



## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Potencial efeito terapêutico da piridoxamina na  
disfunção endotelial macrovascular na diabetes tipo 2

Daniela Alexandra Ferreira Carvalho

---

2011





## DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Potencial efeito terapêutico da piridoxamina na disfunção endotelial macrovascular na diabetes tipo 2

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Professora Doutora Cristina Sena (Universidade de Coimbra)

Daniela Alexandra Ferreira Carvalho

---

2011



## AGRADECIMENTOS

A elaboração do presente trabalho, apesar do seu carácter individual, contou com o apoio e a colaboração directa ou indirectamente de várias pessoas. Neste sentido, expresso aqui, os meus sinceros agradecimentos particularmente,

À Professora Doutora Cristina Sena, orientadora da tese de mestrado, que possibilitou a intregação neste projecto, que permitiu a minha contínua aprendizagem e pela disponibilidade manifestada no esclarecimento de qualquer dúvida.

À Professora Doutora Raquel Seíça pela sua simpatia e ao Senhor Mário Simões pela boa disposição demonstrada.

À Ana Margarida Pereira, colega de mestrado, pela sua amizade e colaboração na execução da actividade laboratorial.

Ao Doutor Paulo Matafome, à Doutora Teresa Louro e à Doutora Joana Crisóstamo pelos bons momentos partilhados e auxílio no dia-a-dia.

À Daniela Santos Silva, pela sua alegria que contribuiu para um excelente ambiente de trabalho e pelo seu companheirismo e incentivo.

Ao Tiago Rodrigues pelas suas embirrações constantes repletas de bom humor que proporcionaram o desenrolar de um ambiente descontraído.

À Andreia Santos pelo seu irritante optimismo, apoio, paciência nos momentos de menos bom humor e pela sua disponibilidade em ouvir-me e auxiliar-me em absolutamente tudo.

A todos os meus amigos, que me auxiliaram a ultrapassar os constantes desafios do dia-a-dia.

Para finalizar aos meus pais, irmão e cunhada, pelo suporte emocional demonstrado ao longo deste percurso académico. Agradeço também aos meus avós, que apesar de não estarem fisicamente presentes, contribuíram em muito para o meu percuso académico e pessoal.



## RESUMO

A diabetes tipo 2 é uma patologia complexa que apresentou uma crescente prevalência nas últimas décadas e está associada a doenças vasculares. As doenças macrovasculares representam actualmente a principal causa de mortalidade na diabetes tipo 2. A disfunção endotelial, caracterizada genericamente pela reduzida disponibilidade de óxido nítrico (NO), é uma condição que precede o desenvolvimento de lesões sintomáticas e como tal, um marcador precoce de doença macrovascular. A hiperglicemia, dislipidemia, *stress* oxidativo, insulino-resistência estão na génese do desenvolvimento de doenças macrovasculares. Assim como a acumulação e a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) devido à hiperglicemia prolongada.

Com o aumento da compreensão patológica subjacente à disfunção endotelial, novas abordagens terapêuticas estão a ser alvo de estudo, como é o caso da piridoxamina. A descoberta de que a piridoxamina pode inibir reacções de glicação e consequentemente a formação de AGEs, estimulou o interesse por este composto, numa perspectiva de potencial agente farmacológico no tratamento de doenças vasculares associadas à diabetes. No entanto, a sua potencial acção farmacológica ao nível macrovascular permanece ainda por esclarecer.

Assim, este estudo teve como principal objectivo investigar o potencial efeito farmacológico da piridoxamina nos marcadores de função endotelial, *stress* oxidativo e glicação, num modelo animal de diabetes tipo 2, os ratos Goto-kakizaki (GK) e no respectivo modelo animal não diabético, os ratos Wistar (W).

Para tal, os ratos W e GK com 6 meses de idade foram sujeitos ao tratamento com piridoxamina durante 4 semanas. Os efeitos da piridoxamina foram investigados no relaxamento vascular dependente e independente do endotélio em segmentos de artéria aorta dos diferentes grupos. O perfil metabólico, a acumulação de N $\epsilon$ -carboximetil lisina (CML), a expressão do receptor para AGEs (RAGE), a actividade da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), os níveis de *stress* oxidativo, a integridade da via de sinalização cGMP/NO e os parâmetros da função renal foram avaliados.

Previamente demonstrou-se que os ratos GK apresentavam uma disfunção endotelial, elevados níveis de *stress* oxidativo e de CML e alterações na via de sinalização do cGMP/NO (Sena *et al*, 2011). Neste estudo verificou-se que o tratamento com piridoxamina diminuiu os níveis de triglicédeos e os níveis de *stress* oxidativo nos diferentes grupos de estudos. Por outro lado, nos ratos diabético a piridoxamina melhorou o vasorelaxamento dependente do endotélio

e aumentou a sensibilidade no vasorelaxamento independente do endotélio. Para além disso, verificou-se que a piridoxamina reduziu os níveis de CML nos ratos GK tratados que foi acompanhada pela diminuição da expressão dos níveis de RAGE nos segmentos da artéria aorta.

A via de sinalização do cGMP/NO nos ratos GK tratados com piridoxamina é revertida o que por si só explica os resultados positivos observados no vasorelaxamento dependente do endotélio nos ratos GK tratados. Este estudo, permite concluir que a piridoxamina reestabelece a função endotelial e melhora significativamente os níveis de glicação e de *stress* oxidativo e reduz a dislipidemia nos ratos GK tratados. A piridoxamina pode assim, vir a ser considerada como uma terapêutica adicional no tratamento da disfunção endotelial macrovascular na diabetes tipo 2.

**Palavras-Chave:** Diabetes tipo 2, Doenças macrovasculares, Disfunção endotelial, Glicação, Piridoxamina



## ABSTRACT

Type 2 diabetes is a complex pathology that showed an increasing prevalence in recent decades and is associated with vascular disease. Macrovascular diseases currently represent the leading cause of mortality and morbidity in type 2 diabetes. Endothelial dysfunction, characterized generally by the reduced availability of nitric oxide (NO), is a condition that precedes the development of symptomatic lesions and as such, an early marker of macrovascular disease. Hyperglycemia, dyslipidemia, oxidative stress, insulin resistance are at the root of the development of macrovascular disease. Just as the accumulation and formation of advanced glycation end products (AGEs) due to prolonged hyperglycemia.

With increased understanding of the underlying pathological endothelial dysfunction, new therapeutic approaches are to be investigated, as is the case of pyridoxamine. The discovery that pyridoxamine can inhibit glycation reactions and consequently the formation of AGEs, stimulated new interest in this compound from the perspective of a potential pharmacological agent in the treatment of vascular diseases associated with diabetes. However, its potential pharmacological action on macrovascular level remains to be fully elucidated.

Therefore, this study aimed to investigate the potential pharmacological effect of pyridoxamine on markers of endothelial function, oxidative stress, and glycation, in an animal model of type 2 diabetes, rats Goto-kakizaki (GK) and in the respective non-diabetic controls, normal Wistar rats (W).

To this end, W and GK rats at 5 months of age were subjected to treatment with pyridoxamine for 4 weeks. The effects of pyridoxamine vasorelaxation were investigated in endothelium-dependent and independent segments of the aorta of the different groups. The metabolic profile, the accumulation of N $\epsilon$ -carboxymethyl lysine (CML), the expression of the receptor for AGEs (RAGE), the activity of the enzyme nitric oxide synthase (eNOS), levels of oxidative stress, the integrity of cGMP/NO pathway and renal function were evaluated.

Previously it was demonstrated that GK rats showed endothelial dysfunction, high levels of oxidative stress and CML and alterations in cGMP/NO signaling pathway (Sena et al., 2011). In this study, treatment with pyridoxamine decreased triglyceride levels and oxidative stress in the different study groups. In diabetic GK rats, pyridoxamine was able to improve the endothelium-dependent vasorelaxation and increased sensitivity in endothelium-independent vasorelaxation. In addition, we found that pyridoxamine reduced levels of CML treated GK rats were accompanied by decreased expression levels of RAGE in the segments of the aorta.

The cGMP / NO signaling pathway in GK rats treated with pyridoxamine is reversed which explains and reinforces the positive results observed in endothelium-dependent vasorelaxation. This study enabled the conclusion that pyridoxamine restores endothelial function and significantly improves the levels of glycation and oxidative stress and reduces triglycerides in GK treated rats. Pyridoxamine can be an additional therapeutic option in the treatment of macrovascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes.

**Key words:** Type 2 diabetes, Macrovascular disease, Endothelial dysfunction, Glycation, Pyridoxamine

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xxi</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. Diabetes tipo 2 .....	3
2. Doenças Vasculares associadas à diabetes tipo 2.....	3
3. Função Endotelial .....	4
3.1 Efeitos vasculares do óxido nítrico .....	6
3.1.1 Produção de óxido nítrico .....	6
3.2 Disfunção endotelial .....	10
4. Mecanismos moleculares associados à disfunção endotelial.....	10
4.1 Stress Oxidativo.....	11
4.2 Insulino-Resistência.....	12
4.3 Hiperglicemia .....	13
4.3.1 Via dos polióis.....	13

4.3.2 Via da hexosamina .....	14
4.3.3 Via de activação da proteína cinase C (PKC) .....	14
4.3.4 Produtos finais da glicação avançada .....	15
5. Consequências clínicas associadas à disfunção endotelial .....	15
6. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) na diabetes .....	19
6.1 Formação de AGEs .....	19
6.2 Receptores para AGEs .....	21
6.3 Mecanismos de acção extracelulares dos AGEs .....	23
6.4 Mecanismos de acção intracelulares dos AGEs .....	24
6.5 Associação dos AGEs com a aterosclerose .....	24
6.6 Terapêutica para AGEs .....	25
6.7 Piridoxamina .....	25
7. Objectivos .....	27
<b>II. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
1. Materiais .....	31
1.1 Reagentes químicos e imunológicos .....	31
2. Modelos Animais e Tratamento .....	31
2.1 Glicemia e Peso Corporal .....	32
2.2 Colheita de sangue .....	32

2.3 Colheita de urina.....	32
2.4 Sacrifício dos animais e recolha de órgãos.....	32
2.5 Estudos Isométricos .....	33
2.6 Determinação dos níveis séricos de colesterol total, HDL e triglicéridos	
35	
2.7 Determinação dos níveis de 8-isoprotano .....	35
2.8 Determinação dos 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG).....	35
2.9 Determinação dos níveis de albumina .....	35
2.10 Homogeneizados de artéria aorta .....	35
2.11 Determinação da quantidade de proteína pelo método BCA.....	36
2.12 Determinação dos níveis de expressão de proteínas por Western Blot.	
.36	
2.13 Apresentação dos resultados e análise estatística.....	37
<b>III. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
1. Peso Corporal, perfil lipídico e glicémico .....	41
2. Marcadores de <i>stress</i> oxidativo .....	42
3. Avaliação da função renal.....	44
4. Níveis de glicação: CML e RAGE .....	45
5. Marcadores de disfunção endotelial: sistema enzimático eNOS e integridade da via cGMP/NO.....	46

6. Relaxamento dependente e independente do endotélio .....	47
<b>IV. DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>V. CONCLUSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADMA</b>	Dimetilarginina assimétrica
<b>AGE-R1</b>	Receptor para AGE oligossacaril transferase 48
<b>AGE-R2</b>	Fosfoproteína 80 K-H
<b>AGE-R3</b>	Galectina
<b>AGEs</b>	Produtos finais da glicação avançada
<b>Akt</b>	Proteína cinase B
<b>ALEs</b>	Produtos finais de lipoxidação avançada
<b>ALT-711</b>	3-fenacil-4,5-cloreto de dimetiltiazol
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>Bdk</b>	Bradicinina
<b>BFT</b>	Brometo de N-fenaciltiazol
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahidrobiopterina
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>Cav-1</b>	Caveolina-1
<b>CEL</b>	Carboxietil-lisina
<b>cGKs</b>	Proteínas cinases dependentes de cGMP
<b>cGMP</b>	Monofosfato de Guanidina Cíclico
<b>cKA</b>	Proteína cinase dependente de cAMP
<b>CML</b>	N <sup>ε</sup> -carboximetil lisina
<b>Cu<sup>2+</sup></b>	Cobre
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DDAA</b>	Dimetilarginina dimetilaminohidrolase
<b>EDHF</b>	Factor hiperpolarizante derivado do endotélio
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintetase endotelial
<b>ERK</b>	Cinase Regulada por sinal extracelular
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FAD</b>	Dinucleótido de Adenina Flavina
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ferro
<b>FMN</b>	Mononucleótido de Flavina
<b>GK</b>	Goto-Kakizaki

<b>GLUT</b>	Transportador de glicose
<b>GM-CFS</b>	<i>Granulocyte/macrophage colonystimulating factor</i>
<b>GTP</b>	Trifosfato de Guanosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HMGB1</b>	<i>High mobility group 1</i>
<b>HNE</b>	Hidroxinonenal
<b>HO<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>Hsp 90</b>	<i>Heat-shock Protein 90</i>
<b>ICAM</b>	Molécula de adesão intracelular
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferão- $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetase indutível
<b>IR</b>	Receptor tirosina cinase
<b>IRS-1</b>	Substrato receptor de insulina 1
<b>JAK</b>	Janus Cinase
<b>JNK</b>	Cinase do factor de transcrição c-Jun
<b>K<sup>+</sup></b>	Potássio
<b>LAM</b>	Molécula de adesão leucocitária
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baixa densidade
<b>L-NAME</b>	N <sup>o</sup> -Nitro-L-arginina
<b>LOX-1</b>	<i>Lectin-like oxidized LDL receptor-1</i>
<b>LR-90</b>	Metileno bis 4,4'- (- 2 clorofenilureído fenoxisobutírico)
<b>MAPK</b>	Cinases das proteínas activadoras da mitogénese
<b>MCP-1</b>	Proteína de quimioatracção de monócitos 1
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
<b>MDA</b>	Malonildialdeído
<b>MG</b>	Metilglioxal
<b>MMPs</b>	Metaloproteinases
<b>MOLD</b>	Dímero metilglioxal lisina
<b>NAD(P)H</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (fosfato)
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear $\kappa$ B
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintetase neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintetase
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigénio



<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anião superóxido
<b>8-OHdG</b>	8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>OPB-9195</b>	(6)-2-Isopropilidenohidrazono-4-oxo-tiazolidina-5-ilacetanilido
<b>oxLDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas
<b>P</b>	Piridoxamina
<b>PAI-1</b>	Inibidor do activador do plasminogénio 1
<b>PBS</b>	Tampão fosfato alcalino
<b>PGH<sub>2</sub></b>	Prostaglandina H2
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PHE</b>	Fenilefrina
<b>PI<sub>3</sub>K</b>	Fosfatidilinositol 3-Cinase
<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>RAGE</b>	Receptor dos produtos finais de glicação avançada
<b>ROS</b>	Espécies reactivas de oxigénio
<b>Ser</b>	Serina
<b>sGC</b>	Guanilato ciclase solúvel
<b>SNP</b>	Nitroprussiato de sódio
<b>sRAGE</b>	Forma solúvel do receptor de AGEs
<b>STAT</b>	Proteína transdutora de sinal e activadora de transcrição
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming growth factor β</i>
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TNF</b>	Factor de necrose tumoral
<b>t-PA</b>	Activador do plasminogénio tecidual
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VASP</b>	Fosfoproteína estimulada por vasodilatação
<b>VCAM</b>	Molécula de adesão das células vasculares
<b>VEGF</b>	Factor de crescimento do endotélio vascular
<b>vWF</b>	Factor von Willibrand
<b>W</b>	Wistar



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Produção de NO pela NOS.....	7
<b>Figura 2:</b> Estrutura da enzima eNOS. ....	8
<b>Figura 3:</b> Formação de NO nas células endoteliais.....	9
<b>Figura 4:</b> Início da disfunção endotelial precursora da aterosclerose. ....	17
<b>Figura 5:</b> Progressão da aterosclerose. ....	18
<b>Figura 6:</b> Placa aterosclerótica instável.....	18
<b>Figura 7:</b> Formação de AGEs pela reacção de Maillard.....	19
<b>Figura 8:</b> Estrutura do RAGE.....	22
<b>Figura 9:</b> Estrutura da piridoxamina. ....	25
<b>Figura 10:</b> Efeitos da piridoxamina nos parâmetros de stress oxidativo. ....	43
<b>Figura 11:</b> Efeitos da piridoxamina na albuminúria.....	44
<b>Figura 12:</b> Efeitos da piridoxamina nos níveis de expressão de CML e RAGE na aorta. ....	45
<b>Figura 13:</b> Efeitos da piridoxamina nos níveis de expressão da eNOS e VASP na aorta. ....	46
<b>Figura 14:</b> Curvas de dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME. ...	48
<b>Figura 15:</b> Curvas de dose-resposta à PHE.....	49



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Curva-dose resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP).....	34
<b>Tabela II:</b> Curva-dose resposta à acetilcolina (ACh).....	34
<b>Tabela III:</b> Curva dose-resposta à fenilefrina (PHE) .....	34
<b>Tabela IV:</b> Soluções utilizadas na técnica de <i>Western Blot</i> . .....	37
<b>Tabela V:</b> Peso corporal, glicemia em jejum e 2 horas após a administração intraperitoneal de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL nos diferentes grupos de estudo. ....	41
<b>Tabela VI:</b> Percentagem de relaxamento máximo e $-\log EC_{50}$ em segmentos isolados da artéria aorta em resposta a ACh e SNP no diferentes grupos de animais em estudo. ....	47



## I. INTRODUÇÃO

---





## 1. Diabetes tipo 2

A diabetes tipo 2 está a emergir rapidamente como um dos mais sérios desafios globais de saúde pública do século XX (Saini, 2010). Esta doença multifactorial é responsável pela mortalidade e morbilidade de 8% da população mundial, constituindo um grave problema económico em todo o mundo (Negre-Salvayre *et al*, 2009). O número de pessoas com diabetes tipo 2 cresce a cada ano em resposta a diversos factores, como: o envelhecimento, o sedentarismo e a obesidade populacional. Estima-se que o número de pessoas que sofrem de diabetes tipo 2 aumente de aproximadamente 171 milhões em 2000, para 366 milhões em 2030 (Baker *et al*, 2009; Wild *et al*, 2004), sendo a faixa etária com idades superiores a 65 anos a que apresenta um maior crescimento (Wild *et al*, 2004).

A diabetes tipo 2 é uma doença metabólica complexa e heterogénea (Newsholme *et al*, 2007) caracterizada pelo desenvolvimento progressivo de insulino-resistência que define a incapacidade de utilização de glicose durante a exposição a insulina por parte dos tecidos (Baker *et al*, 2009), deficiente produção de insulina por parte das células  $\beta$  (Meeuwisse-Pasterkamp *et al*, 2008) e hiperglicemia (Valace & Palace, 2002). A hiperglicemia associada a alterações no metabolismo dos hidratos de carbono, induz alterações em diversos tecidos, de particular relevância as doenças macrovasculares e microvasculares (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

Os factores ambientais também apresentam um papel preponderante no desenvolvimento de diabetes tipo 2 (Negre-Salvayre *et al*, 2009), para além da predisposição genética, a idade, a obesidade, a hipertensão, a dislipidemia e a reduzida prática de actividade física são importantes factores de risco (Cheng, 2005).

Contudo, é difícil estabelecer os mecanismos moleculares que estão associados à diabetes tipo 2 devido aos múltiplos factores envolvidos. Por outro lado, os estudos realizados são maioritariamente efectuados em roedores, dificultando a extrapolação para humanos, uma vez que, existem diferenças significativas nos mecanismos e conseqüentemente nos processos metabólicos (Guilherme *et al*, 2008).

## 2. Doenças Vasculares associadas à diabetes tipo 2

A diabetes tipo 2 não é apenas uma doença metabólica mas também uma doença vascular (Srikanth & Deedwania, 2007). Está associada a diversas complicações microvasculares, designadamente, retinopatia, nefropatia, neuropatia (Cade, 2008; Ergul, 2011) e macrovasculares, nomeadamente, doença cardiovascular, doença cerebrovascular (Soldatos & Cooper, 2006), aterosclerose (Creager *et al*, 2003) e obstrução vascular periférica (Cade, 2008; Ergul, 2011; Soldatos & Cooper, 2006).

As doenças macrovasculares afectam a estrutura e a função dos grandes vasos, artérias e veias, contrariamente às doenças microvasculares que afectam pequenos vasos, como os capilares (Cade, 2008). As doenças macrovasculares são o principal problema clínico, desenvolvendo-se em mais de 50% da população que sofre de diabetes tipo 2 e são responsáveis por 50% a 60% da mortalidade (Soldatos & Cooper, 2006). As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte em doentes que sofrem de diabetes tipo 2 (Hartge *et al*, 2007). Estes doentes apresentam um risco 4 vezes superior de desenvolverem doenças cardiovasculares, comparativamente à população normal (Cade, 2008).

Os principais factores para o desenvolvimento de doenças vasculares associados à diabetes tipo 2 incluem insulino-resistência, obesidade, dislipidemia, hiperinsulinemia, síndrome metabólica, hipertensão, hiperglicemia e tabagismo (van der Oever *et al*, 2010). A hiperglicemia crónica desempenha um papel importante nas complicações vasculares (Cade, 2008), devido aos seus efeitos adversos que afectam principalmente, as células endoteliais. Estas em condições de hiperglicemia; aumentam a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e o *stress* oxidativo implicado na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e na interacção de AGEs com o seu receptor (RAGE) (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

Para além da hiperglicemia, todos os factores mencionados anteriormente, permitem o desenvolvimento de um estado constante e progressivo de lesões na parede vascular, que se manifesta pelo desenvolvimento de disfunção endotelial (van der Oever *et al*, 2010). A disfunção endotelial é um marcador precoce e como tal desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças macrovasculares (Ergul, 2011). As doenças macrovasculares estão associadas, à acumulação de AGEs, a alterações na vasodilatação devido à diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), à disfunção das células musculares lisas, a elevada produção de factores de crescimento endotelial, a inflamação crónica, a danos na fibrinólise e aumento da agregação plaquetar (Cade, 2008).

