
Agradecimentos

À minha família, principalmente aos meus pais, que sempre me encorajaram e apoiaram incondicionalmente. Um “obrigada” especial à minha Mãe!

Ao João, o meu apoio, pela atenção e incentivo.

A todos os meus amigos e colegas, que sempre me acompanharem nos bons e maus momentos de todo este percurso pessoal e académico.

À Professora Doutora Raquel Seiça, pela sua preciosa orientação, amizade e compreensão.

Aos colegas e amigos de laboratório: Lisa, Paulo e Teresa, pela colaboração e principalmente pelo valioso companheirismo.

À Professora Doutora Cristina Sena e Professora Doutora Paula Moreira, pelo apoio e pelos conselhos prestados.

Ao Sr. Mário Simões, pelo apoio técnico e sobretudo pelo incentivo.

Este trabalho foi realizado no âmbito da colaboração existente entre o Instituto de Fisiologia e o Centro de Oftalmologia, pertencentes à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; agradeço o apoio económico desta Faculdade na concretização do trabalho prático.

ÍNDICE

Agradecimentos	V
ÍNDICE	VII
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
INTRODUÇÃO	1
1. O coração	3
2. Isquemia - Reperusão	5
2.1 Mecanismos gerais responsáveis pelos danos numa situação de isquemia - reperusão	6
2.1.1 Esgotamento de ATP	6
2.1.2 Danos mitocondriais	8
2.1.3 Alteração da homeostase do cálcio	9
2.1.4 Aumento dos níveis de stress oxidativo	10
2.1.5 Resposta inflamatória	12
2.1.6 Disfunção endotelial vascular	12
3. A diabetes tipo 2	13
4. A diabetes tipo 2 versus isquemia cardíaca	16
5. O coração diabético	17
6. A angiogénese na resposta a um fenómeno isquémico	19
7. O metilglioxal	21
7.1 O metilglioxal na diabetes	23
8. Objectivos	25
MATERIAIS E MÉTODOS	27
Materiais	29
Métodos	29
1. Animais	29
2. Tratamentos	30
3. Peso corporal	30

4.	Determinação da glicemia e da Hemoglobina-A1C	30
5.	Colheitas	31
5.1	Colheita de sangue	31
5.2	Colheita de urina	31
5.3	Colheita do coração	32
6.	Sistema Langendorff	32
7.	Técnicas de análise	33
7.1	Western Blot	33
7.2	Dot Blot	37
7.3	ELISA	38
7.4	Imunohistoquímica	38
7.5	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	39
8.	Análise estatística	40
RESULTADOS		41
1.	Caracterização geral	43
1.1	Peso corporal	43
1.2	Perfil glicêmico e HbA1C	43
1.3	Perfil lipídico	44
1.4	Níveis de metilglioxal plasmático	45
1.5	Marcadores da função vascular	46
1.5.1	Índice aterogénico	46
1.5.2	Albuminúria	46
2.	Avaliação do tecido cardíaco em condições basais	47
2.1	Níveis de metilglioxal	47
2.2	Níveis de Proteínas carbonilo	48
2.3	Níveis de AGEs e RAGEs	49
2.3.1	AGEs	49
2.3.2	RAGEs	50
3.	Caracterização da resposta cardíaca à isquemia	51
3.1	Níveis de HIF-1alfa	51
3.2	Níveis VEGF	51
3.3	Níveis de Akt total e fosforilada	53
3.3.1	Akt total	53
3.3.2	Akt fosforilada	54

3.4	Apoptose	55
3.4.1	Bax	55
3.4.2	Bcl-2	56
3.4.3	Caspase-3	57
	DISCUSSÃO	59
	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Soluções utilizadas em *Western Blot*.

Tabela II - Peso corporal.

Tabela III - Glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose, e HbA_{1c}.

Tabela IV - Níveis de ácidos gordos, triglicerídeos e colesterol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um corte longitudinal do coração humano.

Figura 2 - Consequências funcionais e morfológicas do decréscimo intracelular de ATP durante um fenómeno isquémico.

Figura 3 - Disfunção mitocondrial resultado de um evento de isquemia-reperfusão.

Figura 4 - Consequências do aumento citosólico de cálcio durante um fenómeno de isquemia-reperfusão.

Figura 5 - O papel das espécies reactivas de oxigénio nos danos por isquemia-reperfusão.

Figura 6 - Mecanismos de toxicidade da hiperglicemia.

Figura 7 - Representação esquemática da obstrução do fluxo sanguíneo nos vasos do coração, por formação de uma placa aterosclerótica.

Figura 8 - Representação química do metilglioxal.

Figura 9 - Vias de toxicidade do metilglioxal.

Figura 10 - Sistema de perfusão *Langendorff*.

Figura 11 - Níveis plasmáticos de metilglioxal.

Figura 12 - Índice aterogénico e albuminúria.

Figura 13 - Níveis de metilglioxal no tecido cardíaco.

Figura 14 - Proteínas carbonilo no tecido cardíaco.

Figura 15 - AGEs no tecido cardíaco.

Figura 16 - RAGEs no tecido cardíaco.

Figura 17 - HIF-1 alfa no tecido cardíaco.

Figura 18 - VEGF no tecido cardíaco.

Figura 19 - Akt no tecido cardíaco.

Figura 20 - Akt fosforilada no tecido cardíaco.

Figura 21 - Bax no tecido cardíaco.

Figura 22 - Bcl-2 no tecido cardíaco.

Figura 23 - Caspase-3 no tecido cardíaco.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - Adenosina difosfato

AGE - Produto final de glicação avançada

ATP - Adenosina trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

DAG - Diacilglicerol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

epm - Erro padrão da média

ER - Retículo endoplasmático

GK - Goto-Kakizaki

GSH/GSSG - Glutathiona reduzida/oxidada

HbA_{1C} - Hemoglobina glicada

H₂O - Água

HIF-1 - Factor-1 induzido por hipoxia

IRS-1 - Proteína substracto-1 do receptor de insulina

K⁺ - Potássio

Na²⁺ - Sódio

NAD⁺/NADH - Dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado/reduzido

NADP⁺/NADPH - Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato oxidado/reduzido

NO - Óxido nítrico

NOS - Sintetase do óxido nítrico

PKC - Proteína cinase C

RAGE - Receptor de AGE's

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

RNS - Espécies reactivas de nitrogénio

SOD - Superóxido dismutase

TNF- α - Factor de necrose tumoral α

UDP-GlcNAc- Uridina difosfato-N-acetilglucosamina

VEGF - Factor de crescimento endotélial vascular

VHL - von Hippel-Lindau

W - Wistar

RESUMO

Em pacientes com diabetes tipo 2 observa-se um risco aumentado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a isquemia cardíaca que, num pior prognóstico, pode levar ao enfarte do miocárdio, a causa de morte de aproximadamente 75% da população diabética. Os problemas inflamatórios e de *stress* oxidativo inseridos no quadro diabético fazem da diabetes *mellitus*, a doença que provavelmente, mais afecta a função vascular, desregulando-a e contribuindo assim para ocorrência de complicações vasculares, especificamente a macro e microangiopatia diabética.

Com o presente trabalho, propôs-se explicar o porquê da maior incidência de acidentes isquémicos cardíacos na população diabética, bem como a pior resposta, por parte desta população, a tais eventos.

A bem documentada toxicidade da hiperglicemia presente na diabetes, surge como a principal resposta ao desenvolvimento das complicações associadas à doença. A elevada concentração de glicose nas células traduz-se num aumento da concentração de um seu metabolito secundário, o metilglioxal. Postula-se então que, uma exposição prolongada ao metilglioxal possa induzir, em sujeitos normais, alterações semelhantes àquelas que ocorrem na diabetes.

Desta forma, foi realizado um estudo comparativo entre dois modelos animais, os ratos Wistar normais e os ratos Goto-Kakizaki diabéticos tipo 2 não obesos, sendo um grupo de animais normais submetido à administração de metilglioxal, perfazendo um total de três grupos experimentais (W, GK e WMG, respectivamente). Foram então determinados vários parâmetros sistémicos e cardíacos nos três grupos, recorrendo a diferentes técnicas laboratoriais, na tentativa de perceber o papel do metilglioxal na patologia diabética e o seu impacto no modelo animal normal.

Concluiu-se então que a administração de metilglioxal, nos ratos normais, foi capaz de mimetizar o perfil encontrado nos ratos diabéticos. O perfil basal encontrado nos corações dos grupos GK e WMG, semelhantes entre si, pode explicar a bem documentada ocorrência de acidentes isquémicos na diabetes e a sua relação com o aumento de processos de glicação.

Apesar de não terem sido efectuados estudos funcionais, o estudo da apoptose e da proteína Akt demonstrou, nos grupos GK e WMG, uma resposta celular piorada a um acidente isquémico, o que poderá estar associado aos níveis de HIF-1 alfa. A semelhança dos resultados nesses grupos re-afirmou a toxicidade do composto, tornando-o um potencial alvo terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE

Diabetes tipo 2; Isquemia cardíca; Metilglioxal

ABSTRACT

Patients with type 2 diabetes present an increased risk of development of cardiac diseases like ischemia, which in the worst case can lead to myocardial infarction, causing death to nearly 75% of population with diabetes.

Inflammatory problems and oxidative stress caused by diabetes *mellitus* make this disease to be the one that probably most affects vascular function, deregulating it, and thereby contributing to the occurrence of multiple related vascular diseases, specifically diabetic macro and microangiopathy.

The present study aimed at explaining the greater incidence of ischemic heart disease in the diabetic population, and a worse response, by this population, to such events.

The well-documented toxicity of hyperglycemia in diabetes plays an important role in the development of cardiovascular diseases.

