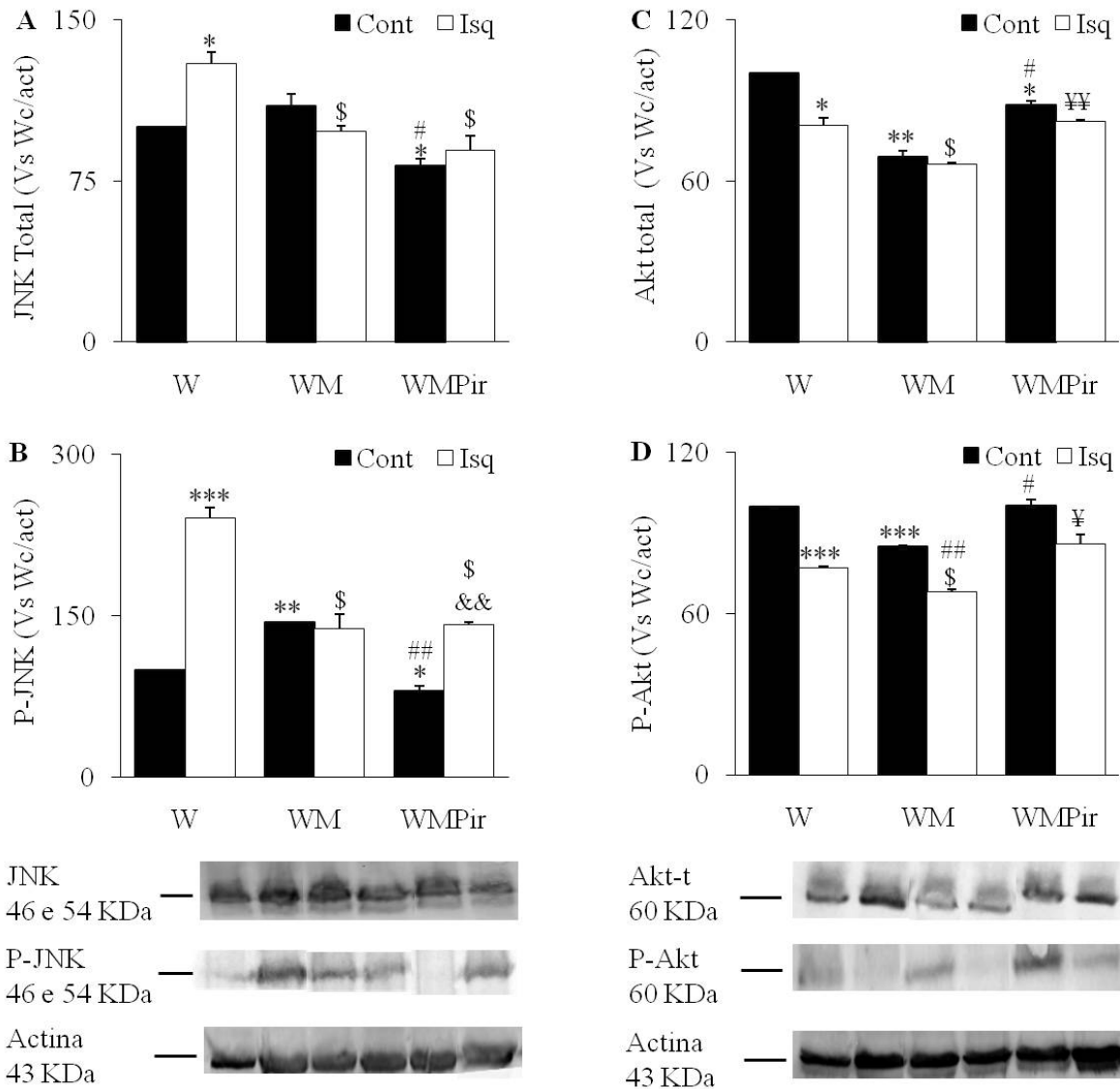
### **-Vias de resposta ao *stress* e de sobrevivência celular**

**“c-Jun N-terminal kinase” (JNK).** O grupo WM, na situação controlo, não apresenta níveis significativamente superiores de JNK total em relação ao grupo W. No entanto, a administração de piridoxamina resulta numa diminuição deste parâmetro ( $p < 0,05$ ) (Figura 3A). No grupo Wistar, a isquemia provocou um aumento significativo da expressão de JNK, o que não aconteceu nos restantes grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 3A).