### **3. Função Endotelial**

O endotélio é uma monocamada de células que reveste o lúmen dos vasos sanguíneos e forma uma barreira selectiva entre o sangue circulante e os restantes tecidos corporais (Ley & Reutershan, 2006), desempenhando um papel crítico na homeostase vascular (van der Oever *et al*, 2010). No entanto, o endotélio não é uma mera barreira física mas um tecido endócrino, parácrino e autócrino metabolicamente activo capaz de produzir substâncias vasoactivas e reguladoras que exercem um papel fisiológico activo, interagindo com diversos

tipos de células, designadamente, plaquetas, leucócitos e células musculares lisas (Ley & Reutershan, 2006; van der Oever *et al*, 2010).

A regulação do tónus muscular, do equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, da adesão e da migração de leucócitos, da actividade inflamatória são funções da responsabilidade das células endoteliais (Schalkwijk & Stehouwer, 2005).

A sua função é caracterizada pelos seguintes aspectos essenciais: i) possui um papel anticoagulante que promove a manutenção do sangue num estado fluído, ii) controla a troca de células, moléculas e plasma entre o sangue e os tecidos corporais, iii) regula o fluxo sanguíneo através da alteração da resistência vascular, iv) apresenta um papel na resposta inflamatória a agentes agressores, promovendo a transmigração de leucócitos do sangue para os tecidos através da expressão de moléculas de adesão e citocinas (Ley & Reutershan, 2006).

O endotélio produz substâncias vasoactivas que podem mediar a vasoconstrição ou a vasodilatação (Avogaro *et al*, 2008). A produção de vasodilatadores e vasoconstritores geralmente permanece em equilíbrio em condições fisiológicas normais (Hsueh & Quiñones, 2003). As substâncias vasodilatadoras produzidas pelo endotélio são o NO, a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o factor hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). As substâncias vasoconstritoras produzidas são a endotelina-1 (ET-1), a angiotensina II (Ang II), o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), (Avogaro *et al*, 2008; Gerci *et al*, 2001; Hadi & Suwaidi, 2007; Ley & Reutershan, 2006). A manutenção do equilíbrio entre a vasodilatação e a vasoconstrição é fundamental para a regulação do tónus muscular (Hadi & Suwaidi, 2007). Este equilíbrio é mantido pelas células endoteliais, integrando estímulos que regulam a função hemodinâmica (Busse & Fleming, 2006; Giannottiand & Landmesser, 2007).

As células endoteliais estão também envolvidas na produção de moléculas específicas que desempenham um papel fundamental na inflamação, designadas moléculas de adesão; dentre elas destacam-se as moléculas de adesão leucocitária (LAM), as molécula de adesão intracelular (ICAM) e as moléculas de adesão celular vascular (VCAM) (Hadi & Suwaidi, 2007).

A angiotensina II exerce efeitos nas células musculares lisas devido à estimulação da contracção, crescimento, proliferação e diferenciação. Também é responsável pela migração de monócitos e estimulação da produção de ICAM, VCAM e LAM (van der Oever *et al*, 2010). É responsável pelo aumento da expressão da proteína de quimioatração de monócitos 1 (MCP-1) que promove o movimento de monócitos para a parede dos vasos sanguíneos, estimula a agregação plaquetar e activa a NAD(P)H oxidase que é responsável pela produção de anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Hsueh & Quiñones, 2003).

O endotélio tem um papel proeminente na renovação da integridade da parede dos vasos sanguíneos (van der Oever *et al*, 2010). É responsável pela produção de moléculas pró-tromboticas como, o inibidor do activador do plasminogénio (PAI-1) e o factor von Willibrand (vWF) (Tabit *et al*, 2010). Regula a fibrinólise pela produção do activador de plasminogénio tecidual (t-PA) e do seu inibidor PAI-1 e restringe a activação da cascata de coagulação pela inibição das interacções entre trombosmodulina/proteína C, sulfato de heparano/anti-trombina e o factor tecidual/via do factor tecidual (Schalkwijk & Stehouwer, 2005; van der Oever *et al*, 2010).

### **3.1 Efeitos vasculares do óxido nítrico**

A vasodilatação mediada por factores produzidos pelo endotélio é conhecida desde 1980. No entanto, apenas 7 anos mais tarde se propôs o NO como mediador devido ao relaxamento induzido por nitritos em meio ácido na aorta de coelhos sujeitos a ablação prévia do endotélio (Moncada & Higgs, 2006). O NO é o vasodilatador melhor caracterizado e é provavelmente o mais importante. É um gás altamente reactivo e lipofílico (Potenza *et al*, 2009) que possui um peso molecular baixo, difunde-se rapidamente e apresenta um tempo de meia vida de apenas alguns segundos (Guerci *et al*, 2001), sendo o principal responsável pelo relaxamento dependente do endotélio (Avogaro *et al*, 2008).

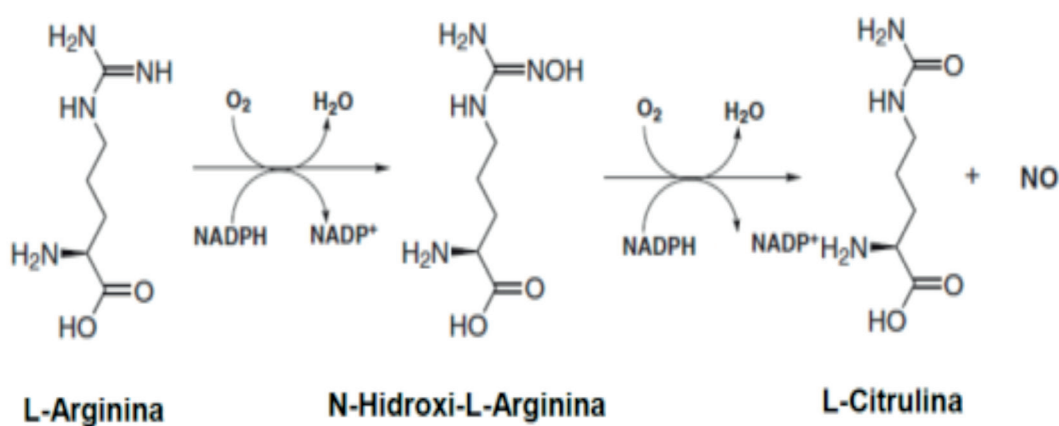
O NO é um importante vasodilatador com propriedades antioxidantes, anti-proliferativas, anti-inflamatórias, anti-coagulantes e anti-trombogénicas (Dudzinski & Michel, 2007; Schalkwijk & Stehouwer, 2005), responsável pela regulação de uma diversidade de processos celulares e fisiológicos. O NO é um componente chave na regulação do tónus vascular do endotélio, da migração e proliferação de células endoteliais e degradação da matriz extracelular, na função plaquetar, bem como na angiogénese e mitogénese que são cruciais na fisiologia vascular. Apresenta ainda a capacidade de inibir a interacção de leucócitos com as paredes dos vasos sanguíneos e deste modo reduz a inflamação e os processos pró-trombóticos (Kolluru *et al*, 2010). A inibição da adesão de leucócitos pelo NO, impede a expressão de VCAM-1 e MCP-1 induzida por citocinas (Schalkwijk & Stehouwer, 2005).

#### **3.1.1 Produção de óxido nítrico**

O NO é produzido pela conversão enzimática do aminoácido L-arginina em L-citrulina (Potenza *et al*, 2009). Esta reacção é mediada pelo complexo enzimá-

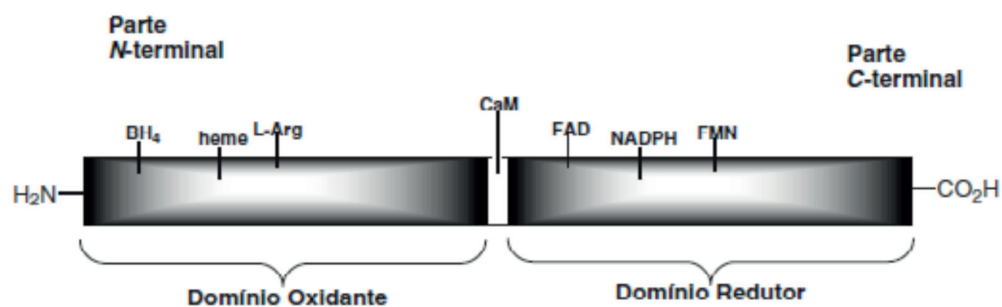
tico óxido nítrico sintetase (NOS) (Figura 1) (Avogaro *et al*, 2006; Dudzinski *et al*, 2006; Kolluru *et al*, 2010; van der Oever *et al*, 2010).

Presentemente, são conhecidas três isoformas de NOS. A primeira isoforma da NOS foi clonada e purificada no cérebro (NOS neuronal, nNOS), onde se sabe que o NO funciona como neurotransmissor. A segunda isoforma, NOS indutível (iNOS) foi isolada a partir de macrófagos e tem a particularidade de ser fortemente induzida por estímulos pró-inflamatórios e independente de cálcio. Curiosamente, a NOS endotelial (eNOS) foi a última a ser caracterizada. É importante salientar que todas as isoformas de NOS podem ser encontradas em mais do que um tipo de tecido e, para além do endotélio, a eNOS é igualmente expressa em plaquetas e no músculo cardíaco (Dudzinski *et al*, 2006).



**Figura 1:** Produção de NO pela NOS.

A eNOS é uma enzima que actua como um homodímero funcionalmente e estruturalmente dividida em dois grandes domínios: domínio C-terminal reductase e o domínio N-terminal oxigenase. O terminal carboxílico é o local de ligação para a NADPH, o dinucleótido de adenina flavina (FAD) e o mononucleótido de flavina (FMN), enquanto o terminal amínico contém o local de ligação para o grupo heme e tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e para o seu substrato L-arginina (Li *et al*, 2006). Sendo estes os principais substratos e co-factores funcionais da eNOS (Kolluru *et al*, 2010). Entre estes dois domínios encontra-se o local de ligação à calmodulina (CaM), que desempenha um papel fundamental na estrutura e função desta enzima (Figura 2) (Li *et al*, 2006).



**Figura 2:** Estrutura da enzima eNOS.

A eNOS é activada pelo aumento da concentração de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Kolluru *et al*, 2010) induzido pela ligação de agonistas a receptores acoplados a proteínas G (Nacci *et al*, 2009). O  $\text{Ca}^{2+}$  liga-se à CaM (Nacci *et al*, 2009), e seguidamente o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  interage com uma região específica da eNOS que promove a dissociação da enzima da proteína *scaffolding* caveolina-1 (Cav-1) e desencadeia a produção de NO (Nacci *et al*, 2009) (Figura 3).

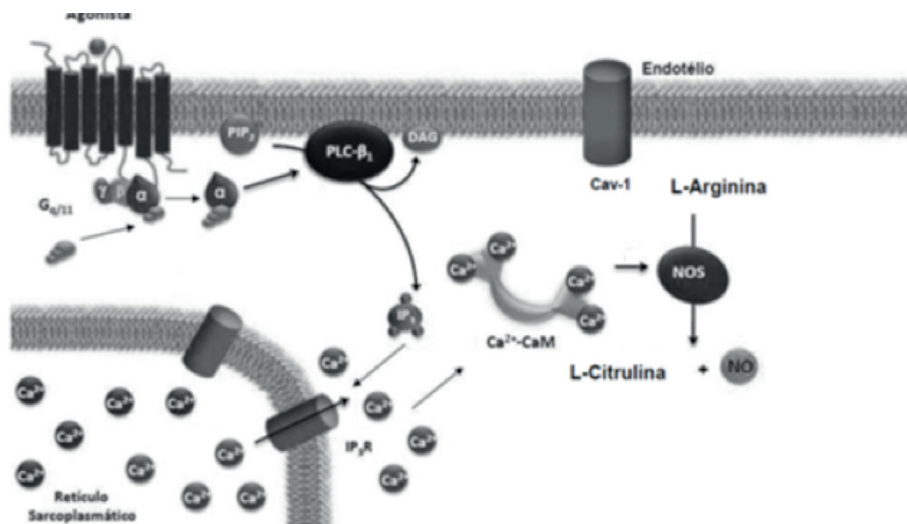
A ligação da CaM à enzima no seu domínio de ligação permite o fluxo de electrões do domínio reductase para o domínio oxigenase sendo depende da fosforilação e desfosforilação (Kolluru *et al*, 2010). Durante muito tempo considerou-se a eNOS uma enzima estritamente dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (Nacci *et al*, 2009, Potenza *et al*, 2009).

Um aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  activa a CaM que fosforila os resíduos de serina (Ser), treonina (Thr), respectivamente, Ser617, Ser635, Ser1177 e Thr497 (utilizando a sequência de numeração de aminoácidos humana) conduzindo a activação da eNOS (Atochin & Huang, 2010; Kolluru *et al*, 2010). A fosforilação do resíduo de aminoácido Thr495, produz uma diminuição da actividade enzimática da eNOS (Kolluru *et al*, 2010), que interfere na ligação da CaM ao seu domínio de ligação (Förstermann, 2010). Por sua vez, a desfosforilação da Thr495, estimulada pela histamina e bradicinina, está associada com o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequentemente com o aumento da actividade da eNOS (Förstermann, 2010).

A actividade catalítica da eNOS é influenciada pela sua localização sub-celular nas *caveolae* (Michael *et al*, 1997). As *caveolae* são invaginações da membrana plasmática ricas em colesterol e esfingolípidos (Dudzinski & Michel, 2007; Kolluru *et al*, 2010) presentes em todas as células endoteliais (Avogaro *et al*, 2008).

Nestas estruturas está presente a proteína Cav-1 que interage com a eNOS inibindo reversivelmente a sua actividade (Michael *et al*, 1997). O processo de ligação da eNOS à Cav-1 nas *caveolae* é facilitado pela palmitoilação e miristoilação (Kolluru *et al*, 2010).





**Figura 3:** Formação de NO nas células endoteliais (Adaptado de Vicent *et al*, 2003).

Nas *caveolae* a eNOS é dependente da miristoilação irreversível da glicina no seu N-terminal, seguida de palmitoilação dos resíduos de cisteína (Cys), Cys15, Cys26. A N-miristoilação da eNOS é catalizada pela N-miristoiltransferase que reconhece uma sequência específica no N-terminal (Michel & Vanhoutte, 2010). A miristoilação é absolutamente necessária para a actividade da eNOS na membrana, enquanto a palmitoilação determina a localização subcelular da eNOS (Kolluru *et al*, 2010). A compartimentalização da eNOS nas *caveolae* é necessário para a interacção com proteínas reguladoras, para a transdução de sinais dependentes de fosforilação e de Ca<sup>2+</sup> (Kolluru *et al*, 2010) e como barreira para as células endoteliais (Avogaro *et al*, 2008)

A inibição da eNOS é contrariada pela CaM num processo adjuvado por *Heat-shock Protein 90* (Hsp 90) (Michael & Vanhoutte, 2010). A Hsp 90 é uma chaperona envolvida no tráfico e no *fold*ing de proteínas, modula a actividade da eNOS pelo aumento da afinidade da ligação da CaM à eNOS e o equilíbrio entre saída de NO e de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Dudzinski & Michel, 2007).

A actividade da eNOS pode ser induzida por diversos agonistas como, a acetilcolina, insulina, estrogénios, trombina, Ca<sup>2+</sup>, adenosina trifosfato (ATP), bradichina (Bdk), entre outros (Figura 3) (Atochin & Huang, 2010; Kolluru *et al*, 2010;). A Bdk, os estrogénio e a insulina activam a eNOS pela via de activação do fosfatidilinositol 3-cinase (PI<sub>3</sub>K)/ proteína cinase B (Akt). A Akt fosforila a eNOS no resíduo Ser1177 aumentando a sua actividade (Tabi *et al*, 2010).

Uma vez produzido, o NO difunde para as células musculares lisas, liga-se aos grupos heme do heterodímero α/β (Riad *et al*, 2008) da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) que é um importante receptor para esta molécula sinalizadora (Avogaro *et al*, 2008), activando-a e conduzindo à conversão de guano-

sina trifosfato (GTP) a guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Riad *et al*, 2008; Schäfer *et al*, 2010). O cGMP induz a diminuição da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  promovendo o vasorelaxamento das células musculares lisas (Guerci *et al*, 2001). O vasorelaxamento resulta da abertura dos canais de potássio ( $\text{K}^+$ ) dependentes de ATP e conseqüente hiperpolarização da membrana das células musculares lisas que inibe a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além da vasodilatação, o NO inibe a activação, secreção e agregação de plaquetas, previne a adesão de leucócitos e inibe a migração e proliferação das células musculares lisas (Potenza *et al*, 2009).

### 3.2 Disfunção endotelial

Como já foi referido, o endotélio é um tecido activo com funções fisiológicas importantes na manutenção do equilíbrio hemodinâmico e hemostático. O desempenho anómalo das suas funções é definido com disfunção endotelial, caracterizado clinicamente pela incapacidade das células endoteliais conduzirem a vasodilatação adequada quando estimuladas. Esta disfunção pode ser provocada por *stress* bioquímico ou físico (Yang & Ming, 2006), desequilíbrio entre a libertação de vasodilatadores e vasoconstritores (Jansson, 2007; Yang & Ming, 2006), aumento da proliferação das células musculares lisas e aumento do estado pró-inflamatório e pró-trombótico no vaso sanguíneo (Yang & Ming, 2006). A disfunção endotelial é considerada o primeiro passo na progressão da aterosclerose e doenças cardiovasculares (Potenza *et al*, 2009). Na disfunção endotelial verifica-se um aumento das interações com os leucócitos e as células musculares lisas. O endotélio perde as suas propriedades fisiológicas desenvolvendo-se um estado de vasoconstrição, inflamação, coagulação, trombose e proliferação (Potenza *et al*, 2009; van der Oever *et al*, 2010).

O principal marcador da disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade de NO, devido a uma redução da sua produção e/ou a uma perda da sua actividade biológica (van der Oever *et al*, 2010). A redução da bioactividade do NO pode resultar da diminuição da expressão da eNOS, da reduzida quantidade de co-factores e substratos para a eNOS, de danos na activação da eNOS e do consumo de NO pelas ROS (Jansson *et al*, 2007; Potenza *et al*, 2009).

### 4. Mecanismos moleculares associados à disfunção endotelial

A disfunção endotelial surge na diabetes tipo 2 (Sena *et al*, 2008) associada a diversos factores como a insulino-resistência, a hiperglicemia, a hipertensão, a



dislipidemia, a inflamação (Jansson, 2007; van der Oever *et al*, 2009) e o *stress* oxidativo (Tabit *et al*, 2010).

#### 4.1 Stress Oxidativo

O *stress* oxidativo está aumentado na diabetes e apresenta-se como a base para o desenvolvimento das suas complicações (Avogaro *et al*, 2008). Caracteriza-se pelo desequilíbrio entre os sistemas que produzem oxidantes e os mecanismos de defesa antioxidantes, resultando no aumento da produção de ROS, redução da protecção antioxidante e incapacidade de reparação dos efeitos produzidos pelas ROS (van der Oever *et al*, 2010). Em condições normais, existe um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes para a manutenção da homeostase (Dröge *et al*, 2002). As ROS são produtos do metabolismo do oxigénio ( $O_2$ ) celular e podem produzir efeitos benéficos e prejudiciais (Fatehi-Hassanabad *et al*, 2010). Podem interagir com vias de sinalização intracelular envolvidas no controlo da função vascular, causando danos nos lípidos, no DNA e nas proteínas. O  $O_2^{\bullet-}$  e o peróxido de oxigénio ( $H_2O_2$ ) são as principais ROS que intervêm na função vascular (Dröge *et al*, 2002). O  $O_2$  é responsável pela produção de  $O_2^{\bullet-}$ , que posteriormente pode ser convertido a  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase, a radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) pela reacção de Fenton e de Haber Weiss e a peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) pela reacção directa com o NO (Frey *et al*, 2009).

As ROS são pequenas moléculas de elevada reactividade devido à presença de electrões desemparelhados, sendo produzidas dentro das células através de diversas vias metabólicas e vias enzimáticas (Avogaro *et al*, 2008). A principal fonte de produção de ROS é a fosforilação oxidativa mitocondrial. O sistema de fosforilação oxidativa inclui cinco complexo multi-enzimáticos, denominados, complexo I, II, III, IV e ATP sintetase (Fatehi-Hassanabad *et al*, 2010). Aproximadamente 4% do  $O_2$  consumido na mitocôndria é convertido em ROS (Shen, 2010) e apenas 1 a 2% dos electrões transportados ao longo dos complexos enzimáticos, são capazes de reduzir o  $O_2$  a  $O_2^{\bullet-}$  que é captado e convertido a  $H_2O_2$  pela superóxido dismutase. A produção de  $O_2^{\bullet-}$  ocorre principalmente no complexo I (NADP desidrogenase) e no complexo III (ubiquinol-citocromo c oxiredutase) (Ballinger *et al*, 2002).

Para além da fosforilação oxidativa na mitocôndria as ROS podem ser produzidas pelas oxidases, designadamente, xantina oxidase, cicloxigenase, lipoxogenase, mieloperoxidasas, citocromo P450, hemeoxigenases, peroxidases, NADPH oxidase ou por desacoplamento da eNOS (Avogaro *et al*, 2008; Fatehi-Hassanabad *et al*, 2010; Negre-Salvayre *et al*, 2009). Entre estas enzimas a NADPH oxidase

é a principal fonte de produção de ROS nas células endoteliais (Frey *et al*, 2009). Evidências sugerem a correlação entre a actividade da NADPH oxidase e o desenvolvimento de disfunção endotelial e de aterosclerose (Avogaro *et al*, 2008).