The high concentration of glucose in cells results in an increased concentration of a secondary metabolite, the methylglyoxal. Then it is believed that prolonged exposure to methylglyoxal can induce, in normal subjects, changes similar to those that occur in diabetes.

Thus, we performed a comparative study of two animal models, normal rats and Goto-Kakizaki non-obese type 2 diabetic rats, with a group of normal animals submitted to the administration of methylglyoxal, having therefore a total of three experimental groups (W, GK and WMG, respectively).

We determined several systemic and cardiac parameters in all three groups, using different laboratory techniques, in an attempt to understand the role of methylglyoxal in diabetic disease and its impact on the normal animal model.

It was concluded that the administration of methylglyoxal in normal rats was able to mimic the profile found in diabetic rats. The basal profile found in the hearts of GK and WMG rats, similar to each other, may explain the well-documented occurrence of ischemic events in diabetes and its relationship with the increase of glycation processes. Although no functional studies have been carried out, the study of apoptosis and Akt protein demonstrated, in both GK and WMG groups, a worse cellular response to an ischemic attack, which may be associated with levels of HIF-1 alpha. The similarity of results in these groups re-affirmed the toxicity of the compound, making it a potential therapeutic target.

KEY WORDS

Type 2 diabetes; Cardiac ischaemia; Methylglyoxal

CAPÍTULO 1

Introdução

1. O Coração

O coração é o órgão central da circulação sanguínea, sendo maioritariamente constituído por uma massa contráctil, o miocárdio, revestido interiormente pelo endocárdio e exteriormente pelo pericárdio. Está dividido por um septo que separa a parte direita da esquerda que contêm uma aurícula e um ventrículo cada, num total de quatro cavidades. Este órgão possui quatro válvulas que permitem a entrada do sangue, a sua passagem pelas cavidades e saída deste do coração, evitando o seu refluxo. (Figura 1A)

O bombeamento do sangue é assegurado pelo batimento cardíaco realizado pelo tecido muscular cardíaco, que contrai segundo a teoria do deslizamento dos filamentos de actina e miosina controlado por cálcio. Contrariamente ao músculo esquelético, o músculo cardíaco contrai involuntariamente sendo, maioritariamente, regulado pelo sistema nervoso autónomo. Existem células no coração - células *pacemaker* - capazes de gerar impulsos eléctricos através da geração de potenciais de acção, onde estão envolvidos os canais de cálcio, potássio e sódio. Desta forma, estas células iniciam a contracção e controlam o ritmo e a frequência cardíaca. Existem ainda as células condutoras, que são células musculares especializadas na transmissão dos impulsos eléctricos. (Figura 1B)

O coração é responsável pelo bombeamento do sangue arterial que percorre todo o corpo (grande circulação), transportando oxigénio e nutrientes necessários ao sustento das actividades orgânicas por parte das células de todo o organismo. O sangue venoso regressa ao coração e volta a ser oxigenado após circulação pulmonar, retomando em seguida a grande circulação.

Para assegurar todo este processo, o coração necessita de uma boa irrigação sanguínea, de forma a não se privar de oxigénio e nutrientes. Desta forma, é detentor de uma vasta

rede de vasos sanguíneos, a rede coronariana, formada pelas artérias e veias coronárias que levam o oxigênio para toda a musculatura cardíaca. Este órgão realiza um grande dispêndio energético, assegurado pela produção de ATP (adenosina trifosfato) que ocorre, particularmente, por oxidação de ácidos gordos (principal fonte energética) ao nível da grande população de mitocôndrias que possui.

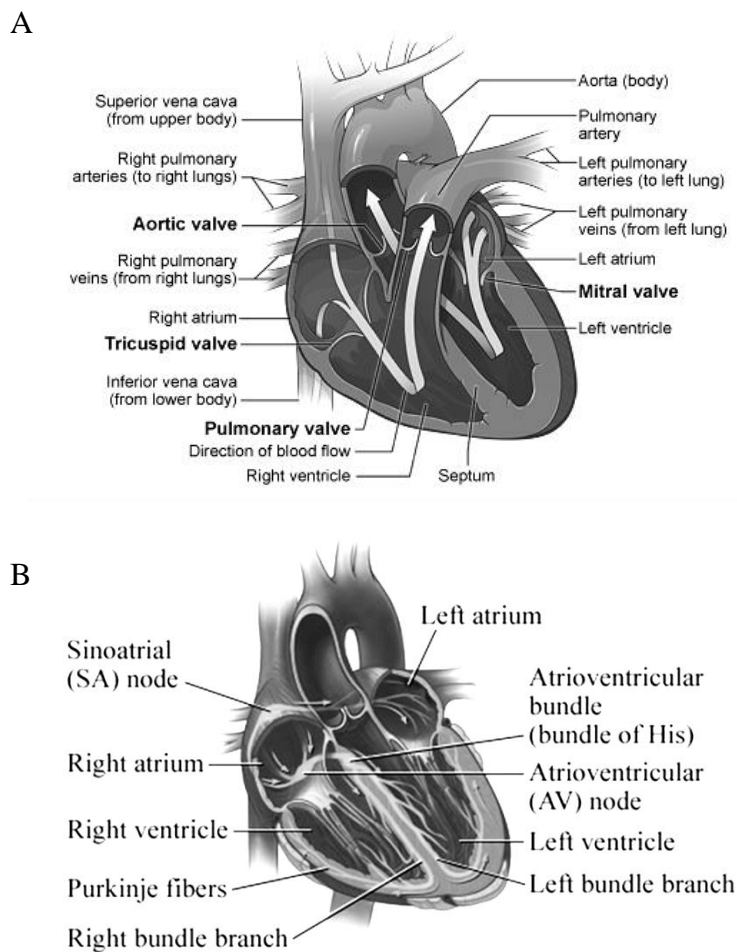


Figura 1: Representação esquemática de um corte longitudinal do coração humano.

(A) Anatomia cardíaca, evidenciando as suas cavidades, válvulas, artérias e veias, e ainda, a direcção do fluxo sanguíneo. (B) Fisiologia cardíaca, evidenciando a zona geradora de impulsos eléctricos (nódulo sinoauricular) e a transmissão das suas correntes.

(Figuras adaptadas de Healthwise.org)

A isquemia cardíaca é um fenómeno que pode desregular profundamente todo este funcionamento, podendo mesmo tornar-se fatal.

2. Isquemia-reperfusão

À interrupção da corrente sanguínea dá-se o nome de isquemia, sendo a reperfusão o posterior restabelecimento do fluxo sanguíneo. O sangue, através das hemácias, é o responsável por conduzir o oxigénio às células, e, como tal, um período de isquemia dá origem ao fenómeno de hipoxia. Desta forma, a hipoxia é a privação de oxigénio por parte dos tecidos. Durante um fenómeno isquémico, para além da insuficiência em oxigénio, ocorre também a privação de nutrientes e a inadequada remoção de metabolitos do tecido afectado.

Para além da própria adaptabilidade dos diferentes tipos celulares, a resposta celular a um insulto depende muito da severidade e da duração desse mesmo insulto. Desta forma, um pequeno período de isquemia pode induzir danos reversíveis, enquanto um período prolongado de isquemia poderá resultar directamente na morte celular ou em danos irreversíveis que conduzirão, em última instância, à morte das células. Desta forma, a reversibilidade deste processo prende-se com o rápido restabelecimento do fluxo sanguíneo, embora este processo acarrete danos adicionais para a célula. O paradoxo do restauro da corrente sanguínea nos tecidos isquémicos prende-se com o facto de, por um lado, poder resultar no restabelecimento das células reversivelmente lesadas ou, pelo contrário, levar ao agravamento dos danos causados pelo período de isquemia, que levarão à necrose e/ou apoptose de muitas células, processo apelidado de

lesão de reperfusão (Eefting et al., 2004; Evora et al., 1996; Ferdinandy et al., 2007; He et al., 2007; Lisa et al., 2006; Moens et al., 2005; Robbins et al., 2005).

Nos últimos anos, muito se tem estudado sobre os mecanismos causadores das lesões de isquemia-reperfusão. Vários trabalhos tentam separar e atribuir os diferentes eventos adversos à isquemia ou à reperfusão e, desta forma, têm surgido trabalhos controversos, não estando ainda clarificados os *timings* da formação/progressão dos danos, que, em última análise, provocam necrose/apoptose celulares.

2.1 Mecanismos gerais responsáveis pelos danos numa situação de isquemia-reperfusão

Quando a corrente sanguínea é interrompida, bem como quando volta a ser restabelecida, uma série de processos metabólicos e enzimáticos são afectados.