Em relação à forma fosforilada/activa da JNK (P-JNK), o grupo WM apresenta desde logo, na situação controlo, níveis superiores aos dos outros grupos ( $p < 0,01$ ) (Figura 3B). Durante a isquemia, os níveis de P-JNK aumentam drasticamente no grupo W ( $p < 0,001$ ), o que também ocorre no grupo tratado com piridoxamina, embora numa escala mais reduzida ( $p < 0,01$ ), mas não no grupo com administração de metilglioxal (Figura 3B).

**Akt.** Os níveis de Akt total no grupo WM, na situação controlo, são significativamente inferiores aos dos grupos W ( $p < 0,01$ ) e WMPir ( $p < 0,05$ ). No entanto, quando comparado com o grupo W, o grupo WMPir apresenta também valores inferiores ( $p < 0,05$ ) (Figura 3C). Durante a isquemia, os níveis da proteína diminuem no grupo Wistar ( $p < 0,05$ ), mas mantêm-se mais elevados que no grupo WM ( $p < 0,05$ ). O tratamento com piridoxamina permite manter, durante a isquemia, valores de Akt total mais elevados que no WM ( $p < 0,01$ ) (Figura 3C).

Na situação controlo verificou-se uma diminuição significativa da forma fosforilada da proteína (P-Akt) nos ratos WM, tanto em relação aos W ( $p < 0,001$ ), como ao WMPir ( $p < 0,05$ ) (Figura 3D). Na isquemia, os níveis de P-Akt diminuem no grupo W ( $p < 0,001$ ) e no grupo WM ( $p < 0,01$ ), quando comparados com os respectivos controlos. Porém, os grupos W e WMPir mantêm, durante a isquémia, valores superiores deste parâmetro em relação ao grupo WM ( $p < 0,05$ ) (Figura 3D).



**Figura 3: Akt total, Akt fosforilada, JNK total e JNK fosforilado no tecido cardíaco.**

As % de Akt total e fosforilada e as % de JNK total e fosforilada no tecido cardíaco dos ratos W, WM e WMPir com 6 meses de vida (grupos controlo e isquémicos) foram determinada por Western Blot, com marcação específica para estas proteínas.

A- % relativa dos níveis de JNK em relação ao grupo Wc/actina.

B- % relativa dos níveis de JNK fosforilada em relação ao grupo Wc/actina.

C- % relativa dos níveis de Akt em relação ao grupo Wc/actina.

D- % relativa dos níveis de Akt fosforilada em relação ao grupo Wc/actina.

Membranas representativas dos níveis destas proteínas.