Os níveis de ROS e os seus efeitos biológicos são regulados pela capacidade antioxidante dos sistemas biológicos em neutralizar, eliminar e reparar os danos causados nas células pelos ROS (Negre-Salvayre *et al*, 2009). Os sistemas antioxidantes celulares incluem sistemas de enzimas antioxidantes, nomeadamente, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase, tioredoxinas, assim como compostos não enzimáticos,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno, ascorbato e glutathione (Frey *et al*, 2009; Negre-Salvayre *et al*, 2009).

O aumento do *stress* oxidativo na estrutura vascular origina danos na biodisponibilidade de NO (Tabit *et al*, 2010). A biodisponibilidade de NO é determinada pelo equilíbrio entre a produção de NO pela eNOS e a redução do NO pelas ROS, particularmente o  $O_2^{\bullet-}$ . A eNOS cataliza a transferência de electrões da NADPH para o grupo prostético heme. Esta enzima requer o co-factor  $BH_4$  para a transferência de electrões para a L-arginina e produção de NO (Fatehi-Hassanabad *et al*, 2010).

A produção de NO é uma reacção acoplada com a reacção de dimerização da eNOS que é estabilizada pelo co-factor  $BH_4$ . O desacoplamento da eNOS aumenta a produção de  $O_2^{\bullet-}$  e conseqüentemente reduz a produção de NO (Tabit *et al*, 2010). O  $O_2^{\bullet-}$  reage rapidamente com o NO produzindo  $H_2O_2$  (Tabit *et al*, 2010). O  $O_2^{\bullet-}$  e o  $H_2O_2$  são responsáveis pela oxidação da  $BH_4$  (Förstermann, 2010), conduzindo ao desacoplamento da eNOS resultante da transferência de electrões para o  $O_2$  em vez da transferência para a L-arginina (Potenza, *et al*, 2009), aumentando a produção de  $O_2^{\bullet-}$  que reduz a disponibilidade de  $BH_4$  e promove o *stress* oxidativo (Tabit *et al*, 2010). O *stress* oxidativo resulta então numa reduzida biodisponibilidade de NO por uma combinação de eliminação directa e diminuição da sua produção, comprometendo assim a função endotelial (Wallace *et al*, 2010). O desacoplamento da eNOS no endotélio promove a disfunção endotelial e o *stress* oxidativo (Fatehi-Hassanabad *et al*, 2010).

## 4.2 Insulino-Resistência

A insulina é uma hormona vasoactiva que apresenta uma importante acção na estimulação da produção de NO no endotélio e por sua vez na vasodilatação, no aumento do fluxo sanguíneo e na captação de glicose pelo músculo-esquelético (Kim *et al*, 2006). A via de produção de NO no endotélio é regulada pelo sinal da insulina. A produção de NO em resposta à insulina resulta na activação do receptor tirosina cinase (IR), que conduz à fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1).

Em seguida, há o recrutamento e a activação da via de sinalização  $PI_3K$ , que fosforila e activa a Akt (Potenza *et al*, 2009) através do PDK-1 (Jansson, 2007). A Akt fosforila directamente a eNOS nos resíduos de Ser1177, resultando num aumento da actividade da eNOS e na produção de NO (Potenza *et al*, 2009).

Na presença de diabetes tipo 2 e insulino-resistência a activação da eNOS pela via  $PI_3K$ /Akt é inibida, devido a alterações no IRS-1 e na via de sinalização dependente de  $PI_3K$  resultando na redução da produção de NO nas células endoteliais e na diminuição da translocação do transportador de glicose (GLUT 4) nos tecidos periféricos, promovendo-se a disfunção endotelial e a insulino-resistência periférica (Kim *et al*, 2006). Nas células endoteliais, a insulina activa também a via cinase das proteínas activadoras da mitogénese (MAPK) através da GTPase Ras. Esta via de sinalização está associada com a expressão de ET-1 e de moléculas de adesão (Potenza *et al*, 2009).

Por sua vez, a insulino-resistência está associada com o aumento da libertação de ácidos gordos livres do tecido adiposo que resulta em dislipidemia, também esta um factor de risco de disfunção endotelial. Os ácidos gordos livres promovem a disfunção endotelial devido ao aumento da produção de ROS e a activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B que promove a inflamação e alterações na activação da eNOS (Potenza *et al*, 2009).

### 4.3 Hiperglicemia

A hiperglicemia é um factor importante para o desenvolvimento da disfunção endotelial. Os efeitos da hiperglicemia são promovidos através das seguintes vias: via dos polióis, via da hexosamina, via da proteína C cinase, via dos AGEs. Todas estas vias aumentam os níveis de ROS, promovendo o aumento do *stress* oxidativo (Brownlee, M 2005). O *stress* oxidativo produzido devido à hiperglicemia pode causar alterações na actividade enzimática da dimetilarginina dimetilaminohidrolase (DDAH), resultando num aumento de dimetilarginina assimétrica (ADMA), devido à sua estrutura similar com a L-arginina, ADMA, actua como um antagonista competitivo que se liga ao local catalítico da eNOS e inibe a formação de NO (Potenza *et al*, 2009).

#### 4.3.1 Via dos polióis

A via dos polióis baseia-se na actividade da enzima aldose reductase, esta catalisa a redução de aldeídos tóxicos a álcoois, assim como a redução de glicose a sorbitol. Neste último caso, esta reacção só é activada quando há uma

elevada concentração de glicose, devido à reduzida afinidade da aldose redutase por glicose. O co-factor da aldose reductase na redução da glicose a sorbitol é a NADPH que é oxidada a dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato oxidado (NADP<sup>+</sup>). Após a formação de sorbitol, este é convertido enzimaticamente através da enzima sorbitol desidrogenase a frutose, e simultaneamente ocorre a redução do dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (NAD<sup>+</sup>) a dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH).

O consumo de NADPH é importante, uma vez que, está envolvido na regeneração de uma importante enzima antioxidante, a glutathiona reduzida (Browlee, 2005). A glutathiona reduzida é uma enzima essencial na regulação do potencial redox intracelular, mantendo os níveis de *stress* oxidativo reduzidos. Os rácios NADPH/NADP<sup>+</sup> e NAD<sup>+</sup>/NADH são de crucial importância na manutenção da homeostase celular, mais especificamente nas reacções de oxidação-redução (Kawaito *et al*, 2009; Negre-Salvayre *et al*, 2009). O aumento da oxidação do NADPH a NADP<sup>+</sup> e NAD<sup>+</sup> a NADH devido aos elevados níveis de glicose nas células, diminuem a biodisponibilidade de NO (van den Oever *et al*, 2009). A diminuição dos níveis de NADPH induzidos pela via dos polióis conduz a uma redução da capacidade celular de regenerar a glutathiona redutase, um co-factor essencial do equilíbrio redox da célula e finalmente eleva o risco de *stress* oxidativo intracelular (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

#### **4.3.2 Via da hexosamina**

A via da hexosamina está associada à acumulação intracelular de frutose-6-fosfato e à sua conversão em glucosamina-6-fosfato através da enzima glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase. Por sua vez, a glucosamina-6-fosfato é convertida a UDP-N-acetilglucosamina que se liga a resíduos de serina e tirosina de vários factores de transcrição, aumentando a actividade do PAI-1 e do *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estes factores estão associados com o desenvolvimento das complicações diabéticas (Brownlee, 2005; Negre-Salvayre *et al*, 2009).

#### **4.3.3 Via de activação da proteína cinase C (PKC)**

A activação da via da PKC pela glicose intracelular é mediada pelo diacilglicerol (DAG). O diacilglicerol é um co-factor crítico para a activação das diversas isoformas da PKC. A activação da PKC desencadeada pelos elevados níveis de glicose intracelular participa na alteração da função de várias vias reguladoras

e da expressão génica (Negre-Salvayre *et al*, 2009). A activação das diferentes isoformas da PKC conduz à diminuição da produção de NO pela inibição da eNOS, a aumento dos níveis de ET-1, à activação de diferentes factores, nomeadamente TGF- $\beta$ , PAI-1, factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF), NF- $\kappa$ B, e de enzimas envolvidas na produção de  $O_2^{\bullet-}$  como, a NADPH oxidase (Negre-Salvayre *et al*, 2009; van der Oever *et al*, 2009). Estes eventos contribuem para o aumento do níveis de *stress* oxidativo e de inflamação que conduzem à disfunção endotelial e a respostas patogénicas como, o aumento da produção de colagénio, fibrose, deficiente permeabilidade capilar, fluxo sanguíneo e angiogénese (Negre-Salvayre *et al*, 2009), aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  e desacoplamento da eNOS (van der Oever *et al*, 2009).

#### 4.3.4 Produtos finais da glicação avançada

A glicação, designada também por glicosilação não-enzimática, foi descrita pela primeira vez por L. Maillard, no século XX. Esta reacção não enzimática ocorre na presença de açúcares redutores, nomeadamente glicose e fructose, que possuem a capacidade de reagir com os grupos amina de várias moléculas biológicas, designadamente, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos. Estas moléculas, ao sofrerem glicação, alteram as suas propriedades físicas e químicas, assim como, a sua função biológica, promovendo entre outros a disfunção endotelial. Através de um conjunto de reacções complexas e posteriores rearranjos moleculares, a glicação origina os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Brownlee, 2005; Goldin *et al*, 2007; Negre-Salvayre *et al*, 2009). Este tema será abordado posteriormente (secção 6).

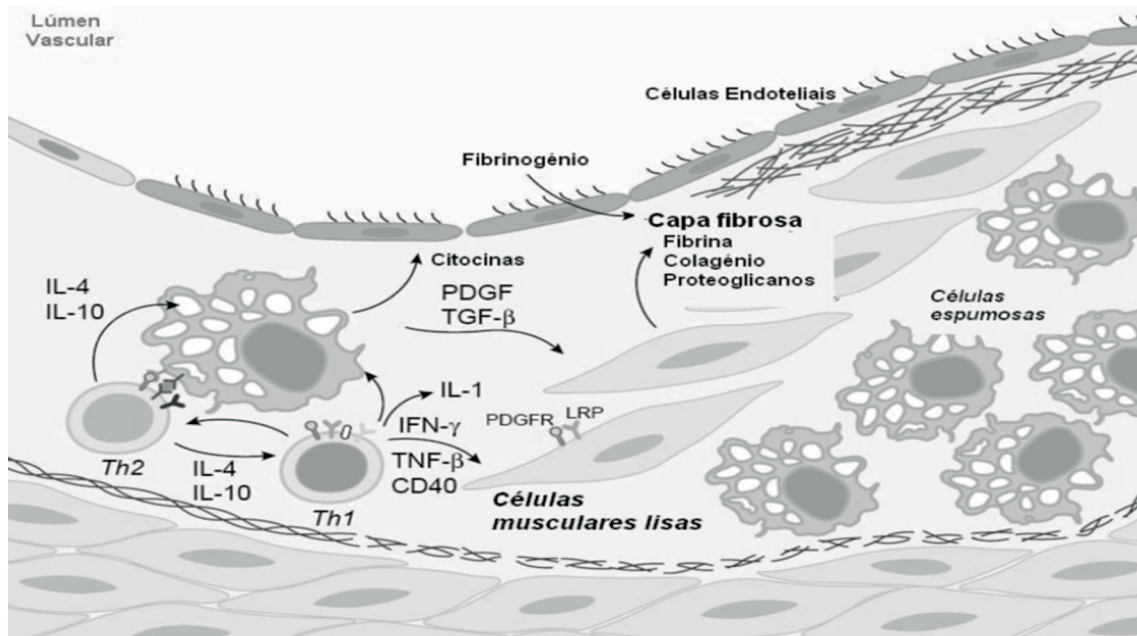
### 5. Consequências clínicas associadas à disfunção endotelial

A disfunção endotelial é considerada o primeiro passo no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose (Avogaro *et al*, 2006; Potenza *et al*, 2009). A aterosclerose é uma condição de inflamação crónica iniciada em resposta à disfunção no endotélio mantida através da interacção entre lipoproteínas modificadas, principalmente, lipoproteínas de baixa densidade (LDL), linfócitos T, macrófagos e constituintes da parede arterial. As LDL são um factor importante no desenvolvimento da disfunção endotelial, uma vez que o aumento da permeabilidade do endotélio facilita a acumulação de LDL no espaço subendotelial (Boyle, 2007). As LDL são partículas que contêm um núcleo hidrofóbico que contêm triglicerídeos e esterés de colesterol, circundadas por uma superfície hidrófila de fosfolípidos,

colesterol livre e proteínas, principalmente apolipoproteína B-100 que interage como ligando nos receptores da membrana (Badimón *et al*, 2009).

O processo de formação da placa aterosclerótica é um processo complexo (Soldatos & Cooper, 2006). A formação da placa de ateroma inicia-se pela acumulação de LDL no espaço subendotelial. As LDL aprisionadas são alvo da acção das ROS presentes (Libby, 2002), como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$  (Aikawa & Libby, 2004) e são oxidadas (oxLDL), conseqüentemente activam a fagocitose macrófágica. A subsequente acumulação de oxLDL induz a activação de macrófagos que expressam diversas moléculas inflamatórias, factores tecidulares, quimiocinas nas plaquetas, células sanguíneas, células endoteliais. Todos os factores mencionados contribuem colectivamente para o recrutamento, retenção e activação de células inflamatórias na parede vascular e conseqüentemente para o crescimento do ateroma (Libby, 2002). Nas lesões ateroscleróticas são produzidos numerosos factores quimiotácteis de monócitos, designadamente, MCP-1 que induz directamente a migração de monócitos para os tecidos. Os factores *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) e *granulocyte/macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) promovem a expressão de receptores *scavenger* que induzem a produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , TGF que estimulam a divisão celular, as quimiocinas CCL5 activadoras de linfócitos T e as endotelinas. Estes factores contribuem para a activação das células circundantes e para a proliferação das células musculares lisas e dos macrófagos. Os monócitos são activados por uma diversidade de moléculas pró- e anti-inflamatórias, incluindo interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12) e TNF- $\alpha$ , produzidas pelas células da camada íntima arterial em resposta à infiltração de lipoproteínas para o espaço subendotelial. Em resposta aos factores quimiotácteis libertados, os monócitos são mobilizados para o endotélio, iniciando o processo de adesão e passagem para o espaço subendotelial. Nas áreas de contacto dos monócitos, as células endoteliais activadas expressam diferentes factores de crescimento, moléculas de adesão e mediadores vasoactivos que regulam as propriedades de adesão do endotélio (Bui *et al*, 2009; Scott, 2004). As LDL são responsáveis pela diminuição da biodisponibilidade do NO, por redução da actividade da NOS, ou pela degradação do NO para a formação de peroxinitrito (Badimón *et al*, 2009). Quando na íntima arterial, os monócitos expressam receptores para a captura de oxLDL, diferenciam-se em macrófagos e posteriormente transformam-se em células espumosas, através da acumulação de esteres de colesterol no citoplasma dos macrófagos (Packard & Libby, 2008) (Figura 4).





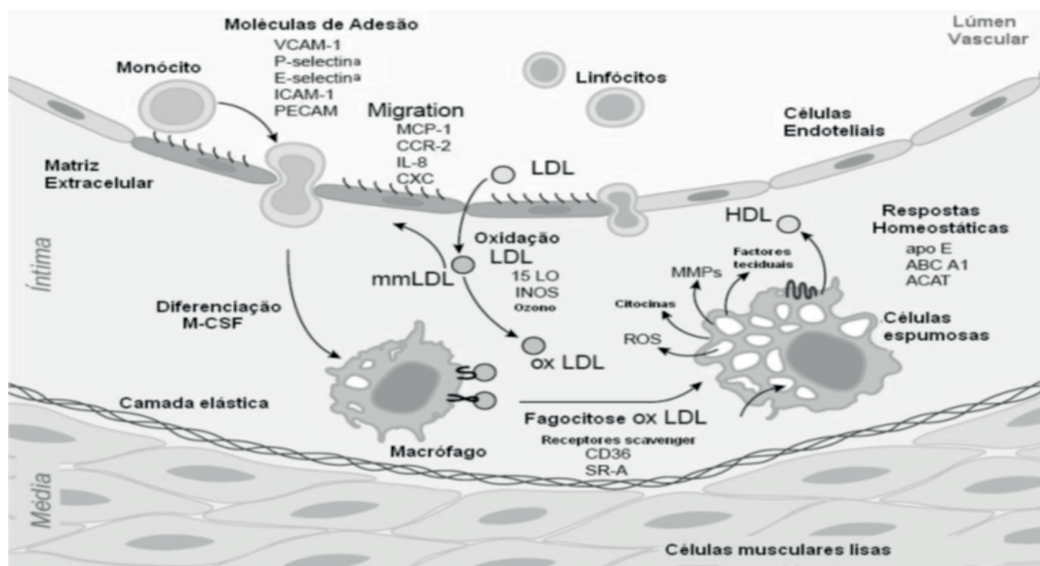
**Figura 4:** Início da disfunção endotelial precursora da aterosclerose (Adaptado de Scott, 2004).

Por sua vez, as células espumosas produzem citocinas e factores tecidulares que induzem uma resposta inflamatória e imunitária (Scott, 2004). A produção de mediadores inflamatórios, designadamente, IL-1, interferão- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e o factor de necrose tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), promove a proliferação das células musculares lisas e de moléculas da matriz extracelular, como o colagénio, que contribuem para o crescimento do ateroma e a formação da placa fibrosa envolvente (Scott, 2004; Stoll & Bendszus et al, 2006).

O contínuo processo de oxidação de LDL e a sua fagocitose perpetua a formação de ROS pelo macrófagos, assegurando a continuidade da formação de oxLDL no espaço subendotelial e conseqüentemente o aumento de células espumosas. Os macrófagos segregam proteases, como metaloproteinases (MMPs) que degradam os constituintes da matriz extracelular (Libby, 2002). Estes mecanismos e particularmente as interações de ligação de ligando-receptor, como por exemplo o sistema Faz-ligando/Faz-receptor, desencadeiam a apoptose das células espumosas, das células do músculo liso, dos linfócitos e macrófagos acumulados nesta região da parede vascular.

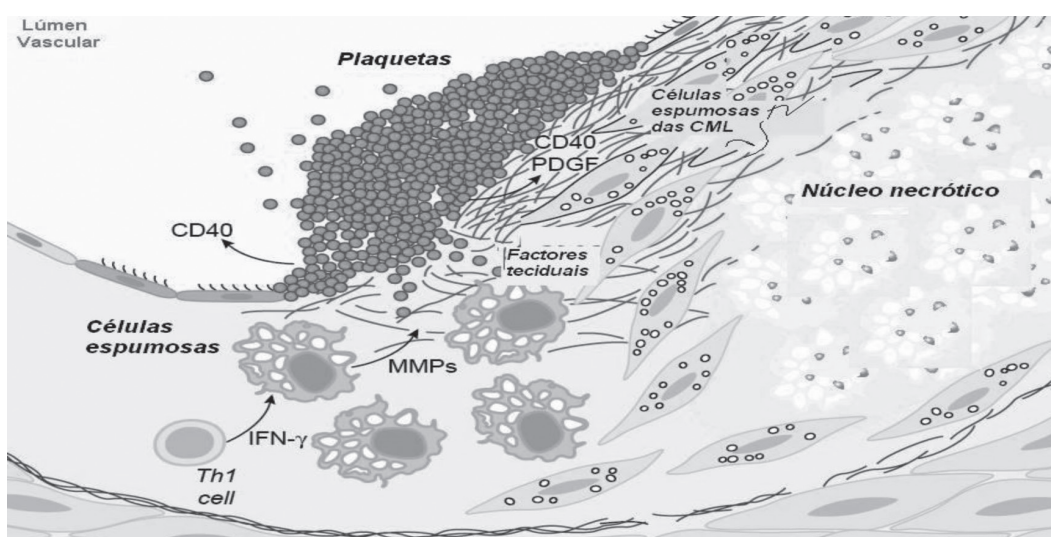
A libertação de conteúdos lisossomais e a vesiculação por morte celular, actuam nos constituintes extracelulares das células circundantes da parede vascular, prolongando a resposta inflamatória e imunitária, contribuindo para a instabilidade da lesão aterosclerótica (Figura 5) (Clarke *et al*, 2006; Tabas, 2005). Com a redução da capacidade de reciclagem do tecido, acumulam-se resíduos celulares, colesterol livre e lipoproteínas e produtos da matriz extracelular

(Scott, 2004; Tabas, 2005). A capacidade fagocítica não é eficiente e ocorre a necrose secundária das células espumosas seguida de coalescência lipídica e formação de um núcleo necrótico no centro da lesão aterosclerótica.



**Figura 5:** Progressão da aterosclerose (Adaptado de Scott, 2004).

Este núcleo é essencialmente constituído por células mortas e citocinas inflamatórias que promovem o aumento da inflamação e da instabilidade da placa (Schrijvers *et al*, 2007, Shah 2002) (Figura 6). A ruptura da placa expõe o núcleo necrótico e na corrente sanguínea, inicia-se a coagulação e o recrutamento de plaquetas e a formação de trombos que podem obstruir parcial ou totalmente o vaso sanguíneo (Schönbeck *et al*, 2000).



**Figura 6:** Placa aterosclerótica instável (Adaptado de Scott, 2004).

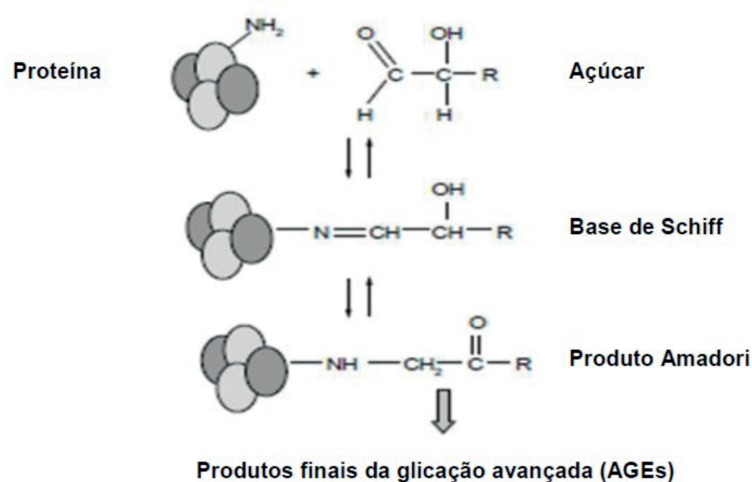


## 6. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) na diabetes

Existe um considerável conjunto de evidências que associam a formação e acumulação de AGEs como um factor importante no desenvolvimento das complicações diabéticas (Rahbar & Figarola, 2002). A persistente hiperglicemia, a dislipidemia e o *stress* oxidativo na diabetes actuam conjuntamente para a formação dos AGEs e a sua acumulação (Chang *et al*, 2009; Thomas *et al*, 2005).