2.1.1 Esgotamento de ATP

As reservas de ATP são rapidamente consumidas e ocorre um decréscimo na sua síntese, uma vez que é maioritariamente produzido por fosforilação oxidativa, um processo dependente de oxigénio que ocorre na mitocôndria. Quando a concentração deste composto energético, com um papel central em processos de síntese e degradação celulares, está diminuída, vários processos são atingidos. A actividade da Na^+/K^+ -ATPase é diminuída, levando à diminuição intracelular de potássio (K^+) e acumulação intracelular de sódio (Na^{2+}) com consequente *swelling* celular. Ocorre alteração da fonte de energia, uma vez que a fosforilação oxidativa cessa, e as células recorrem apenas à glicólise para obter ATP. A via anaeróbia da glicólise aumenta, ocorrendo a rápida depleção do glicogénio e o aumento da acumulação de ácido láctico com a consequente

diminuição do pH e inatividade de certas enzimas. Outra consequência do esgotamento de ATP é a falência da bomba de cálcio, aumentando o seu influxo com prejuízo para vários componentes celulares. Com o prolongamento deste estado, estruturas como os ribossomos são alteradas, com consequente redução da síntese proteica e, como consequência última, a necrose (Eefting et al., 2004; Evora et al., 1996; Ferdinandy et al., 2007; Lisa et al., 2006; Moens et al., 2005; Robbins et al., 2005). (Figura 2)

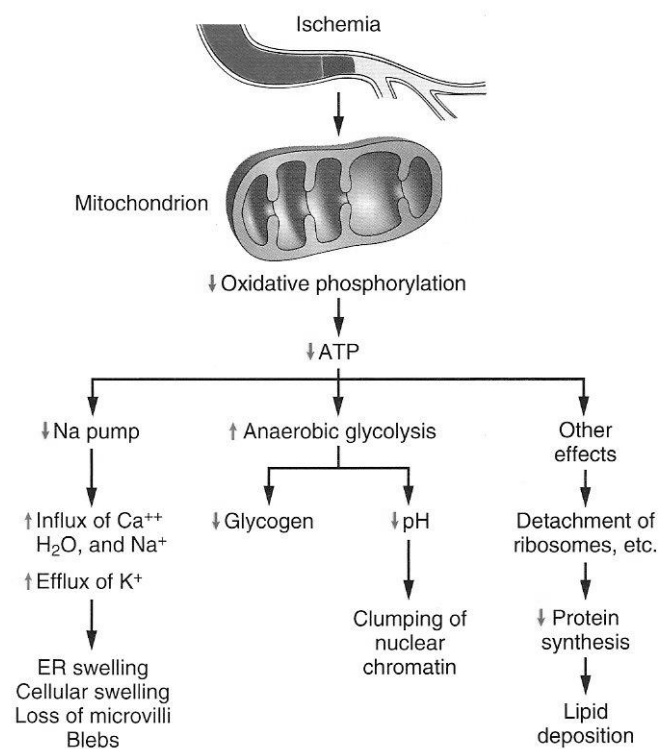


Figura 2: Consequências funcionais e morfológicas do decréscimo intracelular de ATP durante um fenômeno isquêmico.

ATP - adenosina trifosfato.

(Figura de Robbins et al., 2005)

2.1.2 Danos mitocondriais

A mitocôndria também é muito afectada durante um período de isquemia-reperfusão, através do aumento do cálcio citosólico, do *stress* oxidativo e da peroxidação lipídica. Muitas das vezes estes processos conduzem à formação de poros, que traduzem a permeabilidade transitória mitocondrial e que pode comprometer a força protomotriz mitocondrial. A membrana torna-se também permeável a proteínas que são parte integrante da cadeia transportadora de electrões e que, uma vez no citosol, funcionam como proteínas pró-apoptóticas, de que é exemplo o citocromo c (Eefting et al., 2004; Evora et al., 1996; Ferdinandy et al., 2007; Lisa et al., 2006; Moens et al., 2005; Robbins et al., 2005). (Figura 3)

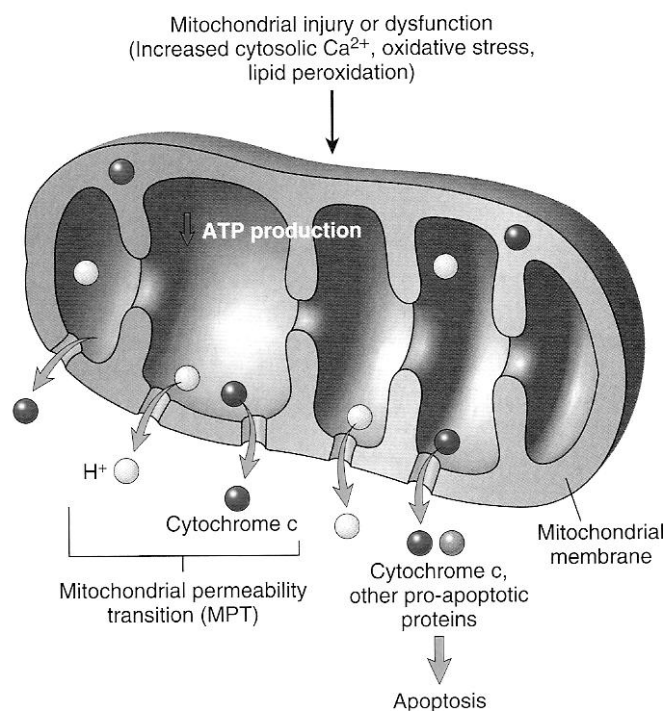


Figura 3: Disfunção mitocondrial resultado de um evento de isquemia-reperfusão.

ATP - adenosina trifosfato.

(Figura de Robbins et al., 2005)

2.1.3 Alteração da homeostase do cálcio

Como foi referido anteriormente, a homeostase do cálcio é alterada. Observa-se um aumento da sua concentração no citosol, graças à sua libertação da mitocôndria e do retículo endoplasmático, onde normalmente é armazenado, e também através do seu influxo através da membrana plasmática. O aumento deste elemento activa várias enzimas como ATPases, fosfolipases, proteases e endonucleases com efeitos celulares deletérios.

O aumento da concentração do cálcio também conduz a indução da permeabilidade mitocondrial, como referido na secção anterior. O decréscimo de oxigénio e o aumento do cálcio citosólico activam mecanismos que causam danos nas membranas citoplasmáticas, quer alterando a sua permeabilidade selectiva, quer interferindo directamente nos seus componentes, como os fosfolípidos e as proteínas do citosqueleto (Eefting et al., 2004; Evora et al., 1996; Ferdinandy et al., 2007; Lisa et al., 2006; Moens et al., 2005; Robbins et al., 2005). (Figura 4)

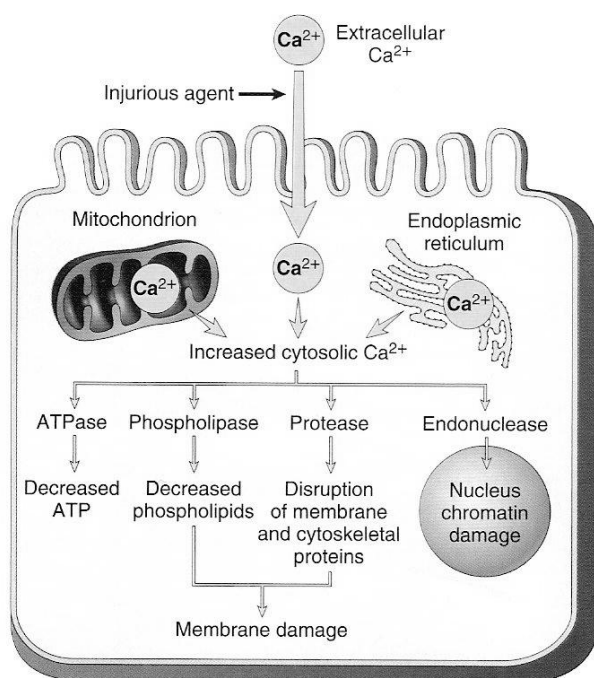


Figura 4: Conseqüências do aumento citosólico de cálcio durante um fenômeno de isquemia-reperfusão.

ATP - adenosina trifosfato.

(Figura de Robbins et al., 2005)

2.1.4 Aumento dos níveis de *stress* oxidativo

Com a repentina reoxigenação dos tecidos, a reactivação da cadeia transportadora de electrões da mitocôndria produz um aumento massivo de espécies reactivas de oxigénio que, juntamente com a formação de espécies reactivas de nitrogénio, acarreta um grande aumento do *stress* oxidativo para as células. Numa situação normal, mecanismos antioxidantes específicos evitam a acumulação destas espécies, prevenindo a ocorrência de danos por estas produzidos. Numa situação patológica, um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e a sua degradação pelos mecanismos antioxidantes, aumenta a concentração destas espécies capazes de causar danos ao nível dos lípidos, das proteínas e dos ácidos nucleicos. No coração, a excessiva produção de ROS/RNS (espécies reactivas de oxigénio/espécies reactivas de nitrogénio) durante a reperfusão,

combinada com o decréscimo da capacidade anti-oxidativa induzida pela isquemia-reperfusão, torna então o miocárdio bastante vulnerável (Eefting et al., 2004; Evora et al., 1996; Ferdinandy et al., 2007; Lisa et al., 2006; Moens et al., 2005; Robbins et al., 2005). (Figura 5)