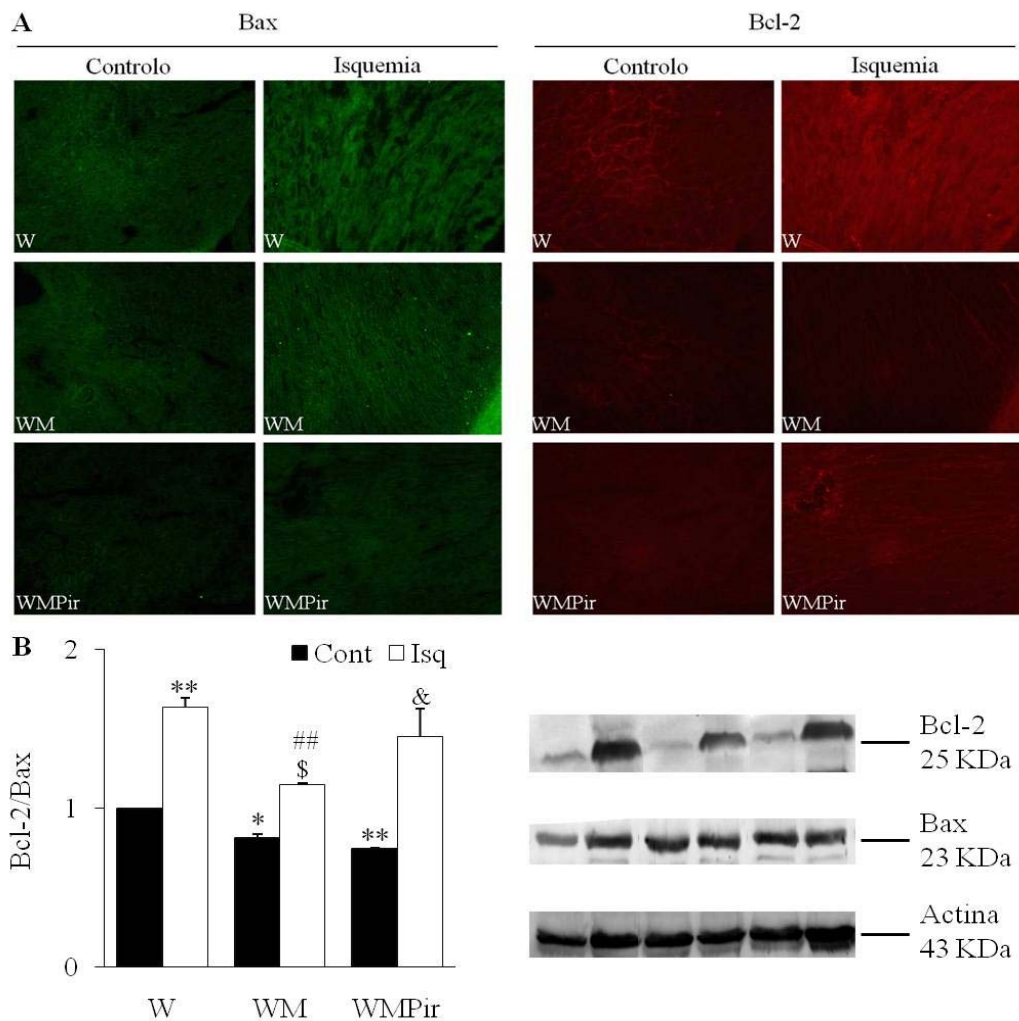
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  epm, n=2

\*p<0,05 vs Wc; \*\*p<0,01 vs Wc; \*\*\*p<0,001 vs Wc; #p<0,05 vs WMc; ##p<0,01 vs WMc; &&p<0,01 vs WMPir c; \$<0,05 vs Wi; ¥p<0,05 vs WMi; ¥¥p<0,01 vs WMi (teste T de Student).



## -Apoptose

A **Bax**, proteína pró-apoptótica, encontra-se aumentada no grupo W submetido a isquemia quando comparado com o respectivo controle ( $P<0,05$ ) (Figura 4A). Nos outros grupos esse aumento não se observa porque os respectivos controles têm maior expressão de Bax que o grupo W controle ( $P<0,05$ ) (Figura 4A).



**Figura 4 – Bax e Bcl-2 no tecido cardíaco.**

A - Imagens representativas dos cortes histológicos com marcação para Bax e Bcl-2. Os níveis de Bax e Bcl-2 presentes no tecido cardíaco dos ratos W, WM e WMPir com 6 meses de vida (controles e isquêmicos), avaliados pela técnica imuno-histoquímica através da marcação com anticorpos específico (n=2, ampliação de 200x).

B – Relação Bcl-2/Bax no tecido cardíaco nos grupos W, WM e WMPir (controles e isquêmicos). Os níveis das proteínas foram avaliados por Western Blot, com marcação específica para as mesmas e, ao lado do gráfico, as membranas representativas.

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  epm, n=2.

\* $p<0,05$  vs Wc; \*\* $p<0,01$  vs Wc; ## $p<0,01$  vs WMc; & $p<0,05$  vs WMPirc; \$ $p<0,05$  vs Wi (teste T de Student).

Relativamente à **Bcl-2**, proteína anti-apoptótica, aumenta em todos os grupos após isquemia, sendo mais evidente no grupo W e no grupo tratado com piridoxamina ( $P < 0,05$ ) (Figura 4A).

O cálculo da **razão Bcl-2/Bax** mostra que, na situação controlo, esta diminui nos grupos WM e WMPir em relação ao grupo W ( $p < 0,05$ ). Após isquemia existe um aumento significativo desta razão, sendo mais evidente no grupo W ( $p < 0,01$ ). Nesta condição mantem-se uma diminuição significativa no grupo WM em relação ao grupo W ( $p < 0,05$ ), que deixa de se observar no grupo tratado com Piridoxamina (Figura 4B).