### 6.1 Formação de AGEs

Os AGEs são um grupo complexo e heterogéneo de moléculas (Ahmed, 2005) formado através de reacções não enzimáticas entre açúcares redutores e resíduos amina presentes em lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Goh & Cooper, 2008). A via clássica da reacção de Maillard inicia-se pela reacção não enzimática dos grupos carbonilo, nomeadamente aldeídos e cetonas inseridos nos açúcares redutores com os grupos amina, predominantemente lisina e arginina, presentes nas proteínas, lípidos e ácidos nucleicos formando-se proteínas glicosiladas de forma reversível denominadas bases de Schiff (Soldatos & Cooper, 2006). As bases de Schiff são modificadas através de rearranjos que conduzem à produção de produtos de maior estabilidade, designados, produtos Amadori (Basta *et al*, 2004). A hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) e a frutossamina são exemplos de produtos Amadori (Monnier, 2003). Os produtos Amadori, possuem grupos carbonilo que reagem com grupos amina (Monnier, 2003) através de uma série de rearranjos, desidratações, e condensações para produzir produtos de forma irreversível (Wautier *et al*, 2004), designados AGEs (Rojas & Morales, 2004) (Figura 7).



**Figura 7:** Formação de AGEs pela reacção de Maillard.

Os açúcares redutores, nomeadamente, a glicose, galactose, frutose, ribose, assim como os intermediários do metabolismo dos glícidos, como, glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, ribose-5-fosfato, desoxirribose-5-fosfato e o gliceraldeído, os metabolitos da via do polioliol, designadamente, frutose ou frutose-3-fosfato e compostos carbonilo são capazes de reagir com os grupos amino de moléculas biológicas para formar AGEs (Negre-Salvayre *et al*, 2009). Os AGEs são caracterizados de acordo com a sua fluorescência ou não fluorescência e pela sua capacidade de formar *cross-links* (Ahmed, 2005).

Para além da reacção de Maillard, diferentes vias são descritas para a formação de AGEs (Peyroux & Sternberg, 2006). Estes podem ser formados através da auto-oxidação de monossacáridos, como a glicose. A glicose está em equilíbrio com a sua estrutura intermediária, designada enediol, que na presença de metais de transição reage para formar radical enediol. Este radical é oxidado pelo  $O_2$ , produzindo-se compostos dicarbonilo (ceto-aldeído) e  $O_2^{\bullet-}$ . Os compostos dicarbonilo reagem com os grupos amino das proteínas para formar compostos semelhantes aos produtos Amadori, no entanto mais reactivos que são capazes de originar AGEs (Ahmed, 2005). Os AGEs também podem ser formados através de precursores dicarbonílicos derivados de glicose formados intracelularmente, glioxal, metilglioxal (MG) e 3-desoxiglicosona. Actualmente considera-se, a elevada concentração de glicose o evento primário para desencadear a formação de AGEs intra e extracelularmente (Brownlee, 2005).

O MG é considerado o principal intermediário dicarbonilo reactivo intracelular (Peyroux & Sternberg, 2006). É formado através da glicólise pela reacção de desfosforilação de gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato catalizada pela enzima triose fosfato isomerase (Peyroux & Sternberg, 2006). O MG reage com os grupos livres lisina para formar AGEs como, carboxietil-lisina (CEL) ou o dímero metilglioxal lisina (MOLD) (Peyroux & Sternberg, 2006). Deve salientar-se que, durante as reacções que levam à formação de AGEs, formam-se ROS que contribuem em simultâneo *para o stress oxidativo* e para a ocorrência de danos estruturais e funcionais nas macromoléculas (Hidalgo & Zamora, 2005; Jay *et al*, 2006).

Para além das fontes endógenas de formação de AGEs mencionadas que são a via predominante de formação, estes também podem ser originados através de fontes exogéneas (Goh & Cooper, 2008). As fontes exogéneas de AGEs são o tabaco e os alimentos processados, especialmente aqueles que são sujeitos a elevadas temperaturas (Goh & Cooper, 2008; Magalhães *et al*, 2008). A formação de AGEs nos alimentos é potenciada pelos métodos de confecção que utilizam altas temperaturas e reduzida humidade, sendo os alimentos ricos em lípidos os principais contribuintes do conteúdo dietético de AGEs

(Goldberg *et al*, 2004). Dos AGEs ingeridos 10% são absorvidos, destes aproximadamente dois terços são retidos no organismo e apenas um terço é excretado na urina, nas seguintes 48 horas (Huebschamann *et al*, 2006). O fumo do tabaco é considerado uma importante fonte exogénea (Peppas *et al*, 2003) devido à volatilização de espécies reactivas, os AGEs são absorvidas pelos pulmões e interagem com proteínas séricas (Vlassara & Palace, 2002).

Quanto à sua eliminação, os AGEs podem ser eliminados através de diversas enzimas (Jakus *et al*, 2004). Os sistemas enzimáticos responsáveis pela redução dos níveis endógenos de AGEs são, a oxaldeído redutase e a aldose redutase envolvidas na destoxificação de intermediários dicarbonilo reactivos. O sistema de glicoxalases I e II, assim com as amadoriases, frutosamina-3-cinase e a frutosamina oxidase interferem nas reacções de glicação em diferentes etapas (Thornalley, 2003).

A remoção de AGEs formados nos componentes do tecido é realizada por proteólise extracelular ou através de células *scavenger* que endocitam os AGEs através dos receptores e após degradação intracelular libertam complexos AGE-peptídeos solúveis de reduzido peso molecular que são excretados na urina (Vlassara & Palace, 2003).

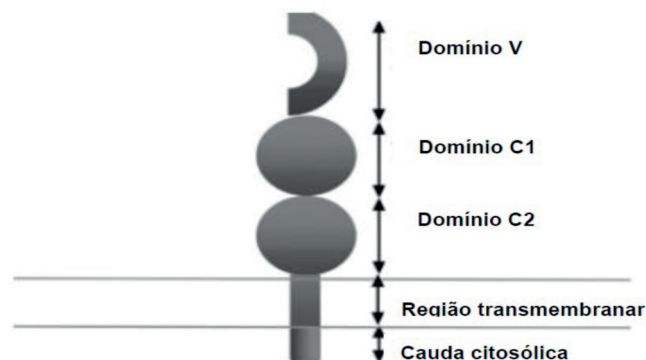
Apesar dos AGEs terem sido descritos pela primeira vez em 1912 por Louis Maillard, a estrutura da maioria dos AGEs continua por estabelecer (Rojas & Morales, 2004), no entanto, existem duas excepções que são o N<sup>ε</sup>-carboximetil lisina (CML) e a pentosidina que estão bem caracterizados do ponto de vista químico (Goh & Cooper, 2008; Rojas & Morales, 2004).

## 6.2 Receptores para AGEs

Um grupo de proteínas localizadas na membrana plasmática é capaz de ligar AGEs. Este grupo é constituído pelo RAGE (receptor para AGEs) e várias proteínas, designadamente, receptor para AGE oligossacaril transferase 48 (AGE-R1), fosfoproteína 80K-H (AGE-R2), galectina-3 (AGE-R3) e receptores *scavenger* classe A tipo I e II, receptores *scavenger* classe B (CD-36) e receptor de *lectin-like oxidized* LDL receptor-1 (LOX-1) (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

O RAGE é considerado o receptor mais importante de ligação para AGEs e também o mais estudado (Peyroux & Sternberg, 2006). Pertence à família de receptores de imunoglobulina (Ahmed, 2005; Basta *et al*, 2004; Kalea *et al*, 2009; Negre-Salvayre *et al*, 2009) e é formado por 394 aminoácidos organizados numa extensa região extracelular (Negre-Salvayre *et al*, 2009), um domínio V variável seguido de dois domínios C (C1 e C2) constantes (Kalea *et al*, 2009; Yan *et al*, 2003) (Figura 8), estabilizados por pontes de dissulfito entre resíduos de cisteína (Basta *et al*, 2004). Possui uma região transmembranar caracterizada por um

domínio hidrofóbico e uma região citosólica reactiva no terminal carboxílico, que é precedido por uma cauda citosólica (Figura 8) (Negre-Salvayre *et al*, 2009). O domínio V do receptor é importante para a ligação de ligandos (Goldin *et al*, 2006; Yan *et al*, 2003) e a região citosólica é crucial na sinalização intracelular induzida pelo RAGE (Goldin *et al*, 2006). O RAGE é expresso na superfície de vários tipos de células, como as células endoteliais, as células musculares lisas dos vasos, os linfócitos, os monócitos e os neurónios (Rojas & Morales, 2004). Em condições fisiológicas, o RAGE é expresso em níveis reduzidos nos tecidos e vasos. No entanto, a sua expressão aumenta nos macrófagos, monócitos, células musculares lisas e células endoteliais quando há um excesso de AGEs, evidenciando um processo de *feedback* positivo (Goldin *et al*, 2006; Lin, 2006).



**Figura 8:** Estrutura do RAGE. (Adaptado de Kalea *et al*, 2009)

O seu gene está localizado no cromossoma 6 no complexo major de histocompatibilidade entre os genes da classe II e III (Goldin *et al*, 2006; Rojas & Morales, 2004). Para além dos AGEs, o RAGE também interage com outros ligandos, como a S100 calgranulina, a *high mobility group B1* (HMGB1/amfoterina) e o péptido  $\beta$  amilóide.

A S100 calgranulina pertence à família de pequenas proteínas que ligam cálcio, e estão associadas com o desenvolvimento de inflamação. A HMGB1 é uma proteína de ligação nuclear que facilita a transcrição de genes pela estabilização da formação do nucleossoma. Estudos recentes, demonstraram que a ligação da HMGB1 nas células endoteliais resulta na fosforilação de diversas vias de sinalização (MAP cinases, cinase regulada por sinal extracelular (ERK), cinase do factor de transcrição c-Jun (JNK) e p38, NF- $\kappa$ B) permitindo o desenvolvimento da resposta inflamatória (Rojas & Morales, 2004). A ligação do péptido  $\beta$  amilóide ao RAGE induz a formação de *stress* oxidativo e inflamação (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

A forma solúvel do RAGE (sRAGE) tem sido identificada nos tecidos humanos. Esta corresponde ao domínio extracelular do RAGE, no entanto não possui domínios

transmembranares e região citosólica. O sRAGE pode competir com os ligandos do RAGE, prevenindo a interação destes com o RAGE (Maillard-Lefebvre *et al*, 2009).

Os AGE-R1, -R2, -R3 e os receptores *scavenger* de macrófagos classe A tipo I e II, CD36 são capazes de reconhecer e ligar AGEs, no entanto, não estão envolvidos na transdução de sinais após a interação com os AGEs. Estão associados à sua *clearance* e destoxificação (Goldin *et al*, 2006).

Relativamente, ao AGE-R1, esta proteína possui 60 KDa (Negre-Salvayre *et al*, 2009). Apresenta um domínio N-terminal extracelular e um domínio C-terminal citoplasmático (Goldin *et al*, 2006). Este receptor está envolvido na *clearance*, degradação e ligação de AGEs específicos (Goh & Cooper, 2008). O AGE-R1 regula negativamente a resposta inflamatória dos AGEs pela inibição do *stress* oxidativo e da via do NF- $\kappa$ B. A diminuição dos níveis de AGE-R1 está associada com as complicações diabéticas (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

O AGE-R2 possui 80-90 KDa (Goldin *et al*, 2006) é uma proteína cinase e o substrato da tirosina cinase (Negre-Salvayre *et al*, 2009). Quanto ao AGE-R3 comporta-se como um receptor *scavenger*, tem uma elevada afinidade para AGEs e o seu domínio de ligação é no N-terminal (Goldin *et al*, 2006). A sua expressão é reduzida em condições fisiológicas e aumenta na diabetes (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

O CD36 é um membro da família de receptores *scavenger* classe B na superfície das proteínas, não está envolvida na *clearance* de AGEs mas na indução de *stress* oxidativo na célula (Goldin *et al*, 2006). Os receptores *scavenger* classe A tipo I e II são expressos pelos macrófagos e desempenham um papel na captação de AGEs nos estados precoces da aterogénese enquanto o RAGE prevalece nas lesões avançadas (Negre-Salvayre *et al*, 2009). O LOX-1 pertence à família de receptores *scavenger* classe E, reconhece LDL oxidadas e AGEs. Estes aumentam a expressão de LOX-1 em ratos diabéticos (Goldin *et al*, 2006).

### 6.3 Mecanismos de acção extracelulares dos AGEs

A matriz extracelular é formada por proteínas que apresentam uma reduzida velocidade de *turnover* como, o colagénio, a elastina, as glicoproteínas e os proteoglicanos, que são responsáveis pela integridade e elasticidade da parede dos vasos. A formação de *cross-links* entre os AGEs e as proteínas da matriz extracelular conduz a alterações da velocidade de *turnover*, diminuição da permeabilidade e flexibilidade das grandes artérias, resultando em disfunção das mesmas (Negre-Salvayre *et al*, 2009). A formação de *cross-links* no colagénio como resultado da glicação conduz a alterações na estrutura, a aumento da rigidez e a resistência à degradação proteolítica. A composição da matriz extracelular é modificada pelos

AGEs, aumenta a expressão, de colagénio III, IV, VI e laminina, que possivelmente medeia a regulação de citocinas pró-fibróticas (Goh & Cooper, 2008).

Os AGEs também podem modificar os nucleótidos do DNA, conduzindo à redução da síntese de DNA, mutações e citotoxicidade. Os lípidos também são alvos dos AGEs, estes alteram a biossíntese e o *turnover* dos fosfolípidos da membrana conduzindo a alterações nas propriedades físicas da mesma (Negre-Salvayre *et al*, 2009).

#### 6.4 Mecanismos de acção intracelulares dos AGEs

A interacção dos AGEs com o seu receptor, RAGE está envolvida na patogénese das complicações vasculares na diabetes (Magalhães *et al*, 2008). Esta ligação conduz à activação da NADPH oxidase que por sua vez leva à formação de ROS (Basta *et al*, 2004; Soldatos & Cooper, 2006).

A interacção de AGEs com o RAGE nas células endoteliais activa o factor de transcrição NF- $\kappa$ B e múltiplas vias de transdução de sinal intracelulares, que incluem a p21ras, a MAP cinases, a PI<sub>3</sub>K, a cdc42/rac e a janus cinase (JAK)/proteína transdutora de sinal e activadora de transcrição (STAT) (Basta *et al*, 2004). Os efeitos biológicos resultantes da sinalização AGE/RAGE são dependentes da produção de ROS e da activação do NF- $\kappa$ B (Negre-Salvayre *et al*, 2009). No entanto, o mecanismo pelo qual o RAGE está associado com a activação do NF- $\kappa$ B é hipotético. Contudo, a inibição do RAGE inibe a activação do NF- $\kappa$ B (Goldin *et al*, 2008)

Os AGEs podem prejudicar a função endotelial e conduzir a complicações vasculares na diabetes pela redução da biodisponibilidade do NO, por sequestro e inactivação do mesmo, por redução da actividade da eNOS, por estimulação da produção de moléculas de adesão, designadamente VCAM-1, ICAM-1, e promovendo um estado pró-inflamatório e de aumento da expressão do próprio RAGE (Goldin *et al*, 2006; Negre-Salvayre *et al*, 2009).

#### 6.5 Associação dos AGEs com a aterosclerose

A glicação, a acumulação de AGEs e a interacção dos AGEs com o seu receptor RAGE, estão envolvidas na aterosclerose (Ahmed, 2005). O aumento dos níveis de LDL glicadas associa-se com o aumento da inflamação e permeabilidade do endotélio. As LDL glicadas são captadas pelos receptores *scavenger* que promovem a formação de células espumosas e de estrias de gordura. O *stress* oxidativo produzido pela interacção dos AGEs com o seu receptor RAGE, aumenta a oxidação das LDL. Para além disso, o *stress* oxidativo diminui a disponibilidade



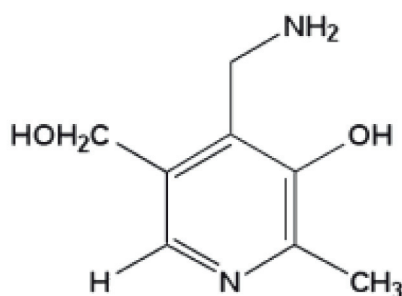
de NO e o aumento da produção de  $\text{ONOO}^-$  que está envolvido na disfunção endotelial (Goldin *et al*, 2006).

## 6.6 Terapêutica para AGEs

Vários compostos têm sido descritos como inibidores de AGEs (Murakoshi *et al*, 2006). Estes compostos podem ser divididos em diferentes classes, de acordo com o seu mecanismo de acção, nomeadamente os que inibem a formação de AGEs a diferentes níveis (aminoguanidina, piridoxamina, OPB-9195 [(6)-2-Isopropilidenhidrazono-4-oxo-tiazolidina-5-ilacetanilido], LR-90 [metileno bis 4,4' -(2-clorofenilureído fenoxisobutírico)]), os que quebram os *cross-links* entre as proteínas mediadas pelos AGEs (N-fenaciltiazol (BFT), ALT-711 (3-fenacil-4,5-cloreto de dimetiltiazol) e os bloqueadores de RAGE (Zieman & Kass, 2004).

## 6.7 Piridoxamina

A descoberta de que a piridoxamina pode inibir reacções de glicação e a formação de AGEs estimulou novos interesses por este composto numa perspectiva de potencial agente farmacológico (Voziyan & Hudson, 2005). A piridoxamina (Figura 9), é uma das três formas da vitamina B6 (Chang *et al*, 2009; Giannouskakis, 2005; Wu *et al*, 2011; Voziyan & Hudson, 2005), foi introduzida por Hudson *et al* (Khalifah *et al*, 1999) como um inibidor da formação de AGEs a partir de produtos Amadori (Murakoshi *et al*, 2009; Wu *et al*, 2011). A família da vitamina B6 consiste em compostos relacionados estruturalmente, piridoxamina, piridoxina (vitamina B6) e piridoxal (Giannouskakis, 2005). A vitamina B6 é a forma cataliticamente inactiva, enquanto piridoxal, forma aldeído, e a piridoxamina, forma amina, são cataliticamente activas e envolvidas em reacção enzimáticas e não enzimáticas (Jain, 2007).



**Figura 9:** Estrutura da piridoxamina.

A síntese da piridoxamina, foi descoberta em 1944 (Giannouskakis, 2005). A piridoxamina foi descoberta em tecidos animais e a sua estrutura determinada a partir do estudo da piridoxina, a forma da vitamina B6 conhecida até então. Em seguida, demonstrou-se a capacidade da piridoxamina e do piridoxal em catalizar *in vitro* reacções de transaminação não enzimática que resulta na interconversão entre aminoácidos e  $\alpha$ -cetoácidos. A analogia entre estas reacções *in vitro* e reacções de transaminação descobertas precocemente em tecidos animais, conduziu à proposta dos mecanismos gerais das vitaminas B6.

Estes mecanismos estabelecem a piridoxamina como um intermediário transiente nas reacções de transaminação. Na ausência de enzima, a reacção catalítica requer a ligação e a coordenação a iões metálicos pela piridoxamina, contrariamente na presença da enzima há uma estabilização dos complexos intermédios pela cadeia de aminoácidos da enzima. A ligação de metais à piridoxamina, a pH fisiológico, é possível devido à ionização ácida do grupo hidroxilo fenólico, pK de aproximadamente 3,4. A piridoxamina pode formar complexos com diversos metais de transição, preferencialmente com o cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e o ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ).

A piridoxamina na dieta é consumida sob a forma piridoxamina-5-fosfato que é hidrolisada a piridoxamina pela fosfatases intestinais. A piridoxamina é convertida de novo a piridoxamina-5-fosfato e, de seguida, a piridoxal-5-fosfato pela acção da piridoxamina-5-fosfato oxidase no fígado, e em menor proporção no tecido intestinal (Voziyan & Hudson, 2005).

A piridoxamina baseia-se numa estrutura em anel de piridina com substituintes hidroxilo, metil, aminometil e hidroximetil. O grupo fenol e aminometil na posição 3 e 4, respectivamente, são responsáveis pelas propriedades inibitórias que a piridoxamina demonstra (Figura 9) (Adrover *et al*, 2008). Os mecanismos de acção da piridoxamina incluem: i) *scavenging* de uma variedade de carbonilos tóxicos derivados da glicose e da peroxidação lipídica derivados da degradação de açúcares e de lípidos, ii) inibição do passo seguinte à formação de produtos Amadori na reacção de Maillard; iii) inibição da formação de AGEs pelo bloqueio da degradação oxidativa de intermediários Amadori na reacção de Maillard pela ligação de iões metálicos que catalizam a reacção, iv) *trapping* de ROS (Chang *et al*, 2009, Wu *et al*, 2011; Voziyan & Hudson, 2005;) pela libertação do protão do ião fenolato.

Estudos recentes mostraram que a piridoxamina compete com os grupos amino das proteínas de forma a evitar a glicação e pode capturar  $\alpha$ -cetoaldeídos que estão envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose. Através dos resultados obtidos em estudos recentes, supõe-se que a piridoxamina não está envolvida na inibição da glicação de proteínas pelo bloqueio dos grupos cetona dos compostos Amadori, pelo contrário, a sua acção de inibição na degradação dos compostos



Amadori resulta exclusivamente da ligação de iões metálicos que catalizam a auto-oxidação dos compostos Amadori (Adrover *et al*, 2008).