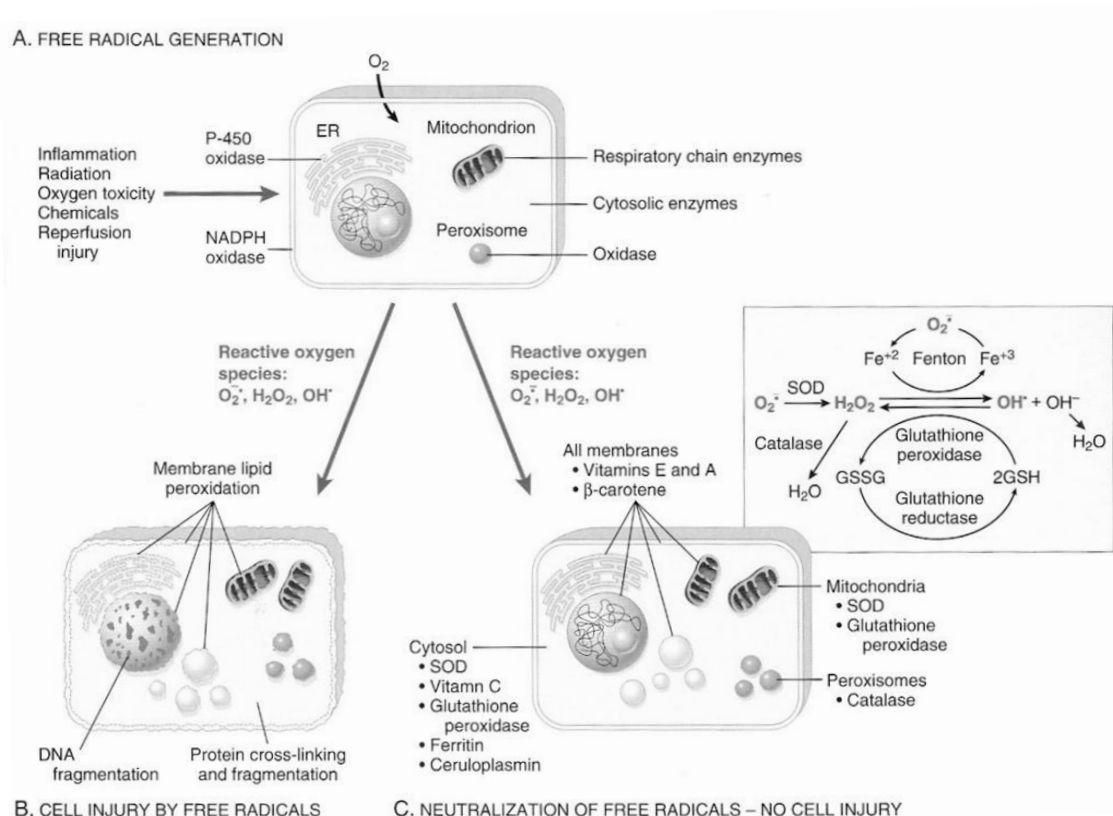


Figura 5: O papel das espécies reactivas de oxigénio nos danos por isquemia-reperfusão.

DNA - ácido desoxirribonucleico; ER - retículo endoplasmático; SOD - superóxido dismutase; GSH/GSSG - glutatona reduzida/oxidada; NADPH - dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato reduzido.

(Figura de Robbins et al., 2005)

2.1.5 Resposta inflamatória

Imediatamente a seguir ao início da reperfusão, ocorre também a activação e a infiltração de neutrófilos no tecido danificado levando ao aumento da produção de radicais livres, proteases e mediadores pró-inflamatórios. Ocorre a produção de citocinas e o aumento da expressão de moléculas de adesão por parte das células parenquimatosas e endoteliais hipóxicas resultando num aumento da inflamação, que também se encontra associado ao fenómeno de isquemia-reperfusão (Eefting et al., 2004; Evora et al., 1996; Ferdinandy et al., 2007; He et al., 2007; Lisa et al., 2006; Moens et al., 2005; Robbins et al., 2005).

2.1.6 Disfunção endotelial vascular

Muito se tem estudado acerca dos mecanismos que causam danos nas células cardíacas, os cardiomiócitos, pois é fácil estabelecer uma relação directa com a função contráctil. Mas, nos últimos anos, o endotélio coronariano tem merecido a atenção de muitos investigadores. O endotélio vascular parece ser o tecido mais vulnerável à reperfusão; há disfunção destas células, que ocorre antes das células do músculo liso dos vasos e, no caso do coração, antes das alterações funcionais dos próprios cardiomiócitos (McAfee et al., 1990; Moens et al., 2005). A doença isquémica cardíaca contribui então para as alterações da própria função vascular ao induzir a perda da homeostase de múltiplos tipos de células (células endoteliais, células do músculo liso, células da matriz da camada íntima arterial e plaquetas) (Mark et al, 2003).

Com a isquemia-reperfusão, a actividade da sintetase do óxido nítrico (NOS) está diminuída, decrescendo assim a formação de óxido nítrico (NO) e comprometendo o relaxamento vascular dependente do endotélio, o que, juntamente com o desenvolvimento de processos inflamatórios, como aumento da migração de leucócitos

e neutrófilos que levam à expressão de citocinas, proteases, de moléculas de adesão e formação de espécies reactivas de oxigénio, levam ao surgimento da disfunção endotelial vascular. (Evora et al. 1996; Moens et al. 2005; Schulz et al. 2004).

A disfunção endotelial vascular está presente na diabetes *mellitus* previamente à ocorrência de fenómenos isquémicos, sendo a própria disfunção um grande factor de risco para o desenvolvimento de tais fenómenos (Cersosimo et al., 2006; Hadi et al., 2007).

3. A diabetes tipo 2

Fruto dos maus hábitos alimentares e do crescente estilo de vida sedentário, a diabetes tipo 2 encontra-se cada vez mais presente na nossa sociedade. Segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF) a incidência mundial de diabetes nas idades compreendidas entre 20 e 79 anos aumentará 70% nos próximos 20 anos; de 194 milhões em 2003 para 333 milhões de doentes em 2025 (International Diabetes Federation, 2005).

Esta doença metabólica é caracterizada por hiperglicemia que traduz insulino-resistência nos tecidos periféricos e alterações da célula β pancreática. Numa fase inicial da doença, as células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas aumentam a secreção basal e pós-prandial de insulina, aumentando a sua concentração em circulação - hiperinsulinemia- de forma a contrariar o efeito da insulino-resistência. A insulina liga-se aos seus receptores, nos tecidos insulino-dependentes, induzindo a exposição de mais transportadores de glicose nas membranas plasmáticas, permitindo a entrada da glicose

para a célula. O problema surge, posteriormente, quando à insulino-resistência se associam alterações das células β , que se tornam incapazes de reagir apropriadamente à insulino-resistência, de que resulta hiperglicemia.

No fígado, a insulina regula a expressão e actividade de enzimas envolvidas nos processos de glicólise e gliconeogénese. Numa situação pós-prandial normal, o aumento da produção de insulina promove a estimulação da glicólise e a inibição da gliconeogénese. Na diabetes, a diminuição da produção de insulina, resultado da falência absoluta ou relativa das células β pancreáticas, e a redução da acção da insulina no fígado, induzem o aumento da produção hepática de glicose, através do aumento da actividade da gliconeogénese, agravando assim o estado de hiperglicemia. A potenciação da hiperglicemia resulta ainda da acção, no fígado, do aumento da secreção de glucagina pelas células α pancreáticas, que se traduz no aumento da taxa de gliconeogénese e glicogenólise (American Diabetes Association).

Desta forma, a elevada concentração de glicose surge, então, como a principal desencadeadora das complicações crónicas desta doença, graças à sua toxicidade mediada pela activação de quatro vias patológicas fundamentais - via do poli-ol, via dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), via da proteína cinase C e via da hexosamina - (Figura 6) que, no seu conjunto, resultam num aumento de *stress* oxidativo com consequentes danos celulares (Browlee, 2005; Kaneto et al., 2005).

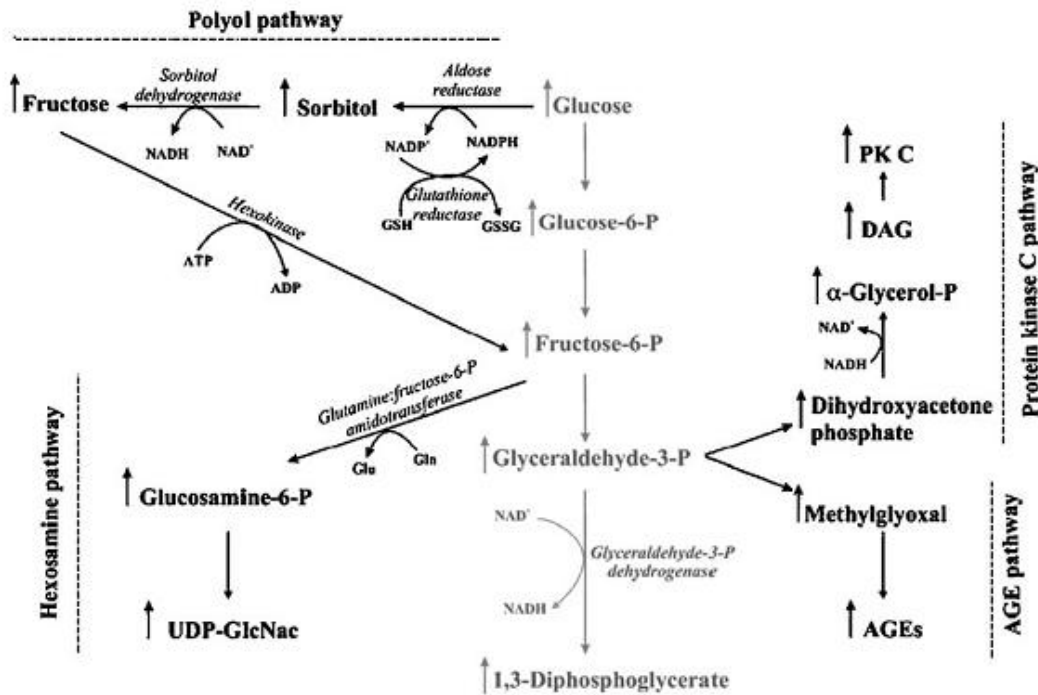


Figura 6: Mecanismos de toxicidade da hiperglicemia.

O aumento da glicose, bem como de produtos derivados do seu metabolismo, vão ativar quatro vias patológicas (via do polioliol, via dos produtos finais de glicação avançada, via da proteína cinase C e via da hexosamina) que, conjuntamente, levam ao aumento do *stress* oxidativo celular.

ADP - adenosina difosfato; AGEs - produtos finais de glicação avançada; ATP - adenosina trifosfato; DAG - diacilglicerol; NAD⁺/NADH - dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado/reduzido; NADP⁺/NADPH - dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato oxidado/reduzido; PKC - proteína cinase C UDP-GlcNac - Uridina difosfato-N-acetilglicosamina.