## D - DISCUSSÃO

O facto de os ratos dos diferentes grupos não terem mostrado diferenças significativas nos **parâmetros metabólicos gerais**, nomeadamente aqueles relacionados com o metabolismo da glicose, permitiu-nos inferir que as alterações encontradas a nível cardíaco não se deveram a alterações do perfil glicémico dos ratos, mas sim a efeitos directos do metilglioxal.

O metilglioxal (MG) é um dos agentes glicantes mais potentes formados endogenamente (Ahmed et Thornalley 2007), resultando da fragmentação por glicoxidação de produtos Amadori na presença de iões metálicos de transição, sendo também gerado por vias glicolíticas acessórias durante a peroxidação lipídica e a glicólise. Este composto de cadeia curta reage com grupos amina de várias moléculas dando origem aos AGEs (Negre-Salvayre et al 2009).

A comparação dos níveis de AGEs e RAGEs no presente trabalho torna-se imprescindível já que existem evidências recentes que mostram que a acumulação de AGEs e a sua interacção com os seus receptores têm um papel importante na fisiopatologia das complicações da diabetes em vários órgãos, incluindo o coração (Chang et al, 2009; Ma et al, 2009; Negre-Salvayre et al, 2009; Price et Knight, 2007; Yan et al, 2004; Wang et al, 2010). Os AGEs são um grupo heterogéneo de compostos acumulados na diabetes devido a vários factores

(aumento da disponibilidade de substratos hidrocarbonados reactivos, condição oxidativa que favorece a glicação e destoxificação alterada) (Ma et al, 2009; Vander Jagt et Hunsaker, 2003). As proteínas são alvos clássicos destas reacções, a glicação afecta as proteínas circulantes (albumina sérica, lipoproteínas, insulina, hemoglobina) e geralmente impede a sua função biológica. A insulina glicada é incapaz de regular a homeostase da glicose *in vivo* e de estimular o transporte da glicose e a lipogénese do tecido adiposo (Negre-Salvayre et al, 2009). A albumina sérica glicada representa a maior porção de AGEs em circulação e é responsável por gerar stress oxidativo e ter uma acção pro-inflamatória que resulta em disfunção endotelial (Negre-Salvayre et al, 2009). A glicação de lipoproteínas também tem efeitos prejudiciais, LDLs glicadas e LDL-AGES estão associadas a aterosclerose acelerada por provocarem maior stress oxidativo, alterações no endotélio e promoverem a migração e a acumulação de monócitos/ macrófagos nas lesões ateroscleróticas (Negre-Salvayre et al, 2009). As LDLs glicadas são pro-trombogénicas pois aumentam a reactividade das plaquetas aos agentes agregantes. No que toca às HDL, a glicação da apoA-1 diminui muito a actividade protectora de transporte reverso do colesterol desta lipoproteína (Negre-Salvayre et al, 2009).

Os AGEs formam ligações cruzadas com proteínas da matriz extracelular podendo alterar marcadamente e de imediato esse ambiente, ou reagem com o seu receptor específico (RAGE) contribuindo para o stress oxidativo e sinalização pro-inflamatória implicada na disfunção endotelial, rigidez arterial e complicações microvasculares desta doença (Negre-Salvayre et al, 2009).

Yan et al (2001) referem mesmo que os RAGEs e os seus ligandos funcionarão como uma memória nociva que perdura nas complicações diabéticas. Vários estudos (Diabetes Control and Clinical Trials Group-DCCT e Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group-EDIC) mostraram que pacientes que tiveram um controlo

glicémico muito rigoroso logo desde início tinham uma diminuição da espessura da íntima e média da artéria carótida e que este efeito se prolongava no tempo após libertação dos pacientes deste rigoroso controlo. Outro estudo (United Kingdom Prospective Diabetes Study, UKPDS) mostrou que o risco de complicações diabéticas está ligado à hiperglicemia e que a redução precoce da hemoglobina glicada está associada a um menor risco de enfarte do miocárdio. Mesmo quando os valores de hemoglobina glicada eram comparáveis aos dos outros doentes sem controlo glicémico precoce, os benefícios deste pareceram ser de longa duração (Yan et al, 2004). O organismo terá esta má “memória hiperglicémica” devido à acumulação de AGEs nos tecidos diabéticos e à sua interacção com os RAGEs (Yan et al, 2004). Os AGEs, através dos seus receptores, afectam propriedades de muitos tipos celulares que estão implicados ou modificados nas complicações da diabetes (monócitos, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas) afectando a quimiotaxia, a expressão de moléculas pró--inflamatórias e pró-trombóticas, a proliferação celular, a produção de interleucinas, a expressão de moléculas de adesão, a produção de colagénio e a migração celular, entre outras. A própria interacção dos AGEs com os RAGES leva à sobreexpressão destes mesmos receptores tendo como consequência a geração de um ciclo vicioso lesivo com alterações na expressão génica pró-inflamatória (Yan et al, 2004). Os mesmos autores mostraram que o bloqueio dos RAGEs em modelos de ratos diabéticos por streptozotocina diminui a aterosclerose. Segundo Ma et al (2009) corações de modelos diabéticos induzidos por streptozotocina, apresentavam níveis de MG, AGEs e RAGEs mais elevados e a diabetes diminuía marcadamente a contractilidade do ventrículo esquerdo, alteração que não se verificava aquando o *knockdown in vivo* do gene dos RAGE.