Em estudos de toxicidade, a piridoxamina foi bem tolerada e mostrou um perfil favorável de segurança, sem efeitos adversos relatados. A combinação destas múltiplas actividades, associada com a segurança da piridoxamina, indica que é um promissor candidato na terapêutica das complicações vasculares associadas à diabetes (Chang *et al*, 2009; Voziyan & Hudson, 2005). No entanto, ainda não são claros os mecanismos específicos pelos quais a piridoxamina desempenha um papel na prevenção de doenças vasculares em diabéticos (Jain, 2007). A piridoxamina inibe a formação de AGEs na nefropatia diabética e ensaios clínicos em fase III foram concluídos em 2004.

Em ensaios pré-clínicos e clínicos a piridoxamina tem demonstrado potencial farmacológico no tratamento da nefropatia diabética, retinopatia diabética e hiperlipidemia. No entanto, os mecanismos de acção da piridoxamina *in vivo* permanecem por esclarecer. Portanto, os potenciais efeitos benéficos da piridoxamina podem incluir condições, tais como a aterosclerose, o cancro, as doenças neurodegenerativas e o envelhecimento (Voziyan & Hudson, 2005).

## 7. Objectivos

As doenças macrovasculares associadas à diabetes tipo 2 são a principal causa de morte a nível mundial e acarretam um elevado custo socioeconómico em países industrializados. O avultado número de estudos efectuados nas últimas décadas permite actualmente um conhecimento profundo sobre os mecanismos fisiopatológicos da sua génese e a descoberta de novos fármacos eficazes no seu tratamento. O desenvolvimento de meios de diagnóstico e de indicadores de risco cada vez mais precoces é de especial importância para uma abordagem profiláctica da doença.

O principal objectivo do estudo foi investigar os efeitos da piridoxamina na disfunção endotelial de modelos animais com diabetes tipo 2, os ratos Goto-kakizaki (GK) e caracterizar alguns dos principais mecanismos de acção associados. Procuramos identificar os benefícios terapêuticos da piridoxamina em diferentes marcadores de *stress* oxidativo, na parede das artérias e nos níveis de expressão de diferentes proteínas associadas à biodisponibilidade de NO e avaliar o impacto da administração de piridoxamina no estado metabólico e inflamatório. Para tal, estudou-se em anéis de aorta isolados: a vasodilatação dependente e independente do endotélio, os níveis de *stress* oxidativo, os níveis de expressão da enzima responsável pela produção de NO, avaliou-se a integridade da via de

sinalização cGMP/NO e os níveis de glicação. Nunca esquecendo a multiplicidade de factores de risco e as suas interacções sinérgicas, efectuou-se uma análise integrada dos parâmetros referidos com os indicadores bioquímicos e a função renal nos diferentes grupos de estudo.

## **II. MATERIAL E MÉTODOS**

---



## 1. Materiais

### 1.1 Reagentes químicos e imunológicos

Os reagentes utilizados na preparação das soluções, assim como, os restantes compostos não referenciados na seguinte lista, adquiriram-se às respectivas empresas, Sigma-Aldrich, EUA; Merck Darmstad, Alemanha; Panreac Química SA, Espanha, possuindo o mais elevado grau de pureza disponível comercialmente.

Anti-actin monoclonal antibody .....	Chemicon Internacional Company, EUA
Anti-CML Monoclonal Antibody .....	Trans Genic Inc, Japão
Anti-RAGE rabbit polyclonal antibody .....	Abcam, Reino Unido
Glicose 30% .....	Braun, Portugal
Phospho-eNOS (Ser 1177) Antibody .....	Cell Signalling, USA
Phospho-VASP (Ser 239) Antibody .....	Cell Signalling, USA
Piridoxamine .....	Sigma, EUA
Purified Mouse Anti-eNOS/NOS Type III .....	BD Biosciences, EUA
Purified Mouse Anti-PAI-1 .....	BD Biosciences, EUA
Secondary Anti-Mouse .....	GE Healthcare, RU
Secondary Anti-Rabbit .....	GE Healthcare, RU
VASP (9A2) Rabbit mAb .....	Cell Signalling, USA

## 2. Modelos Animais e Tratamento

Para o desenvolvimento deste estudo, recorreu-se a 2 modelos animais, um modelo animal normal, ratos Wistar (W) e um modelo animal não obeso com diabetes tipo 2, ratos Goto-Kakizaki (GK), com 6 meses de idade, respectivamente. As estirpes utilizadas provinham de colónias locais (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e mantiveram-se num ambiente ventilado, com ciclos de 12 horas de luz/12 horas de escuridão com temperatura (21-24°C) e humidade (50-60%) controlada.

Os animais de ambas as estirpes foram divididos em grupos: W-ratos Wistar controlo com 5 meses de idade; GK- ratos Goto-Kakizaki controlo com 5 meses de idade; W+P- ratos Wistar com 5 meses de idade submetidos à administração de piridoxamina, e GK+P- ratos Goto-Kakizaki com 5 meses de idade submetidos à administração de piridoxamina. Os animais dos grupos W+P e GK+P foram submetidos à administração de piridoxamina (2g/L) por via oral durante 4 semanas antes do sacrifício.

Todos os animais tiveram livre acesso a ração (dieta AO3-Panlab, Charles River, França). É necessário ressaltar que todos os procedimentos nos animais estavam de acordo com a Lei Portuguesa na experimentação de animais de laboratório.

## **2.1 Glicemia e Peso Corporal**

No final do estudo, aos 6 meses de idade, os animais dos diferentes grupos foram pesados e realizaram-se os testes de tolerância à glicose. Para tal, os animais foram mantidos em jejum (16-18 horas), determinando-se, na veia da cauda, o nível de glicose no sangue total após o jejum. Posteriormente administrou-se uma injeção intraperitoneal de glicose ( $1,75 \text{ g.Kg}^{-1}$  de peso corporal) em tampão fosfato alcalino (PBS) e determinaram-se os níveis de glicose no sangue total, na veia da cauda, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração, pelo método da glicose-oxidase, recorrendo-se ao uso do glicómetro (Glucometer-Ellite-Bayer, Portugal S.A.) e tiras-teste compatíveis (Bayer SA, Portugal). Os níveis de glicose no sangue total foram expressos em mg/dL.

## **2.2 Colheita de sangue**

Para a determinação de parâmetros sanguíneos e após um período nocturno de jejum (16-18 horas), os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com cloridrato de quetamina ( $75 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , i.m., Lab. Vitória, Portugal) e clorpromazina ( $3 \text{ mg.Kg}^{-1}$ ) e recolheram-se amostras de sangue, por punção cardíaca. Para avaliação de parâmetros séricos e plasmáticos, centrifugou-se o sangue ( $3500 \text{ xg}$ ) durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo posteriormente o soro e o plasma alíquotados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior processamento.

## **2.3 Colheita de urina**

Os animais foram inseridos em caixas metabólicas, com um sistema de captação de urinas, por um período de 24 horas. As urinas foram centrifugadas a  $2000 \text{ xg}$  durante 10 minutos à temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ , seguidamente foram alíquotadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.4 Sacrifício dos animais e recolha de órgãos**

Os animais foram anestesiados, como anteriormente mencionado e sacrificados por deslocamento cervical. Após exposição dos órgãos intra-abdominais,

procedeu-se rapidamente à excisão da artéria aorta e retirou-se o tecido conjuntivo de forma a preservar o endotélio.

A artéria aorta foi dividida em 2 segmentos de anéis com aproximadamente 4 mm de comprimento. Grande parte da artéria aorta congelou-se imediatamente em azoto líquido e foi armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização, enquanto o restante tecido colocou-se numa solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4) com a seguinte composição (mmol/L): NaCl, 118,6; KCl, 4,7;  $\text{CaCl}_2$ , 1,6;  $\text{NaHCO}_3$ , 25,0;  $\text{MgSO}_4$ , 1,18;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,18; glicose, 11,0 para os estudos isométricos.

## 2.5 Estudos Isométricos

Os segmentos de anéis da artéria aorta (4 mm) foram montados entre triângulos de aço inoxidável e suspensos em câmaras de órgãos individuais no banho de órgãos com 10 mL de capacidade contendo a solução de Krebs-Henseleit com a composição mencionada anteriormente. A solução foi mantida a  $37^{\circ}\text{C}$  e oxigenada com uma mistura de gases contendo 95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Os segmentos de anéis da aorta encontravam-se ligados a um transdutor de força (PowerLab) no banho de órgãos.

Estes segmentos foram distendidos inicialmente a uma tensão de repouso de 1 g, estabelecida previamente como a tensão ideal, através de curvas de comprimento-tensão, durante 60 minutos.

Após o equilíbrio, as artérias aorta foram pré-contraídas com fenilferina (PHE)  $0,3\ \mu\text{M}$  durante 10 minutos e de seguida avaliou-se a resposta de relaxamento induzido pelo dador de NO, nitroprussiato de sódio (SNP,  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M) que é um dador de óxido nítrico e avalia a vasodilatação independente do endotélio (Tabela I).

Seguidamente substituiu-se a solução de Krebs-Henseleit, e contraíram-se as artérias com PHE  $0,3\ \mu\text{M}$ , após estabilização da contracção, adicionou-se acetilcolina (ACh,  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M) (Tabela II) de forma cumulativa em intervalos de 4 minutos de forma a avaliar a vasodilatação dependente do endotélio.

Posteriormente adicionou-se uma solução de  $\text{N}^{\text{O}}$ Nitro-L-arginina (L-NAME,  $300\ \mu\text{M}$ ) nas câmaras de órgãos individuais no banho de órgão e após equilíbrio durante 15 minutos adicionou-se ACh,  $10^{-9}$  a  $10^{-3}$  M de forma a produzirem-se curvas de dose-resposta na presença e na ausência de L-NAME.

De seguida, substituiu-se a solução de L-NAME por solução de Krebs-Henseleit e verificou-se a dose-respostas a PHE ( $10^{-9}$  a  $10^{-3}$ ) adicionando-se consecutivamente em intervalos de 3 minutos (Tabela III).

As respostas de relaxamento da ACh e do SNP foram expressas em percentagem de relaxamento a partir de um submáximo obtido através da contracção induzida pela PHE  $0,3\ \mu\text{M}$ . A análise de regressão com 3 pontos dos dados ao

longo da secção linear das curvas dose-resposta foram aplicadas para através de uma equação se determinarem os valores de  $EC_{50}$ .

**Tabela I:** Curva-dose resposta ao nitroprussiato de sódio (SNP).

Sequência de adição	Concentração
SNP1	1 nM
SNP2	10 nM
SNP3	100 nM
SNP4	1 $\mu$ M
SNP5	10 $\mu$ M
SNP6	100 $\mu$ M
SNP7	200 $\mu$ M

**Tabela II:** Curva-dose resposta à acetilcolina (ACh).

Sequência de adição	Concentração Inicial	Volume a retirar	Concentração Final	Volume a adicionar
ACh1	1 mM	5 $\mu$ L	1 $\mu$ M	10 $\mu$ L
ACh2	1 mM	5 $\mu$ L	1 $\mu$ M	90 $\mu$ L
ACh3	10 mM	5 $\mu$ L	10 $\mu$ M	89 $\mu$ L
ACh4	10 mM	5 $\mu$ L	10 $\mu$ M	889 $\mu$ L
ACh5	10 mM	50 $\mu$ L	100 $\mu$ M	889 $\mu$ L
ACh6	10 mM	500 $\mu$ L	1 mM	890 $\mu$ L
ACh7	-	-	10 mM	890 $\mu$ L

**Tabela III:** Curva dose-resposta à fenilefrina (PHE).

Sequência de adição	Concentração inicial	Volume a retirar	Concentração Final	Volume a adicionar
PHE1	100 $\mu$ M	50 $\mu$ L	10 $\mu$ M	10 $\mu$ L
PHE2	100 $\mu$ M	50 $\mu$ L	10 $\mu$ M	90 $\mu$ L
PHE3	1 mM	50 $\mu$ L	100 $\mu$ M	90 $\mu$ L
PHE4	10 mM	50 $\mu$ L	1 mM	90 $\mu$ L
PHE5	100 mM	50 $\mu$ L	10 mM	90 $\mu$ L
PHE6	-	-	100 nM	90 $\mu$ L



## 2.6 Determinação dos níveis séricos de colesterol total, HDL e triglicérides

Determinaram-se os níveis séricos de colesterol total, colesterol-HDL e triglicérides, expressos em mg/dL através de kits comerciais (Olympus-Diagnóstica Portugal, Produtos de Diagnóstico SA, Portugal).

## 2.7 Determinação dos níveis de 8-isoprotano

Determinaram-se as concentrações de 8-isoprotanos livres na urina das 24 horas através do kit comercial 8-Isoprostane EIA Assay Cayman Chemical Company, EUA.

## 2.8 Determinação dos 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)

Os níveis de 8-OHdG determinaram-se na urina das 24 horas com recurso ao kit comercial 8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Assay Cayman Chemical Company, EUA.

## 2.9 Determinação dos níveis de albumina

Os níveis de albumina determinaram-se no soro através do kit comercial Nephrot II, Exocell, Philadelphia, PA, USA.

## 2.10 Homogeneizados de artéria aorta

Para a obtenção de homogeneizados de artéria aorta, seccionou-se uma porção da artéria aorta que foi homogeneizada em tampão com a seguinte composição (em mM, pH 7,4): Tris-HCl 50; NaCl 150; EDTA 1; SDS 0,1%; desoxicolato de sódio 0,5 %; Triton-X100 1%; EGTA 5%; NAF 1;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1;  $\beta$ -glicerolfosfato 2; pirofosfato de sódio 2;  $\beta$ -mercaptoetanol 5  $\mu\text{L}$ ; PMSF 50  $\mu\text{L}$ ; cocktail inibidor de proteases 20  $\mu\text{L}$ , constituído por aprotonina 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , leupeptina 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , pepstanina 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Seguidamente, as amostras foram sonicadas a 4°C (sonicador de ponteira) e centrifugadas (10 minutos, 4°C, 14000 xg). Recolheu-se o sobrenadante e procedeu-se ao cálculo da concentração de proteína pelo método de BCA. Por último, adicionou-se *Sample Buffer* 6 vezes (Tabela IV) concentrado a cada amostra com base no volume de sobrenadante obtido após a centrifugação e armazenaram-se as amostras a -80°C.

## 2.11 Determinação da quantidade de proteína pelo método BCA

O kit BCA™ Protein Assay (Pierce Protein Research, Rockford, EUA) baseia-se num método espectrofotométrico para a determinação da quantidade de proteína de tecidos homogeneizados. Efectuou-se uma curva de calibração com albumina sérica bovina (BSA) numa concentração conhecida e foi determinada a proteína das amostras.

## 2.12 Determinação dos níveis de expressão de proteínas por *Western Blot*

A identificação e quantificação dos níveis de expressão de eNOS, eNOS fosforilada, VASP, VASP fosforilada, CML, RAGE, efectuaram-se por *Western Blot*.

O sistema de polimerização de géis foi montado e os tampões *Resolving* e *Stacking* (Tabela IV) foram adicionados. As amostras foram fervidas durante 5 minutos e adicionadas aos géis polimerizados no sistema de corrida com tampão *Running* (Tabela IV). Posteriormente, procedeu-se à disposição das amostras com volumes correspondentes a 20 µg de proteínas e o padrão (Precision Plus Standards, Dual Color, Bio-Rad, EUA) segundo a ordem desejada nos géis polimerizados.

Após terminada a corrida (voltagem constante de 150 V), colocaram-se os géis em contacto directo com as membranas de PVDF (Polyvinylidene Flouride Membrane, Bio-Rad, EUA), previamente activadas. O sistema de transferência foi montado de acordo com as instruções e a reacção ocorreu a amperagem constante (200mA) em tampão CAPS (Tabela IV). Concluída a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução de TBST-BSA a 5% (Tabela IV), no caso das proteínas eNOS fosforilada e VASP fosforilada, e em TBST-Leite a 10%, nas restantes proteínas (eNOS, VASP, CML, RAGE), à temperatura ambiente durante 2 horas.

Finalizado o bloqueio, incubaram-se as membranas com anticorpos primários durante a noite a 4° C com agitação constante. No dia seguinte, efectuaram-se as lavagens, uma lavagem rápida seguida de 4 lavagens de 15 minutos em 15 minutos com solução de TBST. Posteriormente, incubaram-se as membranas com o anticorpo secundário, com agitação constante à temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos. Após este período as lavagens são efectuadas como mencionado anteriormente.

Por último, as membranas foram incubadas com substrato enzimático (Rabbit ECF Western Blotting Reagent, Amersham Biosciences, Carnaxide, Portugal) durante aproximadamente 5 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (Typhoon FLA 9000, Suécia).

**Tabela IV:** Soluções utilizadas na técnica de *Western Blot*.

<b>Soluções</b>	<b>Composição</b>
<b>Tampão <i>Resolving</i></b>	<b>0,75 M Tris-HCL; 0,2% SDS; pH 8,8</b>
<b>Tampão <i>Stacking</i></b>	<b>0,25 M Tris-HCL; 0,2% SDS; pH 6,8</b>
<b><i>Sample Buffer</i> (6x)</b>	<b>62,5 mM Tris-HCL; pH 6,8; 20% SDS 10%; 25% glicerol; 2% Bromofenol blue 0,5%; pH 6,8</b>
<b>Tampão <i>Running</i></b>	<b>125 mM Tris-Base; 480 mM Glicina; 9 mM SDS; pH 8,8</b>
<b>Tampão CAPS</b>	<b>50 mM CAPS; 2% NaOH; pH 11; 10% metanol</b>
<b>Tampão TBS</b>	<b>250 mM Tris; 1,5 mM NaCl; pH 7,6</b>
<b>Tampão TBST</b>	<b>Solução de TBS + 1% Tween-20</b>

### 2.13 Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) do número de experiências (n). Os dados foram analisados pelo teste t Student para amostras não emparelhadas de igual variância e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



### **III. RESULTADOS**

---



## 1. Peso Corporal, perfil lipídico e glicémico

Os níveis de glicose são regularmente usados como indicadores da severidade do estado diabético. Durante a realização deste estudo, não se verificaram alterações de relevância no consumo de ração e na ingestão de água e de solução de piridoxamina entre os diferentes grupos experimentais.

No grupo GK o peso corporal, aos 6 meses de idade é inferior ( $p < 0,001$ ) ao do grupo W. Contrariamente, aos valores de glicemia em jejum e 2 horas após a administração intraperitoneal de glicose ( $p < 0,001$  vs W) foram superiores no grupo GK diabético, manifestando uma hiperglicemia moderada em jejum e uma acentuada intolerância à glicose.

Por sua vez, os ratos W sujeitos a administração de piridoxamina (W+P) aumentaram significativamente o seu peso corporal comparativamente com os grupos W e GK ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

No entanto, os níveis de glicemia em jejum e 2 horas após a administração intraperitoneal de glicose foram semelhantes aos do grupo W não se verificando alterações significativas.

No caso dos ratos GK+P não se verificam alterações no peso corporal comparativamente ao ratos GK, assim como nos níveis de glicose em jejum, porém os níveis de glicemia após a administração de intraperitoneal de glicose foram inferiores ( $p < 0,001$ ) (Tabela V).

Relativamente aos níveis de triglicerídeos séricos observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos representados na tabela V. Comparando os grupos W e W+P verificou-se uma diminuição dos níveis de triglicerídeos ( $108,6 \pm 8,4$  vs  $72,1 \pm 12,6$ ,  $p < 0,05$  respectivamente).

Analogamente, observou-se uma diminuição dos níveis de triglicerídeos entre os grupos GK e GK+P ( $p < 0,001$ ). Contudo, verificou-se uma aumento acentuado dos níveis de triglicerídeos entre o grupo W e GK ( $p < 0,05$ ) (Tabela V).

A administração de piridoxamina permitiu reverter os níveis de triglicerídeos resultando numa diminuição deste parâmetro em comparação com os grupos controlo.

**Tabela V:** Peso corporal, glicemia em jejum e 2 horas após a administração intraperitoneal de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol não HDL nos diferentes grupos de estudo.

Grupos Parâmetro	W	W+P	GK	GK+P
Peso (g)	404±6,9	484±21,6****	345±8,2***	358±7,0***

Grupos Parâmetro	W	W+P	GK	GK+P
Glicemia em jejum (mg/dL)	65,7±2,0	67,4±2,4 <sup>###</sup>	93,1±2,5 <sup>***</sup>	85,7±5,5 <sup>**</sup>
Glicemia às 2 horas (mg/dL)	82,0±2,6	84,2±1,8 <sup>###</sup>	299,4±7,0 <sup>***</sup>	217,3±19,5 <sup>*****#</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	108,6±8,4	72,1±12,6 <sup>####</sup>	149,5±11,6 <sup>*</sup>	73,3±4,3 <sup>####</sup>
Colesterol Total (mg/dL)	70,4±1,6	90,3±5,9 <sup>**</sup>	89,2±2,0 <sup>***</sup>	100,0±2,7 <sup>*****#</sup>
Colesterol HDL (mg/dL)	45,5±2,0	52,3±3,6 <sup>###</sup>	61,4±1,3 <sup>***</sup>	61,4±2,3 <sup>***</sup>
Colesterol Não HDL (mg/dL)	27,0±1,2	38,0±2,8 <sup>*****#</sup>	27,4±0,9	38,6±1,1 <sup>*****#</sup>

Os resultados são apresentados como média± e.p.m (n=7-16).

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 Valores significativamente diferentes do grupo W  
#p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 Valores significativamente diferentes do grupo GK

Verificou-se um aumento dos níveis de colesterol total e de colesterol HDL (p<0,001 vs W) no grupo GK. No entanto, não se verificaram alterações no nível de colesterol não HDL.