(Figura de Rolo et al. 200x)

Como resultado da sobre-ativação destas vias, surge o desenvolvimento da disfunção vascular, que já provou ser um gatilho para a ocorrência de fenômenos isquêmicos nesta doença (Wellen et al., 2005; Cersosimo et al., 2006).

A glicação de proteínas e lípidos, a deposição lipídica, bem como o *stress* oxidativo a que as paredes dos vasos estão sujeitas na diabetes, despoletam processos inflamatórios,

que, conjuntamente com a diminuição de factores vasodilatadores (óxido nítrico, por exemplo) e o aumento dos vasoconstritores (angiotensina II, por exemplo), permitem o desenvolvimento da disfunção endotelial vascular, acarretando consigo as várias complicações associadas à doença (Cersosimo et al., 2006; Hadi et al., 2007).

Subsequentemente, a ocorrência de doenças microvasculares como a neuropatia, a nefropatia e a retinopatia, e a de doenças macrovasculares como a doença venosa periférica, a cerebrovascular e a das coronárias, está muito aumentada na diabetes *mellitus*.

Vários estudos já foram realizados no nosso laboratório com a estirpe em estudo (GK), que demonstraram a presença destas patologias, resultado de uma bem documentada disfunção endotelial (Sena et al. 2007 e 2009).

4. A Diabetes tipo 2 *versus* isquemia cardíaca

Como referido anteriormente, o desenvolvimento e o estabelecimento da diabetes tipo 2 surge braços dados com o desenvolvimento de problemas cardiovasculares que, num pior prognóstico, podem causar a morte (Arshag et al., 2003).

Hoje em dia, é de conhecimento geral que a incidência de acidentes isquémicos cardíacos é mais elevada nos indivíduos diabéticos, bem como a sua reincidência. Encontra-se documentado que dois terços dos pacientes que sofreram enfarte do miocárdio tinham diabetes ou intolerância à glicose (Smith, 2007). O processo de recuperação é também mais moroso e difícil. É de notar que a taxa de mortalidade por acidentes cardíacos em adultos diabéticos é 2 a 4 vezes maior que em indivíduos normais, sendo o enfarte do miocárdio a principal causa de morte da população

diabética; 75% dos pacientes com diabetes tipo 2 morrem de enfarte do miocárdio (Mark et al., 2003). Atendendo a esta realidade, urge perceber e tentar travar estes eventos associados à doença que tanto contribuem para a taxa de mortalidade e morbidade nesta doença.

5. O coração diabético

Como mostram as estatísticas, o coração é um órgão muito afectado na síndrome diabética. A vasta rede coronária, sujeita a processos ateroscleróticos, a chamada doença das artérias coronárias, pode levar à ocorrência de fenómenos isquémicos (Figura 7) que, por sua vez, podem induzir o surgimento de cardiomiopatias, enfarte do miocárdio e falência cardíaca, causando a morte. (Ferdinandy et al., 2007; Moens et al., 2005).

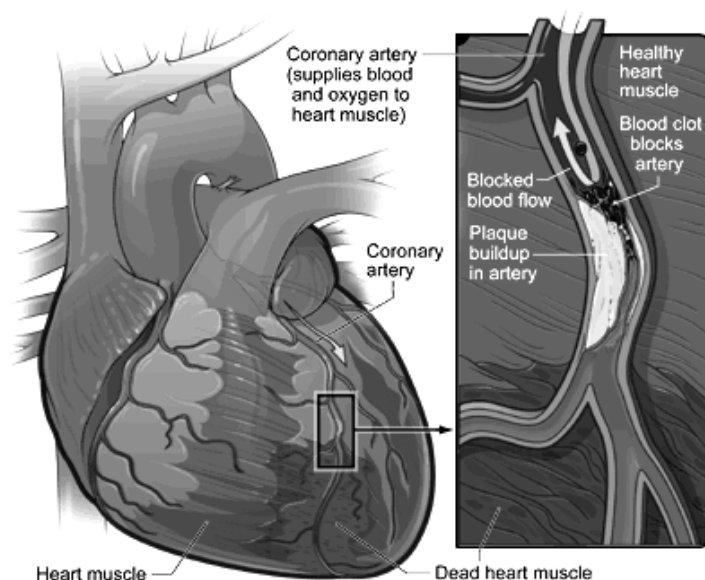


Figura 7: Representação esquemática da obstrução do fluxo sanguíneo nos vasos do coração, por formação de uma placa aterosclerótica. (Figura de Healthwise.org).

Constatando a maior prevalência de acidentes isquémicos no coração diabético, bem como a inadequada resposta a tais acidentes por parte deste, muito se tem estudado para perceber o porquê desta realidade.

A hiperglicemia e a hipoxia mostram então ter um papel fisiopatológico importante no estabelecimento das complicações da diabetes e na deficiente resposta a baixas concentrações de oxigénio por parte dos tecidos.

Com o ambiente hiperglicémico privilegia-se a formação de AGEs (Figura 6), através de reacções não enzimáticas entre açúcares e grupos reactivos de proteínas e lípidos (Goldin et al. 2006). Os AGEs estão então implicados nas complicações vasculares formando agregados e diminuindo a elasticidade arterial, verificando-se também que, através da sua ligação aos seus receptores RAGE, com a consequente activação de várias cascatas de sinalização que levam ao aumento do stress oxidativo e inflamação celulares (Goldin et al. 2006), agravam esta patologia. A activação destes receptores, também aumentados na diabetes (Hudson et al., 2004), influencia os danos por isquemia/reperfusão, bem como disfunção cardíaca. (Bucciarelli, 2008). Neste estudo, Bucciarelli conseguiu concluir que o bloqueio destes receptores permite diminuir os danos por isquemia-reperfusão.

Todas as alterações da homeostase normal, principalmente com activação exagerada das vias patológicas acima referidas, levam à desregulação do normal funcionamento celular e à ocorrência de processos como a disfunção endotelial, a dislipidemia, e o consequente aumento da insulino-resistência. Este quadro diabético afecta os vários órgãos, e, explica a inabilidade de resposta por parte destes pacientes no surgimento de complicações como a isquemia cardíaca.

No que respeita a estudos feitos no coração de ratos Goto-Kakizak, El-Omar (2004) demonstrou a existência de disfunção cardíaca nestes ratos, numa situação de hipoxia.

Igualmente em hipoxia, estudos preliminares no nosso laboratório, demonstraram também a incapacidade de resposta das mitocôndrias cardíacas dos ratos GK (dados não publicados).

6. A angiogénese na resposta a um fenómeno isquémico

Como descrito anteriormente, um evento hipóxico acarreta muitas complicações para os tecidos afectados e, embora a reintrodução de oxigénio agrave ou induza novos danos, a sua chegada às células afectadas é crucial para a sobrevivência do tecido em causa.

Sabe-se que a angiogénese é fundamental para este processo. A formação de novos vasos traduz-se na chegada de oxigénio e nutrientes a locais onde tal não acontecia ou deixou de acontecer após a agressão isquémica.

A reintrodução de oxigénio pode ser conseguida pela desobstrução do(s) vaso(s) afectado(s) ou pela formação de novos vasos - angiogénese.

A proliferação de células endoteliais após hipoxia é regulada primariamente pelo factor-1 induzido por hipoxia (HIF-1). Este factor de transcrição é uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , sendo a subunidade β constitutivamente expressa na célula, enquanto a subunidade α é regulada pela concentração celular de oxigénio. O Hif-1 α acumula-se instantaneamente durante um período hipóxico e degrada-se rapidamente com a reoxigenação. Desta forma, numa situação de normoxia, ocorre a hidroxilação de dois resíduos de prolina (Pro402 e Pro564 na proteína humana) do terminal carboxílico, que medeia a interacção com a proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (VHL) que é uma componente da

proteína ubiquitina E3. Após esta ubiquitinação, o HIF-1 α é degradado no proteossoma; ocorre, simultaneamente, a hidroxilação de um resíduo de aspargina (Asn803) que impede a ligação do HIF-1 α com os coactivadores CBP e p300.

Em hipoxia, as hidroxilações atrás referidas não acontecem e, desta forma, não ocorre interacção com a VHL e, por outro lado, ocorre a interacção com os coactivadores CBP e p300, activando a transcrição de genes. Portanto, estas hidroxilações, dependentes de oxigénio, regulam a interacção proteína-proteína tal como acontece aquando das fosforilações ou outras modificações pós-translacionais.

O HIF-1 α activa a transcrição de mais de 70 genes que levam à transcrição de diversas proteínas envolvidas na proliferação e sobrevivência celulares, na angiogénese e no metabolismo glicolítico, que são exemplos de respostas sistémicas, tecidulares e intracelulares, respectivamente, de adaptação à hipoxia (Semenza, 2004; Pugh et al., 2003).

A diabetes está associada a uma angiogénese anormal. A sua desregulação é visível na retinopatia diabética, onde ocorre um aumento descontrolado da angiogénese e, por outro lado, o seu decréscimo é notório numa situação de isquemia do miocárdio (Larger et al., 2004). Esta discrepância de resposta à isquemia por parte dos doentes diabéticos é apelidada de “o paradoxo da diabetes” (Duh et al., 1999).

Mais uma vez a hiperglicemia parece ser a resposta para a desregulação da angiogénese na diabetes (Larger et al., 2004). Neste estudo, Larger concluiu que a angiogénese sofreu um decréscimo através da indução de apoptose e decréscimo da proliferação das células endoteliais. Outros estudos mostram ainda que a hiperglicemia destabiliza o HIF-1 α , mesmo em condições de hipoxia, podendo ser este o principal mecanismo explicativo da agravada resposta à hipoxia na diabetes (Catrina et al., 2004).