Assim, a diminuição dos **níveis de AGEs** no grupo WMPir em comparação com o WM permite-nos aceitar que esse grupo terá benefícios em relação ao grupo ao qual não foi

administrada a piridoxamina, benefícios que, pelo menos nestes estudos iniciais, se comprovam com os resultados que obtivemos na quantificação dos outros parâmetros.

Apesar dos avanços em Cardiologia, a insuficiência cardíaca continua a ser umas das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Como os miócitos têm uma capacidade de auto-renovação muito limitada o contributo da morte celular inapropriada, nomeadamente pela via de morte celular programada (apoptose), para a remodelação ventricular e insuficiência cardíaca é gravoso (Shao et al, 2006). A Akt ou proteína cinase B é considerada a reguladora central da sobrevivência dos cardiomiócitos após danos isquémicos, quer *in vitro*, quer *in vivo* (Shao et al, 2006). A activação (fosforilação) da Akt mostrou suprimir a apoptose induzida pela hipóxia numa variedade de modelos celulares e também em miócitos ventriculares (Shaw et Kirschenbaum, 2006), tendo também reduzido a apoptose e a dimensão da zona enfartada em corações com enfarte do miocárdio (Matsui et al, 2001). A JNK, que pertence às vias das proteínas activadoras da mitogénese (MAPK), é uma proteína cinase activada pelo stress, e o seu papel no destino celular é controverso podendo promover a apoptose ou ter efeitos citoprotectores. Shao et al (2006) mostraram que, apesar desta dualidade, a JNK activa/ fosforilada é necessária para a reactivação da Akt depois da lesão isquémica. A inibição da JNK leva à diminuição da actividade da Akt com consequências graves, pois os efeitos protectores da JNK, via Akt, são determinantes para a sobrevivência dos cardiomiócitos após a hipóxia (Shao et al, 2006). O papel pro-apoptótico da JNK poderá ter a ver com a sua activação crónica; estudos anteriores (Yamawaki et al, 2008) tiveram resultados que revelaram que o metilglioxal mediava inflamação vascular via JNK e p38 em células endoteliais humanas. No presente trabalho, os grupos W e WMPir respondem na isquemia com um aumento dos níveis de **P-JNK** (citoprotectora) em relação aos controlos, o que não se verifica nos WM, estando hipoteticamente, disponível para reactivar a Akt após a isquemia. A Piridoxamina administrada conduziu a níveis de **Akt** e **P-Akt** superiores aos do

WM. A P-JNK no grupo WM aparenta estar cronicamente activa, pois, na situação controlo, apresenta valores superiores aos outros grupos, não havendo subida dos mesmos após a isquemia. Assim, a P-JNK poderá estar então a desempenhar um papel deletério em vez de protector.

Uma das lesões celulares mais comuns na clínica médica é a lesão isquémica. A isquemia traduz-se por uma redução do fluxo sanguíneo, normalmente devida a uma obstrução mecânica no sistema arterial e é a expressão clínica mais comum de lesão celular por privação de oxigénio. Ao contrário do que sucede na hipóxia, em que a falta de oxigénio é compensada pela produção de energia pela via glicolítica, os tecidos isquémicos não recebem os substratos para a glicólise, ou então a função glicolítica fica inibida pela acumulação de metabolitos que teriam sido removidos por um fluxo sanguíneo normal. Assim, a isquemia lesa os tecidos mais rapidamente do que a hipóxia. Ocorrem, em diversos sistemas celulares, alterações patológicas complexas durante a isquemia, durante um período de tempo variável. Dependendo do tipo de célula, as lesões poderão ser reparáveis e as células recuperadas se o fluxo sanguíneo for restaurado (Kumar, Abbas et al. 2005). Por outro lado, se a isquemia se prolongar, ocorrem danos irreparáveis no DNA e nas membranas celulares, levando a morte, independentemente de ocorrer reperfusão ou não. Esta lesão irreversível manifesta-se histologicamente por necrose dos tecidos, mas a apoptose tem um papel primário neste processo (Kumar, Abbas et al. 2005).