Observou-se que a administração de piridoxamina resultou num aumento dos níveis de colesterol total (p<0,01 vs W e p<0,001 vs GK ).Assim como num aumento dos níveis de colesterol não HDL na mesma proporção (p<0,001 vs W e p<0,001 vs GK ) (Tabela V).

## 2. Marcadores de *stress* oxidativo

Os níveis de 8-isoprostanos e de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) são parâmetros que são referenciados na análise de *stress* oxidativo.



O nível de 8-isoprostanos livre na urina é um marcador utilizado como indicador de peroxidação lipídica.

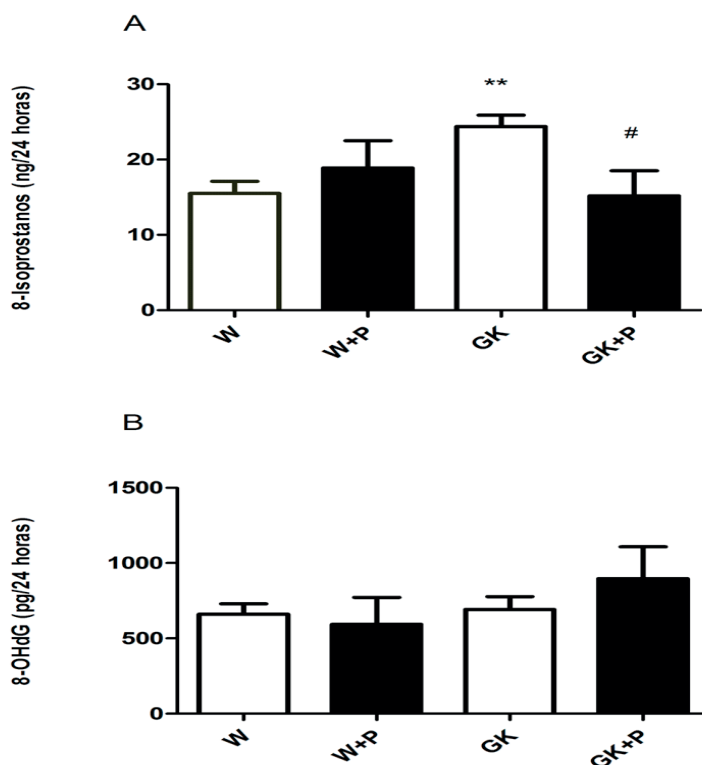
Relativamente a este parâmetro, verificou-se um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) entre o grupo W e o grupo GK.

No entanto, os níveis de 8-isoprostanos são semelhantes entre o grupo W e o grupo W+P, não se verificando alterações significativas neste parâmetro.

Contudo, observa-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) deste parâmetro no grupo GK+P quando comparado com o respectivo controlo GK (Figura 10).

Em relação aos níveis de 8-OHdG, a sua produção é devida a danos oxidativos no DNA induzidos pelas ROS e pelas espécies reactivas de nitrogénio (RNS) sendo estabelecido como um marcador de *stress* oxidativo.

Verificou-se que a administração de piridoxamina não induz alterações neste parâmetro (Figura 10). Observou-se ainda que não ocorrem diferenças significativas, nesta idade, entre os grupos W e GK (Figura 10).



**Figura 10:** Efeitos da piridoxamina nos parâmetros de *stress* oxidativo.

(A) Níveis de 8-isoprostanos livres na urina das 24 horas nos diferentes grupos de estudo. (B) Níveis de 8-OHdG na urina das 24 horas nos grupos de estudo. As avaliações destes parâmetros realizaram-se como descrito anteriormente nos métodos e posteriormente efectuou-se a multiplicação pelo respectivo volume total de urina obtido nas 24 horas de forma a determinar-se a concentração total excretada em 24 horas (ng/24 horas e pg/24 horas, respectivamente).

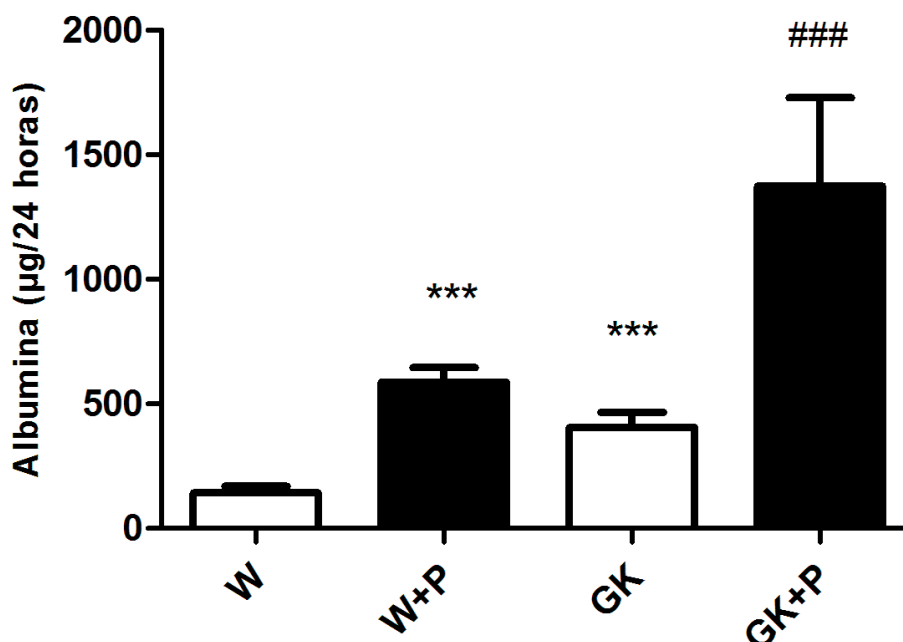
Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  e.p.m (n=5-12).

\*\*p<0,01 Valores significativamente diferentes do grupo W

# p<0,05 Valores significativamente diferentes do grupo GK

### 3. Avaliação da função renal

A albumina na urina permite a avaliação da função renal sendo por isso um parâmetro de elevada importância na diabetes. Os valores de albumina na urina obtidos apresentam-se significativamente superiores nos grupo GK (p<0,001 vs grupo W). No entanto, a administração de piridoxamina aumentou significativamente a albuminúria no grupo GK+P (p<0,001 vs GK) e no grupo W+P (p<0,001 vs W) (Figura 11).



**Figura 11:** Efeitos da piridoxamina na albuminúria.

A avaliação deste parâmetro efectuou-se através do kit citado previamente e efectuou-se a multiplicação pelo respectivo volume total de urina obtido nas 24 horas de forma a determinar a concentração total excretada em 24 horas (µg/24 horas).

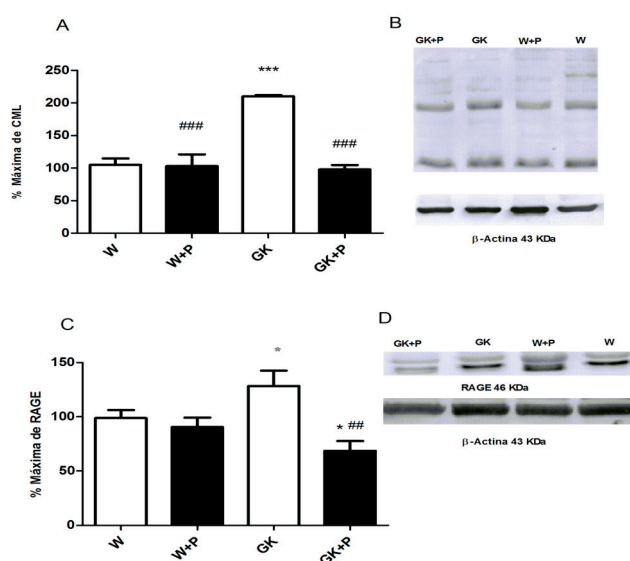
Os resultados são apresentados como média  $\pm$  e.p.m (n=5-21).

\*\*\*p<0,001 Valores significativamente do grupo W

###p<0,001 Valores significativamente do grupo GK

#### 4. Níveis de glicação: CML e RAGE

Os níveis de CML e de RAGE, um importante AGE e o receptor para AGEs, respectivamente, foram avaliados através da técnica de *Western Blot* e os resultados obtidos foram quantificados através de análise densiométrica das respectivas bandas. Na aorta verificou-se que os níveis de CML aumentaram significativamente nos ratos GK diabéticos comparativamente com o grupo W não diabético ( $p < 0,001$ ). O grupo GK apresenta níveis superiores de expressão de CML comparativamente com os restantes grupos experimentais, salientando que a diabetes induz um aumento na formação e acumulação de CML na aorta (Figura 12).



**Figura 12:** Efeitos da piridoxamina nos níveis de expressão de CML e RAGE na aorta. (A) Níveis de expressão de CML nos diferentes grupos de estudo. (B) Western blot representativo da expressão de CML em 20 µg de proteína de homogeneizados da aorta dos diferentes grupos. (C) Níveis de expressão de RAGE nos diferentes grupos de estudo. (D) Western blot representativo da expressão do receptor RAGE em 20 µg de proteína de homogeneizados da aorta dos diferentes grupos. A densitometria das bandas dos diferentes grupos foi normalizada para a respectiva banda de β actina.

A administração de piridoxamina não modificou os níveis de CML nos ratos W (não existem diferenças entre os grupos W e W+P). Contrariamente, os níveis de CML entre os grupos GK e GK+P, apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) (Figura 12).

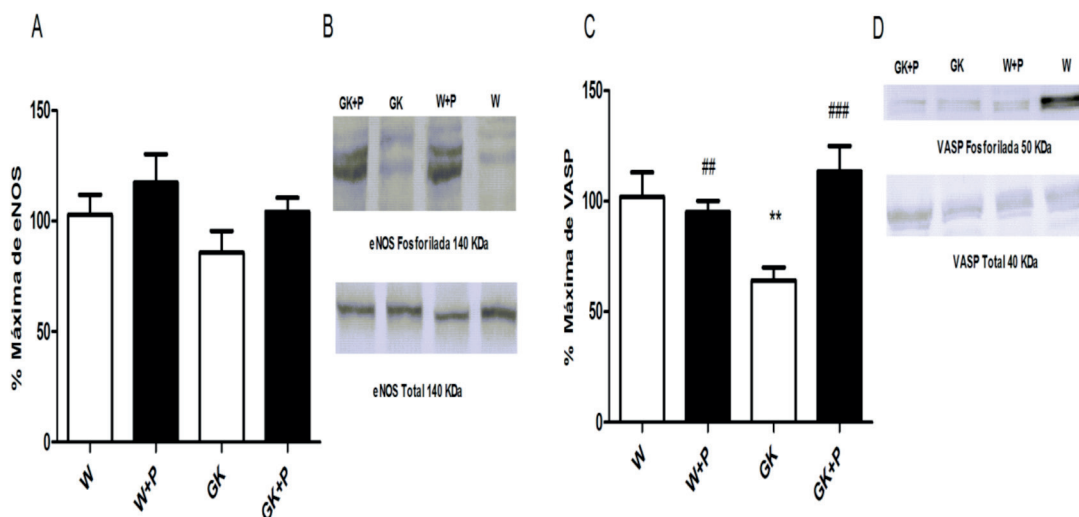
Relativamente aos níveis de RAGE na aorta, ocorreu um aumento dos níveis de expressão do RAGE nos ratos diabéticos ( $p < 0,05$ ). A administração de piridoxamina

não modificou os níveis de RAGE nos ratos W. No entanto, observou-se uma redução dos níveis de expressão de RAGE após tratamento com piridoxamina nos ratos diabéticos (GK+P) em comparação com o respectivo grupo controlo GK (Figura 12).

## 5. Marcadores de disfunção endotelial: sistema enzimático eNOS e integridade da via cGMP/NO

Assim como os níveis de CML e de RAGE, os níveis de expressão de eNOS e VASP foram determinados por *Western blot* e os resultados quantificados através de análise densiométrica.

Ao nível da aorta, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão de eNOS após análise do rácio da eNOS fosforilada pela eNOS total ( $p > 0,05$ ) (Figura 13A). No entanto através da observação directa do western blot (Figura 13B) verificou-se que o grupo GK apresentou níveis reduzidos de eNOS fosforilada comparativamente com os restantes grupos experimentais. Observou-se ainda que a expressão da eNOS é superior no grupo W+P comparativamente ao grupo W e GK. Assim como, se verificou um aumento da expressão da eNOS no grupo GK+P em relação ao grupo GK. No entanto, os resultados obtidos para este parâmetro não são estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 13:** Efeitos da piridoxamina nos níveis de expressão da eNOS e VASP na aorta. (A) Níveis de expressão da enzima eNOS fosforilada/eNOS total nos diferentes grupos de estudo. (B) Western blot representativo da expressão da enzima eNOS fosforilada e da eNOS total em 20 µg de proteína de homogeneizados de aorta dos diferentes grupos (C) Níveis de expressão da proteína VASP fosforilada/VASP total nos diferentes grupos experimentais. (D)

*Western blot* representativo da expressão da proteína VASP fosforilada e total em 20 µg de proteína de homogeneizados de aorta dos diferentes grupos.

Os resultados são apresentados como média ± e.p.m e expressos em percentagem relativamente ao grupo W controlo (n=7-20).

\*\*p< 0,01; Valores significativamente diferentes do grupo W

##p< 0,05; ###p< 0,001 Valores significativamente diferentes do grupo GK

Quanto aos níveis de VASP, após análise do rácio da VASP fosforilada pela VASP total observou-se uma diminuição significativa nos ratos GK relativamente aos ratos W (p <0,01 vs W e p <0,05 vs W+P; Figura 13C). Este parâmetro foi significativamente superior no grupo GK+P relativamente ao grupo GK (p<0,01). Em relação aos grupos W e W+P não se verificaram alterações estatisticamente significativas.

## 6. Relaxamento dependente e independente do endotélio

A adição de ACh ou de SNP aos vasos sanguíneos previamente contraídos com fenilefrina induz um relaxamento dependente e independente da sua concentração (Tabela VI). No grupo GK o relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por ACh nos segmentos da aorta apresentou alterações comparativamente ao grupo W da mesma idade. Verificou-se que a percentagem de relaxamento máximo mediado pelo endotélio nos segmentos da aorta em resposta a ACh diminuiu 26% (p <0,001 vs W) (Tabela VI).

**Tabela VI:** Percentagem de relaxamento máximo e  $-\log EC_{50}$  em segmentos isolados da artéria aorta em resposta a ACh e SNP no diferentes grupos de animais em estudo.

		W	W+P	GK	GK+P
ACh	pEC50	6,87±0,04	7,31±0,08***	6,94±0,09	7,09±0,09*
	Relaxamento Máximo (%)	98,9±4,8	101,2±4,1###	72±2,1***	90,1±3,8###
SNP	pEC50	6,20±0,04	6,45±0,04*	6,43±0,04***	6,69±0,03#####
	Relaxamento Máximo (%)	99,95±0,11	99,85±3,5	99,5±0,12	98,4±2,7

Os resultados são apresentados como a média±e.p.m. (n=7-16).

\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 Valores significativamente diferentes do grupo W

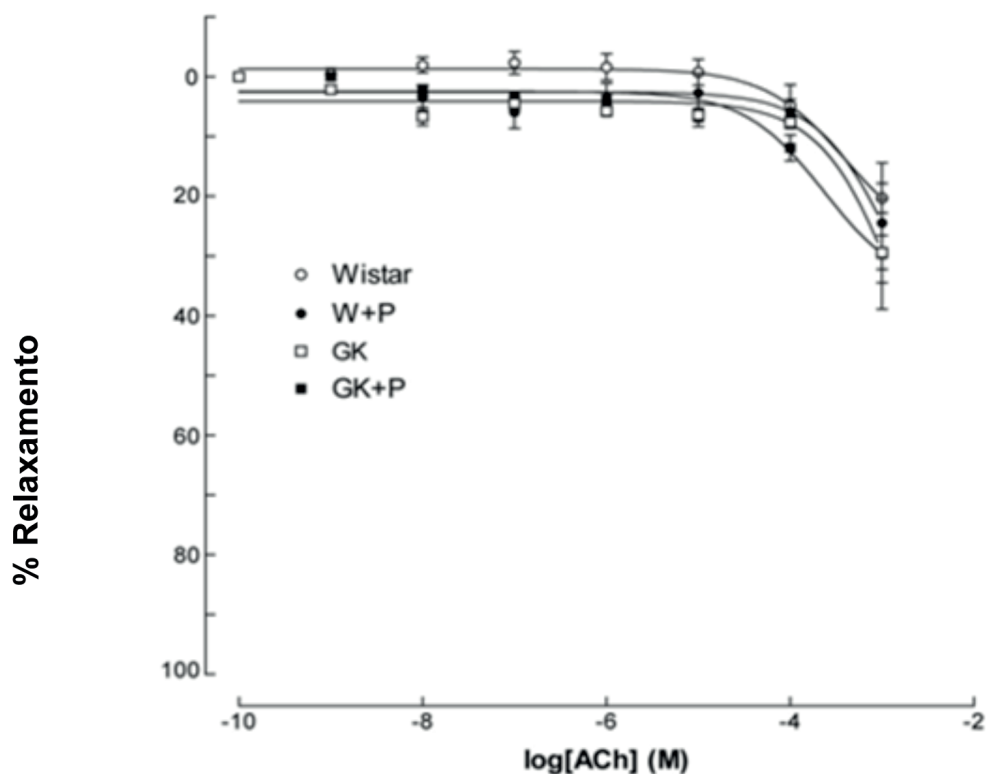
#p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 Valores significativamente diferentes do grupo GK

Comparando as curvas dose-resposta a ACh entre o grupo W e o grupo GK, verificou-se claramente uma redução do relaxamento dependente do endotélio sem alterações no valor de  $EC_{50}$  (Tabela VI). Por sua vez, o valor de  $EC_{50}$  nas curvas dose-resposta ao SNP, aumentou significativamente ( $p < 0,001$  vs W), sem alterações no relaxamento máximo independente do endotélio ( $p < 0,05$  vs W) (Tabela VI).

A administração de piridoxamina melhorou significativamente o relaxamento dependente do endotélio no grupo GK+P, uma vez que se verificou um aumento no valor de  $EC_{50}$  e um aumento da percentagem de relaxamento máximo em resposta a ACh ( $p < 0,001$  vs GK e  $p < 0,05$  vs W). O valor de  $EC_{50}$  no relaxamento independente do endotélio também aumentou significativamente ( $p < 0,001$  vs GK e  $p < 0,001$  vs W) (Tabela VI). Contudo, não se constataram diferenças significativas no relaxamento máximo independente do endotélio (Tabela VI).

Em relação ao grupo W+P observou-se um aumento no valor de  $EC_{50}$  no relaxamento dependente do endotélio ( $p < 0,001$  vs W e  $p < 0,05$  vs GK). No entanto, não se verificaram diferenças significativas no relaxamento máximo dependente e independente do endotélio (Tabela VI).

Nos segmentos da aorta onde foi utilizado o inibidor da eNOS, L-NAME, não ocorreu relaxamento dependente do endotélio (Figura 14) não tendo sido observadas diferenças entre os grupos de estudo.



**Figura 14:** Curvas de dose-resposta à acetilcolina na presença de L-NAME.

Nos segmentos da artéria aorta contraídos com PHE observou-se que o grupo W apresentou um nível de contração superior relativamente aos restantes grupos, sendo o grupo GK+P o que manifestou uma contração mais reduzida (Figura 15).

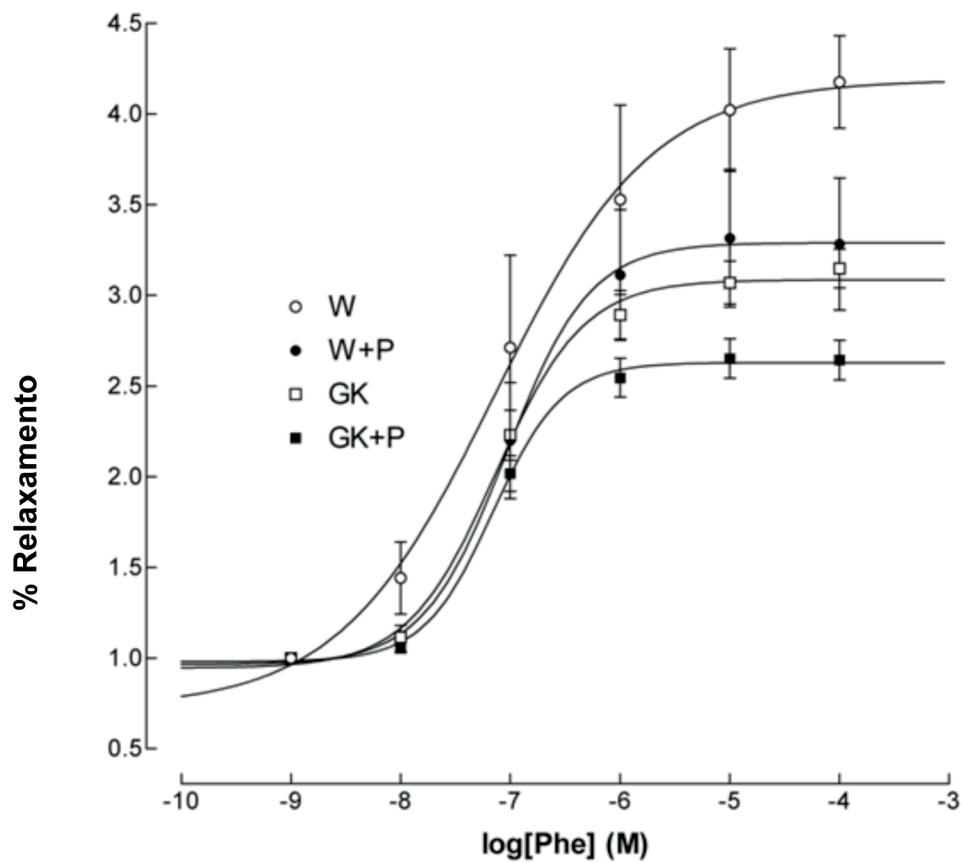


Figura 15: Curvas de dose-resposta à PHE.