Vários estudos demonstram o importante papel deste factor de transcrição numa situação de isquemia-reperfusão. Um estudo de Kido (2005), bem como um estudo de Ning (2007) permitem afirmar que a sobre-expressão de HIF-1 α permite reduzir a extensão do enfarte, bem como atenuar a progressão da disfunção cardíaca.

7. O Metilglioxal

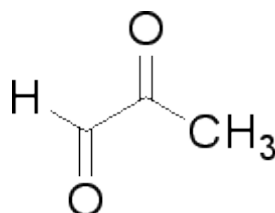


Figura 8: Representação química do metilglioxal.

O metilglioxal (Figura 8), denominado 2-oxopropamal pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), é um α -oxoaldeído endógeno altamente reactivo, formado principalmente a partir de trioses fosfato intermediárias da glicólise e, embora em menor quantidade, também é produzido a partir de amino-ácidos e da acetona (Kalapos et al. 2008; Phillips, et al. 1993). Exogenamente, podemos encontrar este composto em vários alimentos, principalmente produtos animais, e bebidas (Hsuuw et al. 2005), de que é exemplo o café, amplamente consumido em quase todo o mundo (Kasai et al. 1982). A presença deste tipo de compostos nos alimentos está também muito associada à sua forma de confecção, sendo privilegiadamente encontrados em frituras, gizados, grelhados, ou seja, confecções com pouca água e a elevadas temperaturas (Goldin et al. 2006).

Este composto é capaz de causar danos que podem conduzir à apoptose das células, através da sua interacção com os diversos constituintes celulares, conferindo-lhe um carácter citotóxico (Hsuuw et al. 2005; Kalapos et al. 2008; Kang et al. 1996; Riboulet-Chavey et al. 2006). (Figura 9)

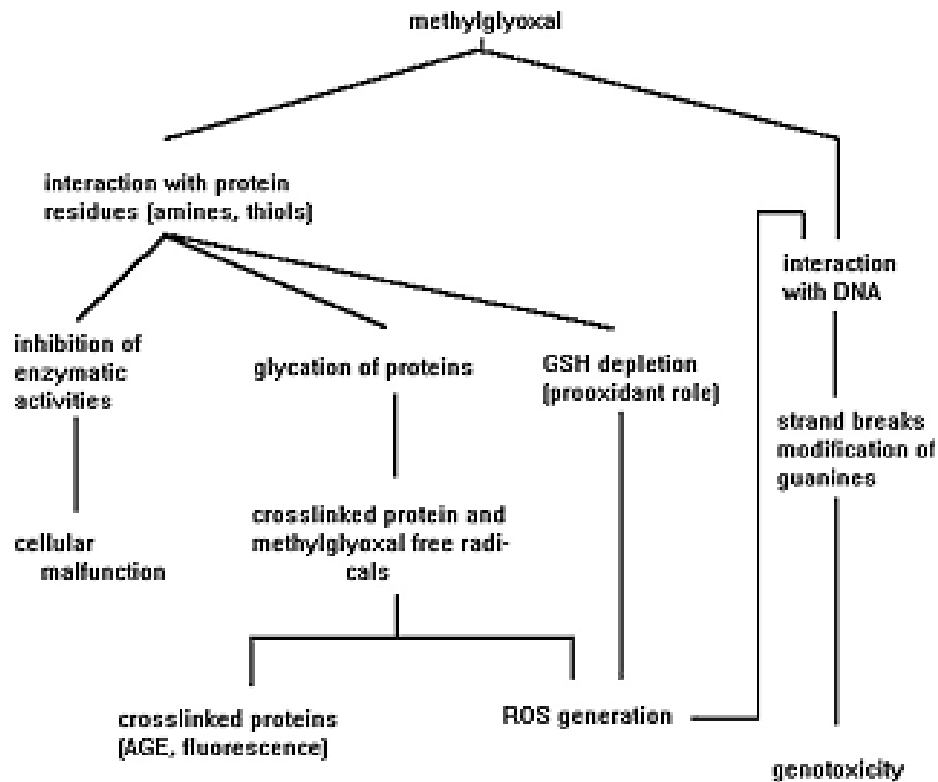


Figura 9: Vias de toxicidade do metilglioxal.

A toxicidade do metilglioxal resulta da sua interacção com vários componentes celulares, traduzindo-se num aumento de AGEs e ROS, e também na genotoxicidade.

AGE - produto final de glicação avançada; DNA - ácido desoxirribonucleico; GSH - glutationa reduzida; ROS - espécies reactivas de oxigénio.

(Imagem de Kalapos, 2008)

Em condições fisiológicas, a inativação e destoxificação deste composto tóxico é catalisada pelas enzimas do sistema da glioxalase (glioxalase I e glioxalase II). A glioxalase I converte o metilglioxal a S-D-lactoilglutathione que é convertido, pela glioxalase II a D-lactato. A glioxalase I utiliza como co-factor a glutathione reduzida, sendo a glutathione redutase a enzima limitante deste sistema (Kalapos et al. 2008; Riboulet-Chavey et al. 2006; Thornalley 2003; Xu et al. 2006).

Alterações na concentração do metilglioxal mostraram estar implicadas em patologias como o cancro, a malária, a falência renal e as doenças vasculares associadas à diabetes (Agalou et al. 2003; Beisswenger et al. 2003; Iozef et al. 2003; Riboulet-Chavey et al. 2006; Thornalley 2003).

7.1 O metilglioxal na diabetes

Na diabetes, o aumento da concentração de glicose e a deficiência dos sistemas destoxicantes celulares, traduz-se num aumento de metilglioxal, que se acumula no sangue e nos tecidos 3 a 6 vezes mais que nos indivíduos normais (Berlanga et al. 2005; Hsuuw et al. 2005). A deficiência notada na eliminação de compostos carbonilo tóxicos na diabetes, prende-se principalmente com o facto da enzima limitante do sistema das glioxalases, a glutathione redutase, ser destabilizada, ocorrendo diminuição da formação de glutathione reduzida (GSH). A destabilização da GSH também pode ser conseguida, inclusivamente, pela própria interacção com o metilglioxal, que mostra ser capaz de a inibir (Kalapos et al. 2008).

O aumento da produção de metilglioxal está associado ao desenvolvimento das complicações vasculares diabéticas, tal como demonstrou Berlanga, num estudo de

2005, em que concluiu que a administração de metilglioxal a animais normais induz alterações vasculares semelhantes às encontradas na diabetes.

Para além da interacção com diversos constituintes celulares com consequente formação de AGEs, aumento da produção de ROS e RNS, traduzindo-se em última instância na indução de apoptose, um estudo recente demonstrou que o metilglioxal tem um impacto negativo na sinalização da insulina, diminuindo a fosforilação do resíduo de tirosina do receptor IRS-1 (Riboulet-Chavey et al. 2006).

Estudos preliminares do nosso grupo de trabalho demonstram ainda outro efeito nefasto do metilglioxal, desta vez em condições de hipoxia (dados não publicados). Este composto parece destabilizar o HIF-1 α por um mecanismo diferente daquele que acontece numa situação de normoxia, comprometendo, desta forma, a resposta a um evento isquémico com prejuízo do tecido afectado.

Para além do aumento da concentração de metilglioxal na diabetes, a ocorrência de um acidente isquémico leva as células hipóxicas a acumular ainda mais este composto. Um estudo de Kumagai (2009) demonstrou que a hipoxia renal compromete a destoxificação de metilglioxal através da deterioração da actividade da glioxalase I, independente do seu co-factor GSH, demonstrando ainda que o aumento na expressão desta enzima é capaz de diminuir o dano por isquemia-reperfusão.

Todos estes estudos revelam o importante e complexo papel do metilglioxal na patologia da diabetes, nomeadamente na isquemia cardíaca, indiciando ser um valioso futuro alvo terapêutico.

8. Objectivos

Com o presente trabalho, propôs-se explicar o porquê da maior incidência de acidentes isquémicos cardíacos na população diabética, bem como a pior resposta, por parte desta população, a tais eventos.

Postula-se então que, uma exposição prolongada ao metilglioxal possa induzir, em sujeitos normais, alterações semelhantes às que ocorrem na diabetes, condicionando as complicações da doença. Acredita-se também que este composto possa estar na chave da inadequada resposta à hipoxia encontrada na diabetes.

Desta forma, foi realizado um estudo comparativo entre dois modelos animais, os ratos Wistar normais e os ratos Goto-Kakizaki diabéticos tipo 2 não obesos, sendo um grupo de animais normais submetido à administração de metilglioxal, perfazendo um total de três grupos experimentais (W, GK e WMG, respectivamente). Foram então determinados vários parâmetros sistémicos e cardíacos nos três grupos, recorrendo a diferentes técnicas laboratoriais, na tentativa de perceber o papel do metilglioxal no agravamento do quadro diabético, e particularmente na resposta cardíaca à isquemia-reperusão.

Percebendo o papel deste composto, poder-se-á conhecer e interferir numa das possíveis vias da toxicidade da glicose, pelo seu produto secundário, o metilglioxal.

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

Materiais

Todos os sais e solventes orgânicos utilizados possuem o mais alto grau de pureza analítica e foram adquiridos à Merck Darmstad - Alemanha, à Sigma-Aldrich - EUA, ou à Panreac Química SA - Espanha.

Os produtos e materiais específicos vão sendo descritos ao longo da metodologia.