A apoptose tem também influência nas lesões de reperfusão (Gottlieb et al, 1994; Shao et al, 2006) e estudos reportaram a presença de células apoptóticas na zona peri-necrótica/zona de penumbra durante a reperfusão (Zhao et al, 2001) e sugeriram que entender o contributo desta via de morte celular poderá ajudar a identificar novas estratégias terapêuticas (Zhao et Vinten-Johansen, 2002). Uma ligação entre a apoptose e a reperfusão é apoiada por estudos que demonstram o papel da enzima superóxido dismutase e a formação de ROS na activação

de factores pró-apoptóticos. Logo, um repressor da apoptose seria capaz de inibir este processo e reduzir a extensão de enfartes do miocárdio (Donath et al, 2006; Shaw et Kirschenbaum, 2006; Zhang et Herman, 2006).

A Bax, pró-apoptótica, e a Bcl-2, anti-apoptótica, participam, com papéis opostos, na via intrínseca/ mitocondrial da apoptose. Esta via é o resultado de um aumento da permeabilidade mitocondrial com a libertação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma. Contrariando isto, factores de crescimento e outros sinais de sobrevivência estimulam a produção de proteínas anti-apoptóticas da família da Bcl-2. No final, a razão entre os factores pró e anti-apoptóticos vai determinar a iniciação ou não da cascata das caspases e posterior activação da caspase-9 (Kumar, Abbas et al. 2005).

Com base nestes dados e nos nossos resultados, podemos afirmar que, apesar de numa situação de não agressão o grupo com administração de Piridoxamina não mostrar grandes diferenças na **relação Bcl-2/Bax** em relação ao grupo WM, durante a isquemia o primeiro consegue desenvolver mecanismos anti-apoptóticos/protectores, não tão expressivos como o grupo W, mas aparentemente melhores que o grupo WM. Podemos dizer que o MG contribuirá, directa ou indirectamente, para que os diabéticos tenham maiores áreas de enfarte e insuficiências cardíacas mais graves.

Estes resultados estão em conformidade com muitos outros (Yamawaki et al, 2008; Yuen et al, 2010; Wang et al, 2010), incluindo os previamente realizados no nosso laboratório, que mostram o papel prejudicial do MG.

Os resultados que obtivemos com a piridoxamina são, à partida, muito satisfatórios, melhorando o perfil de ratos tratados previamente com MG, estando em sintonia com outros trabalhos (Chang et al, 2009; Metz et al, 2003; Voziyan et Hudson, 2005), que estudaram os efeitos da piridoxamina e outros inibidores da formação de AGES que, se associados ao conjunto de fármacos utilizados na diabetes, trarão benefícios ao doente.