## **IV. DISCUSSÃO**

---



Neste estudo foi avaliada a eficácia terapêutica da piridoxamina como um inibidor da formação e acumulação de AGEs na disfunção endotelial macrovascular associada à diabetes tipo 2. Os resultados demonstraram-se que a administração de piridoxamina, por via oral, melhora a disfunção endotelial em ratos diabéticos GK.

Os ratos GK são um modelo de diabetes tipo 2 não obesa obtidos por reprodução selectiva repetida de ratos Wistar, que apresentam uma marcada intolerância à glicose e moderada hiperglicemia em jejum (Seiça *et al*, 2004).

Com este estudo demonstrou-se que, neste modelo animal, a administração de piridoxamina não alterou o peso corporal. No entanto, nos parâmetros relacionados com o metabolismo da glicose verificou-se uma diminuição dos níveis de glicose 2 horas após sobrecarga glicosada entre os grupos GK e GK+P permitindo aferir que possivelmente a piridoxamina pode interferir com o metabolismo da glicose.

No entanto, Degenhart *et al* (Degenhart *et al*, 2002) demonstrou num estudo em modelos animais diabético que após a administração de piridoxamina não se manifestaram alterações na concentração de glicose no plasma. Porém, Muraskoshi *et al* (Muraskoshi *et al*, 2008) mostrou que em modelos animais diabéticos sujeitos a administração de piridoxamina não se observaram alterações na glicose em jejum, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

A administração de piridoxamina diminui os níveis de triglicérides nos diferentes grupos, este resultado está de acordo com os estudos realizados, por Degenhart *et al* (Degenhart *et al*, 2002) e Alderson *et al* (Alderson *et al*, 2003), que verificaram uma redução dos níveis de triglicérides em modelos animais de diabetes tipo 1 e 2, respectivamente.

Os níveis de colesterol total e os níveis de colesterol não HDL nos diferentes grupos sujeitos à administração de piridoxamina aumentaram em relação aos grupos controlo, contudo este aumento pode não ser clinicamente relevante para o agravamento da patologia.

Estudos desenvolvidos por Degenhart *et al* (Degenhart *et al*, 2002) e Alderson *et al* (Alderson *et al*, 2003), demonstraram que os níveis de colesterol total reduzem após a administração de piridoxamina, o resultado obtido neste estudo não está de acordo com o descrito na literatura. No entanto, o modelo animal utilizado neste estudo não apresenta dislipidemia e não será, por isso, o melhor para avaliar os efeitos da piridoxamina no perfil lipídico.

Relativamente ao colesterol não HDL não existem resultados relatados em modelos animais de diabetes após a administração de piridoxamina. Com os resultados mencionados pode-se aferir que um dos alvos de acção da piridoxamina é o metabolismo lipídico, porém os mecanismos pelos quais a piridoxamina interfere neste metabolismo não são descritos.

A microalbuminúria tem sido reconhecida como um indicador de doenças microvasculares e macrovasculares na diabetes tipo 2 (Matheson *et al*, 2010). Está associada com a insulino-resistência, a disfunção endotelial e a obesidade na diabetes tipo 2 (Satchell & Tooke, 2008). A microalbuminúria é considerada como um marcador independente de disfunção endotelial na diabetes (Papaioannou *et al*, 2004).

Neste estudo, verificou-se que os ratos diabéticos GK apresentam níveis elevados de albumina elevados em relação ao grupo controlo, grupo W. Por sua vez, a administração de piridoxamina aumentou os níveis de albumina. Este resultado não está de acordo com a literatura, uma vez que estudos recentes demonstraram que em modelos animais de diabetes tipo 1 e 2 que a piridoxamina diminuiu a excreção de albumina na urina assim como melhorou a função renal (Peyroux & Sterberg, 2006).

Esta discrepância com os resultados observados deve-se a interferências da piridoxamina com o ensaio utilizado para quantificar a albuminúria. A molécula apresenta autofluorescência e interfere com a avaliação dos níveis de albumina, ao comprimento de onda utilizado (400 (Bottiroli & Croce, 2004) e 450, respectivamente). Diversas moléculas biológicas apresentam-se como fluoróforos endógenos (Ramanujaw, 2000), estando esta característica relacionada com a estrutura das mesmas, a presença de anéis aromáticos. A piridoxamina é constituída por um anel aromático e um grupo fenol e aminometil na posição 3 e 4 (Adrover *et al*, 2008), respectivamente, é este anel que lhe confere a propriedade autofluorescente que interfere com a avaliação dos níveis de excreção de albumina na urina das 24 horas.

Os níveis de *stress* oxidativo sistémicos foram avaliados através das concentrações urinárias de 8-isoprostanos e de 8-OHdG. Verificou-se uma diminuição dos níveis de 8-isoprostanos nos grupos tratados, no entanto, não se verificaram diferenças nos níveis de 8-OHdG.

O 8-OHdG é produzido através de dano oxidativo do DNA pelas espécies reativas de oxigénio e nitrogénio, considerando-se um marcador de *stress* oxidativo. A hidroxilação da guanosina na posição C-8 origina o 8-OHdG que é excretado na urina sem sofrer metabolização servindo como um índice de *stress* oxidativo sistémico.

Níveis elevados de 8-OHdG são associados com condições patológicas como e o caso da diabetes (Endo *et al*, 2006). Diversos estudos sugerem que um aumento significativo na excreção urinária de 8-OHdG em doentes diabéticos tipo 2 está associado com doenças microvasculares, nefropatia e retinopatia, mas também com doenças macrovasculares (Matheson *et al*, 2010).

A piridoxamina não demonstrou exercer acção nos níveis de 8-OHdG, no entanto, um recente estudo realizado por Hagiwara *et al* (Hagiwara *et al*, 2009) demonstrou uma redução dos níveis de 8-OHdG após a administração de piridoxa-

mina em modelos animais C57BL/6J. Estas discrepâncias podem ser devidas ao facto de, nesta idade, os ratos GK ainda não apresentarem níveis muito elevados deste indicador. As diferenças entre estirpes e o facto de as doses utilizadas na terapêutica serem distintas pode também explicar estas diferenças.

Estudos prévios demonstraram que os isoprostanos são bons marcadores de peroxidação lipídica e podem ser usados como indicadores de *stress* oxidativo em diversas condições patológicas (Kavarasian *et al*, 2009). A sua avaliação é indirectamente determinada através dos produtos de peroxidação lipídica (Davì *et al*, 1999). Neste estudo utilizou-se a excreção urinária de 8-isoprostanos como indicador de peroxidação lipídica *in vivo*.

A avaliação dos níveis de 8-isoprostanos na urina e no plasma são um indicador de elevada precisão e confiança na determinação dos níveis de peroxidação lipídica *in vivo*. Os níveis de 8-isoprostanos são considerados um indicador fiável dos níveis de *stress* oxidativo (Helmersson *et al*, 2004). Este parâmetro associado a níveis elevados de peroxidação lipídica está aumentado no nosso modelo de diabetes tipo 2 e conseqüentemente é indicativo de níveis sistémicos de *stress* oxidativo elevados, de acordo com o que está descrito na literatura para diferentes modelos de diabetes. Elevados níveis de isoprostanos foram observados no plasma e na urina de doentes diabetes tipo 2 (Kavarasian *et al*, 2009). Gopaul e colaboradores (Gopaul *et al*, 1995) demonstraram que os níveis de 8-isoprostanos, o principal isoprostano, são 3 vezes mais elevados em doentes diabéticos comparativamente à população normal.

Os níveis de isoprostanos também podem ser um marcador da lipoxidação não enzimática, uma vez que durante a peroxidação lipídica formam-se vários compostos reactivos pela decomposição de hidroperóxidos lipídicos, que incluem malonildialdeído (MDA), hidroxinonal (HNE) e isoprostanos. As proteínas reactivas, com resíduos de aminoácidos como a lisina podem sequestrar produtos da peroxidação lipídica para formar aductos, nomeadamente MDA-lisina e HNE-lisina, denominados produtos finais da lipoxidação avançada (ALEs) (Culbertson *et al*, 2003). Os estudos com as reacções entre a piridoxamina e os productos procedentes da dislipidemia diabética por glicação, são numerosos.

A piridoxamina está envolvida na peroxidação lipídica, no entanto, um estudo desenvolvido por Onorato *et al* (Onorato *et al*, 2000), demonstrou que a piridoxamina não aparenta possuir funções antioxidantes. Verificou contudo que a piridoxamina previne a modificação de proteínas nas reacções de oxidação catalizada por metais na formação de produtos da peroxidação lipídica do ácido linoleico.

Alderson e colaboradores (Alderson *et al*, 2003) demonstraram que a piridoxamina inibe a modificação de proteínas pelos produtos de peroxidação lipídica,

incluindo a inibição da formação de MDA e de HNE, *in vitro*. A inibição da formação de ALEs é explicada pela capacidade da piridoxamina em sequestrar intermediários carbonilo durante as reacções de peroxidação lipídica.

Degenhart *et al* (Degenhart *et al*, 2002) e Alderson *et al* (Alderson *et al*, 2003) demonstraram que a piridoxamina inibe a formação de ALEs em ratos STZ e Zucker, respectivamente. Kang e colaboradores (Kang *et al*, 2006), demonstraram que a piridoxamina apresenta a capacidade de sequestrar o MDA, um importante intermediário da formação de ALEs durante a peroxidação lipídica, propondo que a piridoxamina ao sequestrar o MDA previne a formação de ALEs.

Murakoshi *et al*, (Murakoshi *et al*, 2008) demonstraram que a piridoxamina diminui a acumulação de MDA e portanto melhora a peroxidação lipídica em ratos KK-Ay/Ta.

Amarnath *et al*, (Amarnath *et al*, 2004) estudaram as reacções da piridoxamina com compostos 1,4-dicarbonílicos. Estas reacções iniciam-se mediante a formação de uma carboniloamina, que não é desidratada, sem que o grupo amina interaja de novo com outro grupo carbonilo com a consequente formação de pirrol, composto orgânico heterocíclico aromático insaturado, através da reacção de Paal-Knorr. Neste estudo (Amarnath *et al*, 2004) eles demonstraram que os compostos 1,4 dicarbonílicos são aproximadamente 2300 vezes mais rápidos que os grupos  $\epsilon$ -amina da lisina, devido à acção catalítica do grupo fenolato da piridoxamina.

No presente estudo verificou-se uma diminuição dos níveis de isoprostanos nos grupos sujeitos à administração de piridoxamina o que indica que a piridoxamina diminui a peroxidação lipídica, possivelmente através da capacidade de sequestrar intermediários reactivos.

No seu conjunto, estes dados estão de acordo com os resultados previamente descritos na literatura e sugerem que a piridoxamina está envolvida na peroxidação lipídica através da sequestração de intermediários reactivos produzidos durante a mesma.

Diversos estudos demonstraram danos no relaxamento dependente do endotélio em modelos animais diabéticos tipo 2 (Sena *et al*, 2009; Sena *et al*, 2011). Previamente foi demonstrado que o modelo animal GK exhibe disfunção endotelial precocemente aos 4 meses de idade (Cheng *et al*, 2001).

Por sua vez, neste modelo animal, a redução da vasodilatação dependente do endotélio tem sido observada experimentalmente em anéis de aorta isolados (Sena *et al*, 2008) e em microvasos mesentéricos (Cheng *et al*, 2001), indicando que a disfunção endotelial associada à diabetes afecta quer vasos de resistência quer de condução como a aorta.

No presente estudo, os resultados obtidos nos anéis de aorta mostraram danos na resposta mediada pelo endotélio em ratos GK com 6 meses de idade. A administração de piridoxamina durante 4 semanas melhorou esta disfunção endotelial.

O termo disfunção endotelial tem sido associado a diversas condições patológicas (Lu *et al*, 2007). Na diabetes, ocorrem danos no relaxamento vascular dependente do endotélio provocado pela redução da actividade do NO na parede dos vasos (Lu *et al*, 2007) e a disfunção endotelial pode ser avaliada pela reduzida resposta da vasodilatação dependente do endotélio à acetilcolina (Ding & Triggle, 2005).

A reduzida resposta arterial à acetilcolina no grupo GK demonstra que este modelo animal de diabetes apresenta disfunção endotelial. A estimulação dos receptores muscarinico  $M_3$  pela acetilcolina liberta NO no endotélio que difunde para as células musculares e activa a sGC, que por sua vez aumenta os níveis de cGMP e induz o relaxamento das células musculares lisas (Lam *et al*, 2006). A redução da quantidade de NO leva as células musculares a diminuírem o seu relaxamento. Este resultado está de acordo com os resultados desenvolvidos que demonstram a diminuição do relaxamento em humanos e modelos animais diabéticos (Bitar *et al*, 2005).

Observou-se, no presente estudo que o relaxamento induzido por acetilcolina na presença de L-NAME, um inibidor da eNOS, estava francamente comprometido. Através deste resultado pode-se aferir que a eNOS foi inibida e por sua vez, não se produziu NO e por conseguinte não se verificou vasorelaxamento.

Estudos prévios focam-se na comparação entre o relaxamento induzido pela acetilcolina, relaxamento dependente do endotélio, e no nitroprussido de sódio, relaxamento independente do endotélio (Chirkov & Horowitz, 2007; Lam *et al*, 2006) em modelo de animais normais e diabéticos, observando-se uma redução dos níveis de relaxamento mediados por acetilcolina (Lam *et al*, 2006), contrariamente, à resposta ao nitroprussido de sódio (Chirkov & Horowitz, 2007).

Neste estudo verificou-se uma diminuição no relaxamento máximo em resposta a ACh, o que está de acordo com a literatura e como que foi previamente observado neste modelo animal de diabetes (Sena *et al*, 2011). Não se observaram diferenças no relaxamento máximo dependente do endotélio em resposta a SNP entre os grupos. Observou-se um aumento da sensibilidade à acção da ACh no grupo GK+P comparativamente ao grupo GK.

Os resultados demonstram que o modelo animal GK apresenta uma maior sensibilidade ao SNP que é reforçada com a administração de piridoxamina. O SNP é um dador de NO exógeno (Chirkov & Horowitz, 2007), decompõe-se espontaneamente para produzir NO, consequentemente induz a vasodilatação independente do endotélio pelo mesmo mecanismo que o NO libertado pelo endotélio, isto é, activação da sGC (Yeh-Siang *et al*, 2011).

A elevada produção de ROS tem sido correlacionada, com a redução dos níveis de NO libertado a partir do endotélio (Lam *et al*, 2006) que por sua vez diminui

o relaxamento induzido pela acetilcolina e parcialmente o relaxamento induzido pelo SNP. O tratamento com a piridoxamina melhora o relaxamento induzido pela ACh, sugerindo que esta vitamina B6, pode aumentar a biodisponibilidade de NO devido a efeitos *scavenging* de ROS.

O tratamento com piridoxamina melhorou a resposta de relaxamento dependente do endotélio e a sensibilidade ao dador de NO, constituindo-se uma evidência do efeito benéfico da piridoxamina no relaxamento induzido por ACh principalmente por aumentar a biodisponibilidade de NO endotelial.

No presente estudo, avaliou-se a fosforilação da VASP como um parâmetro de avaliação da integridade da via de sinalização NO/cGMP e da actividade do NO.

Primeiramente, demonstrou-se que os níveis de VASP na aorta são um indicador da integridade do endotélio em condições fisiológicas normais e patológicas e que o NO produzido no endotélio ou após interações com ROS é monitorizado pela diminuição dos níveis de expressão de VASP.

Na parede vascular, a fosforilação da VASP no resíduo de Ser239 é regulado pelo NO. A fosforilação da VASP na Ser239 é um marcador útil de monitorização da activação e da sinalização da via PKG (Lawrence & Pryzwansky, 2001; Oelze *et al*, 2001). A sua fosforilação no resíduo Ser239 é um marcador de disfunção endotelial, devido a alterações na via de sinalização do NO/cGMP e *stress* oxidativo, sendo verificado por múltiplos estudos (Chen *et al*, 2008; Melichar *et al*, 2004).

Verificou-se que no modelo animal de diabetes tipo 2 houve uma diminuição dos níveis de VASP fosforilada / VASP total, aferindo-se que há alterações na via de sinalização NO/cGMP. Através deste resultado pode-se assim verificar que existe uma diminuição da biodisponibilidade de NO e conseqüentemente uma diminuição no relaxamento das células musculares, uma vez que as células musculares são o principal alvo da sinalização NO/cGMP estando esta via de sinalização nas células endoteliais a emergir como um regulador chave na biologia vascular (Chen *et al*, 2008).

Estes resultados, em conjunto com os resultados da avaliação da vasodilatação mediada por ACh comprovam que o modelo GK apresenta disfunção endotelial devida a uma diminuição da biodisponibilidade do NO. O tratamento com piridoxamina melhorou a integridade da via de sinalização NO/cGMP que se traduziu por um aumento dos níveis de expressão de VASP fosforilada/VASP total.

Este resultado pode estar associado a um dos mecanismos de acção da piridoxamina que é a capacidade de sequestrar ROS descrita na literatura. Como o caso do estudo desenvolvido por Voziyan & Hudson, (Voziyan & Hudson, 2005) que demonstrou que a piridoxamina pode neutralizar HO<sup>•</sup> devido à doação de um protão do grupo fenol na posição 3 e devido ao efeito de complexação



com os iões metálicos que catalisam. Assim como, Jain & Lim (Jain & Lim, 2001) demonstraram que a piridoxamina inibe a produção de  $O_2^{\bullet-}$ .

Pretendeu-se durante o decurso deste estudo correlacionar a actividade da enzima eNOS com a redução da vasodilatação em modelos animais de diabetes tipo 2. No entanto, não se verificaram alterações significativas nos níveis de expressão da eNOS entre os diferentes grupos.

De forma especulativa, pode-se aferir que os elevados níveis de *stress* oxidativo verificados anteriormente não estão a alterar significativamente a função da eNOS, mantendo-se a enzima funcionalmente activa na produção de NO.

O desacoplamento da eNOS pelas ROS é um mecanismo adicional pelo qual a glicose contribui para a disfunção endotelial. A hiperglicemia eleva a produção de  $O_2^{\bullet-}$  no endotélio sendo este conhecido por inactivar e produzir ONOO<sup>-</sup>, que oxida o BH<sub>4</sub> conduzindo ao desacoplamento da eNOS (Sena *et al*, 2008). O desacoplamento da eNOS não se verificou neste estudo, possivelmente pelo facto de os animais estudados apresentavam apenas uma hiperglicemia moderada. Neste estudo o modelo diabético tem apenas 6 meses e não é o modelo de diabetes de longa duração utilizado por Sena e colaboradores (Sena *et al*, 2008).

Neste estudo verificámos ainda que a piridoxamina não interfere directamente com a actividade enzimática da eNOS, mas pode actuar porventura ao nível da captação de ROS.

Contudo, alterações na vasodilatação dependente do endotélio podem ainda ser relacionadas com os níveis de AGEs. Os AGEs podem reduzir a biodisponibilidade e a actividade do NO produzido no endotélio (Goldin *et al*, 2006).

Na diabetes tipo 2 danos na vasodilatação podem ser associados com os níveis de AGEs. Os níveis séricos de AGEs em doentes com diabetes tipo 2 são inversamente relacionados com nível de vasodilatação dependente e independente do endotélio (Goldin *et al*, 2006). Supõe-se que a formação de AGEs induz a formação de ROS que por conseguinte reduz os níveis de NO, desenvolvendo-se um estado de *stress* oxidativo (Wu *et al*, 2011).

Considerando os estudos prévios, pretendeu-se avaliar a prevenção da disfunção endotelial com a inibição da formação de AGEs na presença da piridoxamina de modo a preservar a produção de NO na aorta. Para tal avaliaram-se os níveis de CML que é um dos AGEs melhor caracterizado quimicamente e também um dos mais abundantes (Goh & Cooper, 2008; Rojas & Morales, 2004). Por sua vez, sabe-se que elevados níveis de CML estão associados com a diabetes e a aterosclerose (Baynes & Thorpe, 2000).

Neste estudo verificou-se os níveis de CML são mais elevados nos animais diabéticos, o que está de acordo com o esperado (Baynes & Thorpe, 2000) e que o tratamento com a piridoxamina diminuiu os níveis de CML.

A piridoxamina é a vitamina B6 com melhores propriedades inibitórias (Vozyan & Hudson, 2005). A piridoxamina foi proposta como inibidor da glicação por Booth *et al*, (Booth *et al*, 1996) e numerosos estudos têm revelado a sua excelente capacidade para inibir a formação de AGEs *in vivo* (Degenhardt *et al*, 2002; Nagaraj *et al*, 2002; Vozyan & Hudson, 2005). A sua concentração nos seres vivos é reduzida e resulta da transaminação da piridoxa. A administração exógena de piridoxamina aumenta os seus níveis plasmáticos e posteriormente é excretada sem alterações metabólicas (Degenhart *et al*, 2002). Este conjunto de constatações associadas à sua reduzida toxicidade (LD50 em roedores de 5000-7500 mg/Kg) confere à piridoxamina relevância como eventual agente terapêutico em patologias associadas à diabetes (Williams *et al*, 2006)

A piridoxamina foi descrita com um inibidor de AGEs, e pensa-se que actua como um sequestrador nucleófilico de intermediários carbonilo que se produzem durante a formação de AGEs (Vozyan *et al*, 2002).

Vozyan e colaboradores (Vozyan *et al*, 2002), demonstraram que a piridoxamina reage directamente com intermediários da reacção de Maillard, como o glioxal e o glicaldeído, e inibe a formação de CML. Esta reacção inicia-se pelo ataque nucleófilico da amina sobre o carbonilo do glioxal formando-se uma carbinolamina que sofre desidratação e origina uma base de Schiff. Esta base de Schiff é atacada pelo nucleófilico do grupo fenolato e forma um anel hemiaminal (Vozyan *et al*, 2002).