Métodos

1. Animais

Neste trabalho foram estudados dois modelos animais: ratos normais Wistar (W) e ratos com diabetes tipo 2 espontânea não obesa, ratos Goto-Kakizaki (GK), obtidos de colónias locais (Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra).

Ambas as colónias foram mantidas sob temperatura e humidade controladas (22-24° C e 50-60%, respectivamente), ventilação adequada (12 renovações completas de ar por hora) e ciclos alternados (12 horas) de luz e obscuridade. Os animais tiveram livre acesso a ração (dieta standard laboratorial *AO4-Panlab*, Barcelona, Espanha) e a água, sendo esta, no grupo tratado, utilizada como veículo para a administração do produto estudado.

2. Tratamentos

Os ratos foram divididos em 3 grupos experimentais de 8 animais cada: 2 grupos de ratos W e 1 grupo de ratos GK com aproximadamente 2 meses de vida. O grupo controlo de ratos W não experimentou tratamento (W), tal como o grupo de ratos GK. O outro grupo de ratos W foi submetido à administração de metilglioxal (Sigma, EUA), durante 14 semanas (WMG). O metilglioxal foi colocado na água dos biberões, e a sua dose foi progressivamente aumentada até à concentração final de 75mg/Kg, a fim de ocorrer uma habituação, por parte dos animais, ao produto.

3. Peso corporal

O peso corporal (gramas) foi determinado no início e no final do tratamento e, nos ratos WMG, com o objectivo de determinar a dose de metilglioxal a administrar, ao longo dos 4 meses de tratamento.

4. Determinação da glicemia e da Hemoglobina-A_{1C}

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

Os níveis da hemoglobina- A_{1C} foram também determinados no sangue total da veia da cauda, usando um analisador automático (*DCA 2000 Analyser*, Bayer, Health Care Diagnostics Division).

5. Colheitas

5.1 Colheita de sangue

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

5.2 Colheita de urina

Os animais foram mantidos em caixas metabólicas, durante 24 horas, e as amostras de urina foram recolhidas, centrifugadas (10 minutos, 2000xg, 4 °C) e guardadas a -80 °C para posterior análise.

5.3 Colheita do coração

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

6. Sistema *Langendorff*

Foi utilizado o sistema de perfusão *Langendorff* (modelo UP-100, Hugo Sachs Elektronik/Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany - Figura 10), em que,



Figura 10: Sistema de perfusão *Langendorff*.

contrariamente ao normal fluxo cardíaco, se recorre à perfusão retrógrada do coração, via artéria aorta, que permite manter os corações próximos das condições fisiológicas e viáveis durante algumas horas. Assim, os corações foram perfundidos com um tampão de Krebs-Hanseleit com a seguinte composição: 118mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 4,7mM KCl, 1,2mM KH₂PO₄, 1,2mM MgSO₄, 10mM HEPES, 1,25mM CaCl₂ e 10mM

glicose (pH 7,4). Este tampão salino foi oxigenado e mantido à temperatura de 37 °C, circulando a uma pressão e fluxo de aproximadamente 80 mmHg e 20mL por minuto, respectivamente.

Os corações dos diferentes grupos experimentais foram divididos em: 1) subgrupo controlo (aproximadamente 180 minutos de perfusão), 2) subgrupo submetido a isquemia (20 minutos de perfusão + 35 minutos de isquemia com solução de perfusão sem glicose e oxigénio) e 3) subgrupo submetido a isquemia-reperfusão (aproximadamente 20 minutos de perfusão + 35 minutos de isquemia + 120 minutos de reperfusão).

Após as diferentes perfusões, uma parte do tecido cardíaco foi congelada em meio de congelação (*Shandon Cryomatrix*, Thermo Scientific, EUA) no crióstato/micrótomo (*Shandon*, Thermo Scientific, EUA), posteriormente seccionada em vários cortes, com uma espessura de cerca de 6µm, que foram guardados a -80 °C. O tecido cardíaco restante foi congelado de imediato em azoto líquido e guardado a -80 °C.

7. Técnicas de análise

7.1 *Western Blot*

A identificação e a quantificação das proteínas Caspase-3, Bcl-2, Akt e VEGF foram efectuadas utilizando a técnica de *Western Blot*. A β -actina serviu como controlo da quantidade de proteína das amostras. A quantificação das bandas foi calculada com o programa *ImageQuant*, Molecular Dynamics, EUA.

- Homogeneização do tecido cardíaco

Cerca de 100mg de tecido cardíaco foi homogeneizado (homogeneizador modelo AT M, FLAC Instruments, Itália; poter e pistão F03h03, Thomas Scientific) em 1mL de tampão de lise com a seguinte composição: 25mM Tris-HCl (pH 7,4/7,6); 150mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% Deoxicolato de sódio; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 20mM NaF; 2mM Na₃VO₄; 10mM β-glicerofosfato; 2,5mM Pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 20μl cocktail inibidor de proteases por 0,5g de tecido. Posteriormente, os homogeneizados foram sonicados e centrifugados duas vezes (20 minutos, 12000xg, 4°C), recolhendo-se, sucessivamente, o sobrenadante. Calculou-se a concentração de proteína no sobrenadante final pelo método do BCA (*BCA protein assay*, Pierce, USA) e este foi armazenado a -80 °C, em alíquotas com tampão *Sample* (Tabela I).

- Polimerização dos géis

Foram polimerizados no sistema de polimerização (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA), géis de 12% de acrilamida, com os tampões *Resolving* e *Stacking* (Tabela I).

- Preparação das amostras

As amostras com tampão *Sample* foram descongeladas e fervidas durante 2 minutos a fim de serem colocadas no gel. Os volumes colocados variaram consoante a proteína a detectar: 50μg para Caspase 3, Akt e VEGF e 80μg para Bcl-2.

- Corrida do gel

Os géis foram colocados no sistema de corrida (*Mini-PROTEAN 3 Cell*, Bio-Rad, EUA) com tampão *Running* (Tabela I) e procedeu-se à disposição do padrão (*Precision Plus Protein Standards, Dual Color*, Bio-Rad, EUA) e das amostras. A corrida efectuou-se a uma voltagem constante de 160v, durante aproximadamente 1 hora.

- Transferência

Depois de terminada a corrida, as proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de PVDF (*Polyvinylidene fluoride membrane*, Bio-Rad, EUA) previamente activadas. Este passo efectuou-se no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, EUA), a amperagem constante de aproximadamente 200mA, em tampão CAPS (Tabela I).

- Bloqueio

Terminada a transferência, as membranas foram imediatamente bloqueadas com solução de TBST-BSA 5% (Tabela I), à temperatura ambiente. Aproximadamente 2 horas depois, efectuaram-se as lavagens das membranas com solução de TBST (Tabela I).

- Incubação com anticorpos

As membranas foram deixadas a incubar, durante a noite, a 4°C e com agitação constante, com os anticorpos primários [*Rabbit polyclonal Caspase-3 antibody*, Cell Signaling, EUA; *Mouse monoclonal Bcl-2 (C-2) antibody*, Santa Cruz Biothecnology, EUA; *Rabbit polyclonal Akt antibody*, Cell Signaling, EUA; *Rabbit polyclonal Phospho-Akt (Ser 473) antibody*, Cell Signaling, EUA; *Rabbit polyclonal VEGF (Ab-4) antibody*, Calbiochem, EUA e *Mouse monoclonal anti-actin antibody*, Chemicon International Serologicals Company, EUA]. No dia seguinte, efectuaram-se as lavagens com TBST e incubaram-se as membranas com anticorpos secundários (*Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase linked goat antibody*, GE Healthcare, UK e *Anti-mouse IgG+IgM alkaline phosphatase linked goat antibody*, GE Healthcare, Reino Unido) com agitação constante e à temperatura ambiente, durante cerca de 2 horas. As membranas foram novamente lavadas com a solução de lavagem.

- Revelação

As membranas foram incubadas com o substrato enzimático (*Mouse ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, Reino Unido) durante aproximadamente 2 minutos e reveladas por leitor de fluorescência (*STORM 860*, Molecular Dynamics, 91295, GE Healthcare Life Science).

Tabela I - Soluções utilizadas em *Western Blot*

Tampão *Resolving*

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

Tampão *Stacking*

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

Tampão *Sample*

62,5mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% SDS 10%; 2,5mL glycerol; 0,2mL Bromefenol blue 0,5%; pH 6,8

Tampão *Running*

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

Tampão *CAPS*

50mM CAPS; 2% NaOH; pH 11; 10% Metanol

Tampão *TBS*

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

Tampão *TBST*

Solução de TBS + 1% Tween-20

7.2 Dot Blot

A quantificação das Proteínas carbonilo no tecido cardíaco foi determinada por *Dot Blot*.

- Homogeneização do tecido cardíaco

Cerca de 100mg de tecido cardíaco foi homogeneizado (homogeneizador modelo AT M, FLAC Instruments, Itália; poter e pistão F03h03, Thomas Scientific) em 1,5mL de tampão fosfato (0,1M $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$; 1M KH_2PO_4 ; 1mM EDTA, pH 6,7). Posteriormente, os homogeneizados foram sonicados e centrifugados (15minutos, 10000xg, 4°C), recolhendo-se o sobrenadante. Calculou-se a concentração de proteína no sobrenadante pelo método do BCA (*BCA protein assay*, Pierce, USA) e este foi armazenado em alíquotas a -80 °C.

- Preparação das amostras

A concentração das amostras foi ajustada, com o tampão de lise, de forma a ficarem com a concentração final de 2mg/mL. Seguidamente, as amostras foram derivatizadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, com igual volume de 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) a 10mM. A reacção foi parada com ácido tricloroacético (TCA) e as amostras sofreram uma centrifugação (5 minutos, 14000xg) da qual se descartou o sobrenadante. Os *pellets* foram lavados duas vezes com etilacetato e etanol na proporção de 1:1 a fim de remover todo o DNPH livre.