## E - REFERÊNCIAS

- Ahmed, N. and P. J. Thornalley (2007). "Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?" Diabetes Obes Metab **9**(3): 233-245.
- Alpert, J. S. (2003). "Diabetes mellitus and the risk for cardiovascular disease." Curr Cardiol Rep **5**(5): 337.
- Brouwers, O., P. M. Niessen, et al. (2010). "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 **53**(5): 989-1000.
- Chang, K. C., J. T. Liang, et al. (2009). "Prevention of arterial stiffening by pyridoxamine in diabetes is associated with inhibition of the pathogenic glycation on aortic collagen." Br J Pharmacol **157**(8): 1419-1426.
- Choi, D., K. C. Hwang, et al. (2009). "Ischemic heart diseases: current treatments and future." J Control Release **140**(3): 194-202.
- Donath, S., P. Li, et al. (2006). "Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress." Circulation **113**(9): 1203-1212.
- Fox, C. S. (2010). "Cardiovascular disease risk factors, type 2 diabetes mellitus, and the Framingham Heart Study." Trends Cardiovasc Med **20**(3): 90-95.
- Gottlieb, R. A., K. O. Burleson, et al. (1994). "Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes." J Clin Invest **94**(4): 1621-1628.
- Kumar, V., A. K. Abbas, et al. (2005). Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, Elsevier Saunders.
- Ma, H., S. Y. Li, et al. (2009). "Advanced glycation endproduct (AGE) accumulation and AGE receptor (RAGE) up-regulation contribute to the onset of diabetic cardiomyopathy." J Cell Mol Med **13**(8B): 1751-1764.
- Matsui, T., J. Tao, et al. (2001). "Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo." Circulation **104**(3): 330-335.
- Metz, T. O., N. L. Alderson, et al. (2003). "Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications." Arch Biochem Biophys **419**(1): 41-49.
- Negre-Salvayre, A., R. Salvayre, et al. (2009). "Hyperglycemia and glycation in diabetic complications." Antioxid Redox Signal **11**(12): 3071-3109.
- Onorato, J. M., A. J. Jenkins, et al. (2000). "Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine." J Biol Chem **275**(28): 21177-21184.
- Piot, C. A. and C. L. Wolfe (1997). "Apoptosis: A New Mechanism of Lethal Myocardial "Reperfusion Injury"?" J Thromb Thrombolysis **4**(1): 67-68.
- Price, C. L. and S. C. Knight (2007). "Advanced glycation: a novel outlook on atherosclerosis." Curr Pharm Des **13**(36): 3681-3687.
- Shao, Z., K. Bhattacharya, et al. (2006). "c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury in vitro and in vivo." Circ Res **98**(1): 111-118.
- Shaw, J. and L. A. Kirshenbaum (2006). "Prime time for JNK-mediated Akt reactivation in hypoxia-reoxygenation." Circ Res **98**(1): 7-9.
- Thangarajah, H., D. Yao, et al. (2009). "The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13505-13510.



- Vander Jagt, D. L. and L. A. Hunsaker (2003). "Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase." Chem Biol Interact **143-144**: 341-351.
- Voziyan, P. A. and B. G. Hudson (2005). "Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage." Cell Mol Life Sci **62**(15): 1671-1681.
- Wang, X. L., W. B. Lau, et al. (2010). "Methylglyoxal increases cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury via glycative inhibition of thioredoxin activity." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(2): E207-214.
- Yamagishi, S., T. Matsui, et al. (2008). "Blockade of the advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) system is a possible mechanism for sustained beneficial effects of multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes." Med Hypotheses **71**(5): 749-751.
- Yamawaki, H., K. Saito, et al. (2008). "Methylglyoxal mediates vascular inflammation via JNK and p38 in human endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **295**(6): C1510-1517.
- Yan, S. F., R. Ramasamy, et al. (2004). "RAGE and its ligands: a lasting memory in diabetic complications?" Diab Vasc Dis Res **1**(1): 10-20.
- Yuen, A., C. Laschinger, et al. (2010). "Methylglyoxal-modified collagen promotes myofibroblast differentiation." Matrix Biol **29**(6): 537-548.
- Zhang, Y. Q. and B. Herman (2006). "ARC protects rat cardiomyocytes against oxidative stress through inhibition of caspase-2 mediated mitochondrial pathway." J Cell Biochem **99**(2): 575-588.
- Zhao, Z. Q., D. A. Velez, et al. (2001). "Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion." Apoptosis **6**(4): 279-290.
- Zhao, Z. Q. and J. Vinten-Johansen (2002). "Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning." Cardiovasc Res **55**(3): 438-455.

## **Agradecimentos**

À minha mãe, pela paciência e apoio nas fases mais difíceis.

Ao Paulo por tudo. Pela ajuda, sem a qual este trabalho não estava feito, pelo apoio académico, prático e pela amizade.

À Professora Doutora Raquel Seiya e ao Professor Doutor Lino Gonçalves por me darem a oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório por tudo, em especial à Daniela por toda a colaboração no trabalho, e claro, pela amizade.

Ao Sr. Mário Simões pelo apoio técnico e sobretudo pela amizade e incentivo.

Aos meus amigos por estarem lá nas fases boas e más.

Este trabalho foi realizado no âmbito da colaboração entre o Instituto de Fisiologia e Unidade de Investigação Básica em Cardiologia, pertencentes ao IBILI e à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; Agradeço o apoio económico desta Faculdade na concretização do trabalho prático.