Recentemente, Chetyrkin *et al*, (Chetyrkin *et al*, 2008) estudaram a reacção entre a piridoxamina e o 3-deoxiglicosona, um intermediário carbonilo reactivo. E verificaram que a piridoxamina apresenta a capacidade de inactivar desoxihe-xosas e formar ácidos polihidroxicarbonados.

Este mecanismo de acção da piridoxamina reforça a teoria de que a diminuição dos níveis de CML obtida neste ensaio experimental pode dever-se a reacção com intermediários carbonilos.

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de verificar a acção inibitória da piridoxamina na formação de AGEs.

Degenhart *et al*, (Degenhart *et al*, 2002) e Alderson *et al*, (Alderson *et al*, 2003), demonstraram que a piridoxamina inibe a formação de AGEs, designadamente, CML e CEL *in vivo* e retarda o desenvolvimento de nefropatia em modelos animais diabéticos STZ e Zucker, respectivamente. Porém, Alderson e colaboradores (Alderson *et al*, 2003), demonstraram ainda que a piridoxamina reduz a rigidez da aorta e de arteriolas renais.

Ornato e colaboradores (Ornato *et al*, 2000) também observaram que a piridoxamina inibe a formação de CML e CEL. Stitt *et al*, (Stitt *et al*, 2002) verificou que a piridoxamina retarda a retinopatia e a acumulação de CML na estrutura vascular da retina.

Os resultados dos estudos mencionados estão de acordo com o resultado obtido neste estudo, a diminuição dos níveis de CML promovida pela piridoxamina.

Os elevados níveis de CML observados no modelo animal diabético neste estudo podem ser associados com os elevados níveis de peroxidação lipídica igualmente observados. Uma vez que a peroxidação lipídica forma compostos carbonilo reactivos que reagem com as proteínas e formam ALEs. O CML que pode ser formado através de glicação ou através de peroxidação lipídica (Schalkwijk, 2007). Assim, nestes estudos os níveis de peroxidação lipídica e CML estão correlacionados e de acordo com este estudo.

O RAGE participa numa grande diversidade de patologias como é o caso da diabetes. Assim, torna-se um alvo biológico atractivo no tratamento das doenças a que se associa (Raucci *et al*, 2008).

Os níveis de expressão de RAGE, um receptor para AGEs foram avaliados, e ocorreu um aumento da sua expressão no grupo diabético relativamente ao grupo W controlo, de acordo com o esperado.

Outros estudos em modelos animais diabéticos mostram uma elevada expressão de RAGE no endotélio vascular (Hudson *et al*, 2002). Comparando o modelo animal diabético com o modelo animal sujeito ao tratamento com piridoxamina verificou-se uma clara diminuição dos níveis de expressão de RAGE. Esta diminuição pode dever-se à capacidade da piridoxamina em interagir com intermediários carbonilo e diminuir os níveis de CML como foi comprovado neste estudo, através da avaliação dos níveis de CML. O CML, por sua vez é um ligando do RAGE (Kalea *et al*, 2009) e os seus níveis são reduzidos neste grupo de animais, o que demonstra a associação paralela entre os níveis de CML e a expressão de RAGE.



## **V. CONCLUSÃO**

---



Os resultados do presente estudo sugerem a importância do *stress* oxidativo e dos AGEs na patogénese da disfunção endotelial e os efeitos benéficos da piridoxamina.

Neste estudo verificou-se que a diabetes tipo 2 está na base da disfunção endotelial e ocorre em estados precoces desta patologia.

O tratamento com piridoxamina melhorou os níveis de triglicéridos nos animais tratados, contudo não modificou a concentração sanguínea de glicose em jejum diminuindo apenas a glicemia às 2 horas após sobrecarga glicosada.

Demonstrou-se que nesta fase os animais diabéticos apresentavam níveis elevados de peroxidação lípida, avaliados pelos níveis de 8-isoprostanos. Verificou-se que a piridoxamina diminuiu os níveis de 8-isoprostanos, e por conseguinte a peroxidação lípida, possivelmente através da interacção com os produtos que se formam durante este processo.

Os resultados demonstraram uma diminuição da vasodilatação dependente do endotélio em resposta a acetilcolina neste modelo animal diabético o que demonstra que a função endotelial se apresentava comprometida. Verificou-se também que o tratamento com piridoxamina melhorou o relaxamento dependente e independente do endotélio porventura, através da actividade antioxidante de *scavenging* ROS da piridoxamina. Os resultados obtidos para os níveis de expressão da VASP sugerem que os animais diabéticos apresentavam alterações na via de sinalização NO/cGMP o que reforça a ideia que estes animais apresentavam disfunção endotelial. De salientar que o tratamento com piridoxamina melhorou os níveis de expressão de VASP, revertendo as alterações na sinalização NO/cGMP e por conseguinte no vasorelaxamento das células musculares lisas. Este resultado reforça a ideia de que a piridoxamina apresenta a capacidade de *scavenging* ROS.

Nesta fase inicial de diabetes tipo 2 não se verificaram alterações na expressão da eNOS. Constatando-se que a eNOS não é o principal alvo dos ROS na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2.

Neste estudo comprovou-se o potencial efeito inibitório na formação de AGEs, nomeadamente CML, por parte da piridoxamina em animais GK diabéticos. E a subsequente redução dos níveis de expressão do respectivo receptor, RAGE, em animais diabéticos tratados.

Em suma, os resultados obtidos neste estudo são de extrema importância, no tratamento da disfunção endotelial evitando que esta se agrave e progrida para aterosclerose. A piridoxamina demonstrou ter um impacto positivo nos marcadores de *stress* oxidativo, glicação e de vasorelaxamento do endotélio, componentes que são essenciais nas alterações observadas na disfunção endotelial associada à diabetes tipo 2. Na globalidade, os resultados reforçam o potencial farmacológico da piridoxamina na terapêutica da disfunção endotelial macrovascular, em doentes diabéticos tipo 2.





## **VI. REFERÊNCIAS**

---



Adrover M, Vilanova B, Frau J, Muñoz F, Donoso J. The pyridoxamine action on Amadori compounds: A reexamination of its scavenging capacity and chelating effect. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16(10): 5557-5569.

Ahmed N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; 67(1):3-21.

Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol*. 2004; 13(3):125-38.

Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, Baynes JW. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int*. 2003; 63(6):2123-33.

Amarnath V, Amarnath K, Amarnath K, Davies S, Roberts LJ. Pyridoxamine: an extremely potent scavenger of 1,4-dicarbonyls. *Chem Res Toxicol*. 2004; 17(3):410-415.

Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction. *Pflugers Arch*. 2010; 460(6):965-974.

Avogaro A, de Kreutzenberg SV, Fadini G. Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008; 82(2):S94-S101.

Avogaro A, Fadini GP, Gallo A, Pagnin E, de Kreutzenberg S. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006; 16(1) S39-S45.

Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol*. 2009; 62(10):1161-1178.

Bakker W, Eringa EC, Spiekema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue*. 2009; 335(1):165-189.

Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, Burow DL, Conklin CA, Hu Z, Reuf J, Horaist C, Lebovitz R, Hunter GC, McIntyre K, Runge MS. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*. 2002; 106(5):544-549.

Basta G, Schimdt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(4):582-592.

Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28(12):1708-1716.

Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol*. 2005; 511(1):53-64.

Blume C, Benz PM, Walter U, Ha J, Kemp BE, Renné T. AMP-activated protein kinase impairs endothelial actin cytoskeleton assembly by phosphorylating vasodilator-stimulated phosphoprotein. *J Biol Chem*. 2007; 282(7):4601-4612.

Booth AA, Khalifah RG, Hudson BG. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 220(1):113-119.

Bottiroli G, Croce AC. Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3(11-12):189-210

Boyle PJ. Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am J Med*. 2007; 120(9):S12-S17.

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

Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL: Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009; 41(11):2109-2113.

Busse R, Fleming I. Vascular and blood flow. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 176(2): 43-78.

Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Phys Thera*. 2008; 88(11):1322-1335.

Chang KC, Liang JT, Tsai PS, Wu MS, Hsu KL: Prevention of arterial stiffening by pyri-doxamine in diabetes is associated with inhibition of the pathogenic glycation on aortic collagen. *Br J Pharmacol*. 157(8):1419-26, 2009.

Chen H, Levine YC, Golan DE, Michel T, Lin AJ. Atrial natriuretic peptide-initiated cGMP pathways regulate vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and angiogenesis in vascular endothelium. *J Biol Chem*. 2008; 283(7):4439-47.

Cheng D. Prevalence, predisposition and prevention of type II diabetes. *Nutr Metab*. 2005;2:29.

Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H, Muller D, Park JK, Luft FC, Mervaala EM. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension*. 2001;37(2):433-439.

Chetyrkin SV, Zhang W, Hudson BG, Serianni AS, Voziyan PA. Pyridoxamine protects proteins from functional damage by 3-deoxyglucosone: mechanism of action of pyridoxamine. *Biochemistry*; 47(3):997-1006.

Chirkov YY, Horowitz JD. Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol Ther*. 2007;116(2):287-305.

Clarke M, Bennett M, Littlewood T. Cell death in the cardiovascular system. *Heart*. 2007; 93(6):659-64.

Creager MA, Lüscher TF, Consentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 2003; 108(12): 1527-1532.

Culbertson SM, Enright GD, Ingold KU. Synthesis of a novel radical trapping and carbonyl group trapping anti-AGE agent: a pyridoxamine analogue for inhibiting advanced glycation (AGE) and lipoxidation (ALE) end products. *Org Lett*. 2003; 5(15):2659-2662.

Davì G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-isoprostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999; 99(2):224-2299.

Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002;61(3):939-50.

Ding H, Triggle CR. Endothelial cell dysfunction and the vascular complications associated with type 2 diabetes: assessing the health of the endothelium. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(1):55-71.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82(1):47-95.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michael T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006; 46:235-276.

Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardio-vasc Res.* 2007; 75(2):247-60.

Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, Ebisuno M, Ohira M, Saiki A, Koide N, Oyama T, Takeyoshi M, Shirai K. Probuocol and atorvastatin decrease urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with diabetes and hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 2006; 13(1):68-75.

Ergul A. Endothelin-1 and diabetic complications: Focus on the vasculature. *Pharmacol Res.* 2011; 63(6):477-482.

Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2010; 636(1-3):8-17.

Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Arch.* 2010;459(6):923-39.

Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(4):791-810.

Giannotti G, Landmesser U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. *Herz.* 2007; 32(7):568-572.

Giannouskakis N. Pyridoxamine (BioStratum). *Curr Opin Investg Drugs*. 2005; 6(4):410-418.

Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(4):1143-1152.

Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004; 104(8):1287-1291.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006; 114(6): 597-605.

Gopaul NK, Anggård EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 alpha levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*. 1995; 368(2):225-229.

Guerci B, Kearney-Schwartz A, Böhme P, Zannad F, Drouin P. Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 1: physiology and methods for exploring the endothelial function. *Diabetes Metab*. 2001; 27(4):425-34.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(5):367-377.

Hadi HA, Suwaidi JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853-76.

Hagiwara S, Gohda T, Tanimoto M, Ito T, Murakoshi M, Ohara I, Yamazaki T, Matsumoto M, Horikoshi S, Funabiki K, Tomino Y. Effects of pyridoxamine (K-163) on glucose intolerance and obesity in high-fat diet C57BL/6J mice. *Metabolism*. 2009; 58(7):934-945.

Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. 2007; 4(2):84-88.

Helmerson J, Vessby B, Larsson A, Basu S. Association of type 2 diabetes with cyclooxygenase-mediated inflammation and oxidative stress in an elderly population. *Circulation*. 2004; 109(14):1729-1734.

Hidalgo FJ, Zamora R. Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043:319-26.

Hsueh WA, Quiñones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*. 2003; 92(4A):10J-17J.

Hudson BI, Hofmann MA, Bucciarelli L, Wendt T, Moser B, Lu Y, Qu W, Stern DM, D'Agati Yan SD, Yan SF, Grant PJ, Schmidt AM. Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Current Science*. 2002; 83(12):1515-1521.

Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006; 29(6):1420-1432.

Ibarra-Alvarado C, Galle J, Melichar VO, Mameghani A, Schmidt HH. Phosphorylation of blood vessel vasodilator-stimulated phosphoprotein at serine 239 as a functional biochemical marker of endothelial nitric oxide/cyclic GMP signaling. *Mol Pharmacol*. 2002; 61(2):312-319.

Jain SK, 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 Radic Biol Med*; 30(3):232-237.

Jain SK. Vitamin B6 (pyridoxamine) supplementation and complications of diabetes. *Metabolism*. 2007; 56(2):168-171.

Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*. 2004; 53(2):131-142.

Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2007; 262(2):173-183.

Jay D, Hitomi H, Griending KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(2):183-92.



Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci*. 2009; 116(8):621-637.

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*. 2006; 30(1):55-61.

Kaviarasan S, Muniandy S, Qvist R, Ismail IS. F(2)-isoprostanes as novel biomarkers for type 2 diabetes: a review. *J Clin Biochem Nutr*. 2009; 45(1):1-8.

Kawahito S, Kitahata H, Oshita S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol*. 2009;15(33):4137-42.

Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of ad-vanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257(2):251-258.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113(15):1888-18904.

Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*. 2010; 92(9): 1186-1198.

Lam TY, Seto SW, Lau YM, Au LS, Kwan YW, Ngai SM, Tsui KW. Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic +db/+db mice. *Eur J Pharmacol*. 2006; 546(3):134-41.

Lawrence DW, Pryzwansky KB. The vasodilator-stimulated phosphoprotein is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase during neutrophil spreading. *J Immunol*. 2001; 166(9):5550-5556.

Ley K, Reutershan J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; 176(2):92-133.

Li XA, Everson W, Smart EJ. Nitric oxide, caveolae, and vascular pathology. *Cardiovasc Toxicol*. 2006; 6(1):1-13.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-874.

Lin L. RAGE on the toll road? *Cell Mol Immunol*. 2006; 3(5):351-8.

Lu J, Zhu SM, Zang WJ, Xu XL, Luo HL, Yu XJ, Wang SP, Kong SS, Wu J, Horie M, Sun L. Protective mechanism of adenosine to the rat arterial endothelial dysfunction induced by hydrogen peroxide. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(7):1206-1211.

Magalhães PM, Appell HJ, Duarte JA. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic complications: the protective role of regular physical activity. *Eur Rev Aging Phys Act*. 2008; 5:17–29.

Maillard-Lefebvre H, Boulanger E, Daroux M, Gaxatte C, Hudson BI, Lambert M. Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases. *Rheumatology*. 2009; 48(10):1190-1966.

Matheson A, Willcox MD, Flanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26(3):150-171.

Meeuwisse-Pasterkamp SH, van der Klauw MM, Wolffenbuttel BH. Type 2 diabetes mellitus: prevention of macrovascular complications. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008; 6(3):323-341.

Melichar VO, Behr-Roussel D, Zabel U, Uttenthal LO, Rodrigo J, Rupin A, Verbeuren TJ, Kumar H S A, Schmidt HH. Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(47):16671-16676.

Michael JB, Feron O, Sacks D, Michael T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxidase synthase by Ca<sup>2+</sup>- calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*. 1997; 272(25); 15583-15586.

Michael T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*. 2010; 459(6): 807-816.

Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(1):S193-201.

Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):1-15.

Murakoshi M, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Ohara I, Toyoda H, Ishikawa Y, Hori-koshi S, Tomino Y. Pleiotropic effect of pyridoxamine on diabetic complications via CD36 expression in KK-Ay/Ta mice. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009; 83(2):183-189.

Nacci C, Tarquinio M, Montagnani M. Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes. *Intern Emerg Med*. 2009; 4(2):107-16.

Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A, Biemel KM, Lederer MO, Padayatti PS. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys*; 402(1):110-119.

Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidant Redox Signal*. 2009;11(12):3071-3109.

Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*. 2007; 583(1):9-24.

Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, Walter U, Skatchkov M, Meinertz T, Münzel T. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*. 24; 87(11):999-1005.

Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR, Baynes JW. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. Mechanism of action of pyridoxamine. *J Biol Chem*. 2000; 275(28):21177-21184.

Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008; 54(1):24-38.

Papaioannou GI, Seip RL, Grey NJ, Katten D, Taylor A, Inzucchi SE, Young LH, Chyun DA, Davey JA, Wackers FJ, Iskandrian AE, Ratner RE, Robinson EC, Carolan

S, Engel S, Heller GV. Brachial artery reactivity in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus and microalbuminuria (from the Detection of Ischemia in Asymptomatic Diabetics-brachial artery reactivity study). *Am J Cardiol*. 2004; 94(3):294-299.

Peppia M, Uribarri J, Vlassara H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. *Clin Diabetes*. 2003; 21(4):186-7.

Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol*. 2006; 54(7): 495-419.

Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu' MR, Montagnani M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem*. 2009; 16(1): 94-112.

Rahbar S, Figarola JL. Inhibitors and breakers of advanced glycation end products. *Curr Med Chem*, 2002; 2:135-161.

Ramanujam N. Fluorescence Spectroscopy In Vivo. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2000; 20-56.

Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, Barabino SM, Monti L, Bierhaus A, Reiss K, Saftig P, Bianchi ME. A soluble form of the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). *FASEB J*. 2008;22 (10):3716-327.

Riad A, Westermann D, Van Linthout S, Mohr Z, Uyulmaz S, Becher PM, Rütten H, Wohlfart P, Peters H, Schultheiss HP, Tschöpe C. Enhancement of endothelial nitric oxide synthase production reverses vascular dysfunction and inflammation in the hindlimbs of a rat model of diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51(12):2325-2332

Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: a link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci*. 2004; 76(7):715-730.

Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2010; 1(3):68-75.

Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia*. 2008; 51(5):714-725.

Schäfer A, Fraccarollo D, Werner L, Bauersachs J. Guanylyl cyclase activator ataciguat improves vascular function and reduces platelet activation in heart failure. *Pharmacol Res.* 2010; 62(5):432-438.

Schäfer A, Fraccarollo D, Werner L, Bauersachs J. Guanylyl cyclase activator ataciguat improves vascular function and reduces platelet activation in heart failure. *Pharmacol Res.* 2010;62(5):432-438

Schalkwijk CG, Stehouver CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci.* 2005; 109(2):143-159.

Schalkwijk CG. Therapeutic Interventions in glyc(oxid)ation pathway. *Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem.* 2007;7: 57-68.

Schönbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2000. 156(1):7-14.

Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007; 73(3):470-480.

Scott J. Pathophysiology and biochemistry of cardiovascular disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14(3):271-279.

Seiça RM, Suzuki KI, Santos RM, Do Rosário LM. Impaired insulin secretion in isolated islets of Goto-Kakizaki rats, an animal model of non obese type 2 diabetes, is a primary event. *Acta Med Port.* 2004; 17(1):42-48.

Sena CM, Louro T, Matafome P, Nunes E, Monteiro P, Seiça R. Antioxidant and vascular effects of gliclazide in type 2 diabetic rats fed high-fat diet. *Physiol Res.* 2009; 58(2): 203-209.

Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernandes R, Seiça RM. (2011) Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2011; 163(2): 424–437.

Sena CM, Nunes E, Louro T, Fernandes R, Boarder MR, Seiça RM. Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats.. *Br J Pharmacol*. 153 (5):894-906, 2008.

Shah PK. Pathophysiology of coronary thrombosis: role of plaque rupture and plaque erosion. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002; 44(5):357-68.

Shen GX. Oxidative stress and diabetic cardiovascular disorders: roles of mitochondria and NADPH oxidase. *Can J Physiol Pharmacol*. 2010; 88(3):241-248.

Soldatos G, Cooper ME. Advanced glycation end products and vascular structure and function. *Curr Hypertens Rep*. 2006; 8(6):472-478.

Srikanth S, Deedwania P. Management of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Curr Cardiol Rep*. 2007; 9(4):264-271.

Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, Canning P, Frizzell N, Duffy N, Boyle C, Januszewski AS, Chachich M, Baynes JW, Thorpe SR. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes*. 2002; 51(9):2826-2832.

Stoll G, Bendszus M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*. 2006; 37(7):1923-32.

Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(11):2255-2264.

Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010;11(1):61-74.

Thomas MC, Baynes JW, Thorpe SR, Cooper ME: The role of AGEs and AGEs inhibitors in diabetic cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*. 6(4):453-74, 2005.

Thornalley PJ. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem Soc Trans*. 2003; 6:1341-1342.

van der Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010:79239.

Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep.* 2003;3(4):279-88.

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

Vlassara H, Palace MR. Glycooxidation: the menace of diabetes and aging. *T Sinai J Med.* 2003; 70(4):232-241.

Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine: the many virtues of a maillard reaction inhibitor. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:807-816.

Voziyan PA, Metz TO, Baynes W, Hudson BG. A post-Amadori inhibitor pyridoxamine also inhibits chemical modification of proteins by scavenging carbonyl intermediates of carbohydrate and lipid degradation. *J Biol Chem.* 2002; 277(5):3397-3403.

Wallace JP, Johnson B, Padilla J, Mather K. Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review. *Int J Clin Pract.* 2010; 64(3):389-403.

Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res.* 2004; 95(3):233-238.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004; 27(3):1047-1053.

Williams ME. New potential agents in treating diabetic kidney disease: the fourth act. *Drugs.* 2006;66(18):2287-2298.

Wu ET, Liang, Wu MS, Chang KC. Pyridoxamine prevents age-related aortic stiffening and vascular resistance in association with reduced collagen glycation. *Exp Gerontol.* 2011; 46(6):482-488.

Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res*. 2003; 93(12):1159-1169.

Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res*. 2006; 4(1):53-65.

Yeh-Siang L, Subramaniam G, Hadi AH, Murugan D, Mustafa MR. Reactive oxygen species-induced impairment of endothelium-dependent relaxations in rat aortic rings: protection by methanolic extracts of *Phoebe grandis*. *Molecules*. 2011; 16(4):2990-3000.

Zieman S, Kass D. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail*. 2004; 10(3):144-149.