Antes de serem colocadas numa membrana de nitrocelulose (*Nitrocelulose membrane* Bio-Rad, EUA), as amostras foram diluídas em tampão *Sample*.

O bloqueio, a incubação com os anticorpos primário (*Rabbit polyclonal Anti-DNP antibody*, Sigma, EUA) e secundário (*Anti-rabbit IgG alkaline phosphatase linked goat*

antibody, GE Healthcare, UK), e a revelação realizaram-se da mesma forma que na técnica de *Western Blot*, descrita na secção anterior.

7.3 ELISA

Os níveis de albumina na urina foram determinados pela técnica de ELISA competitiva (Nephrot-Exocell Inc., EUA) e expressos em mg/24h. Para efectuar a leitura utilizou-se o leitor de microplacas e o software *Gen5 Software*, Biotek Instruments Inc, EUA.

7.4 Imunohistoquímica

A distribuição/quantificação das proteínas/complexos de proteínas AGEs, RAGEs VEGF, HIF-1 α , Bax e Bcl-2 foram analisadas por esta técnica.

- Fixação e permeabilização

Após secagem à temperatura ambiente, as crio-secções foram fixadas com acetona (-20°C), durante 10 minutos. De seguida foram re-hidratadas em tampão salino de fosfato (PBS). Seguiu-se a permeabilização dos cortes com PBS+0,25% Triton durante 30 minutos, a que se seguiram lavagens com PBS.

- Bloqueio

Para o bloqueio dos cortes, as lâminas foram dispostas num *tupperware* humidificado e cada corte foi bloqueado com 50 μ l de PBS+1% BSA+10% soro (da espécie onde foi feito o secundário), durante 30 minutos.

- Incubação com anticorpos

As crio-secções foram incubadas com os anticorpos primários [*Anti-AGE's monoclonal antibody*, *Trans Genic Inc.*, Japão; *Anti-RAGE rabbit polyclonal antibody*, *Abcam*,

Reino Unido; *Rabbit polyclonal VEGF (Ab-4) antibody*, Calbiochem, EUA; *Rabbit polyclonal HIF-1 alpha antibody*, Thermo Scientific, EUA; *Rabbit polyclonal Bax antibody*, Santa Cruz Biothecnology, EUA e *Mouse monoclonal Bcl-2 (C-2) antibody*, Santa Cruz Biothecnology, EUA] em PBS+1% BSA (50µl por crio-secção), durante a noite, a 4°C, no *tupperware* humidificado. No dia seguinte, após lavagens, seguiu-se a incubação com os anticorpos secundários (*Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG*, Invitrogen, EUA e *Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG*, Invitrogen, EUA) que foi feita em PBS+1%BSA (50µl por crio-secção), durante 1 hora, à temperatura ambiente e no escuro.

- Montagem

Terminada a incubação, repetiram-se as lavagens, colocou-se uma gota de meio de montagem (*DPX*, Panreac, Espanha) sobre cada lâmina e cobriram-se as crio-secções com lamelas, deixando secar no escuro. Por fim procedeu-se à análise dos cortes no microscópio de fluorescência (*Leica DMIRE2*, Leica Microsystems, Alemanha).

7.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os níveis de metilglioxal no plasma e no tecido cardíaco foram determinados por esta técnica.

- Homogeneização do tecido cardíaco

Foram seccionadas 100mg de tecido e homogeneizadas em 1,5 ml de meio de homogeneização (1M $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1M KH_2PO_4 , 1mM EDTA, pH=7,0). As amostras foram centrifugadas (15 minutos, 10000xg, 4°C) e foram recolhidos os sobrenadantes. Foi determinada a concentração de proteína (método do BCA) e as amostras foram guardadas a -80°C até serem testadas.

- Preparação das amostras

O plasma (50 µl) e os extractos do tecido homogeneizado (100µg de proteína) foram desnaturados com 0,2M ácido acético, numa proporção de 1:1 (v/v). Desta solução, 50µl foram utilizados para a derivatização, na presença de 200 µl de tampão potássio-fosfato (0,1M pH 7,0), 200µl de etanol e 50µl de agente derivatizante (20mM DDB - *biphenyl dimethyl dicarboxylate*).

- Corrida das amostras

As amostras (20µl) foram analisadas, utilizando 2 fases móveis com gradiente de concentração, durante 40 minutos. A fase móvel A era constituída por tampão potássio-fosfato (10mM, pH 3,0) e acetonitrilo numa proporção 90/10 (v/v), enquanto a fase móvel B era constituída por acetonitrilo e água numa proporção 70/30 (v/v).

8. Análise estatística

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

CAPÍTULO 3

Resultados

1. Caracterização Geral

1.1 Peso corporal

Os ratos W apresentaram um peso corporal significativamente superior ao dos ratos GK com a mesma idade, como havia sido demonstrado nesta estirpe (Seiça et al. 2004). Com a administração de metilglioxal nos ratos normais (WMG) o peso corporal diminuiu para valores próximos dos dos ratos GK (Tabela II).

Tabela II - Peso corporal

	W	GK	WMG
Peso (g)	400,1 ± 22,1	357,1 ± 7,5*	375,4 ± 4,8

O peso corporal dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) foi medido em jejum, aos 6 meses de vida.

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=8.

*p<0,05 em GK vs W (teste *t Student*).

1.2 Perfil glicêmico e HbA_{1c}

A glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose, bem como os níveis de hemoglobina glicosilada foram significativamente superiores nos ratos GK quando comparados com os ratos W. A administração de metilglioxal nos ratos normais não alterou os valores destes parâmetros. (Tabela III).

Tabela III - Glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose, e HbA_{1c}

	W	GK	WMG
Glicose jejum (mg/dL)	65,8 ± 1,5	99,1 ± 2,9***	69,0 ± 1,3###
Glicose 2h (mg/dL)	83,2 ± 3,2	303,4 ± 8,8***	89,2 ± 1,5###
HbA _{1c} (%)	3,5 ± 0,0	5,2 ± 0,2***	3,4 ± 0,0###

A glicemia, em jejum e 2 horas após administração de glicose, e a hemoglobina glicosilada dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W), foram medidas aos 6 meses de vida.

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=8.

*** p<0,001 em GK vs W; ### p<0,001 em WMG vs GK (teste *t Student*).

1.3 Perfil lipídico

Os níveis plasmáticos de ácidos gordos, bem como os níveis séricos de triglicerídeos e de colesterol total e HDL foram significativamente superiores no grupo GK quando comparados com os do grupo W. Apenas se verificaram alterações significativas com a administração de metilglioxal (grupo WMG) nos níveis de ácidos gordos livres no plasma, que aumentaram, e nos níveis de colesterol HDL, que diminuíram em relação aos respectivos controlos W (Tabela IV).

Tabela IV - Níveis de ácidos gordos, triglicerídeos e colesterol.

	W	GK	WMG
Ácidos gordos (mM)	0,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1***	0,8 ± 0,0* ##
Triglicerídeos (mg/dL)	102,6 ± 8,4	134,9 ± 9,7*	74,0 ± 4,2 [#]
Colesterol total (mg/dL)	70,0 ± 1,5	88,9 ± 1,9***	67,0 ± 3,2 ^{###}
Colesterol HDL (mg/dL)	43,3 ± 1,1	62,7 ± 1,3***	34,0 ± 0,6** ^{###}

Os níveis dos diferentes parâmetros lipídicos dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W), foram determinados aos 6 meses de vida.

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=8.

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 em GK e WMG vs W;

p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 em WMG vs GK (teste *t Student*).

1.4 Níveis de metilglioxal plasmático

Os níveis plasmáticos de metilglioxal foram significativamente superiores nos ratos GK e WMG quando comparados com os seus controlos W. É ainda de notar que nos ratos WMG, os níveis foram significativamente superiores aos níveis dos ratos GK (Figura 10).

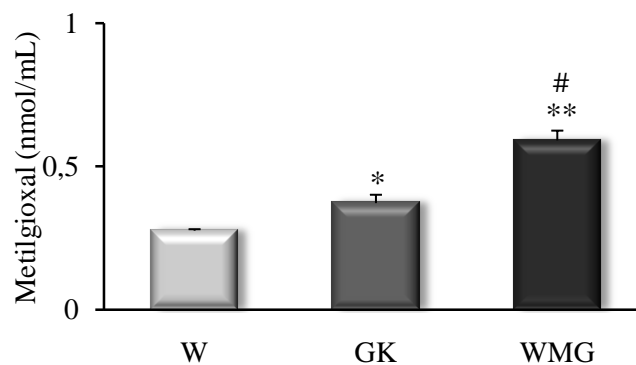


Figura 11: Níveis plasmáticos de metilglioxal.

Foram determinados, pela técnica de HPLC, os níveis de metilglioxal no plasma dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W), com 6 meses de idade, e os resultados apresentados em nmol/mL.

Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=8.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em GK e WMG vs W; # $p < 0,05$ em WMG vs GK (teste *t Student*).

1.5 Marcadores da função vascular

1.5.1 Índice aterogénico

O grupo GK apresentou um índice aterogénico significativamente inferior aos do grupo controlo W, como já havia sido demonstrado na estirpe em estudo (Sena et al., 2009). A administração de metilglioxal aos ratos normais (WMG) induziu um aumento significativo da probabilidade de desenvolver processos aterogénicos. (Figura 11A).

1.5.2 Albuminúria

A albuminúria foi significativamente superior nos ratos diabéticos quando comparada com os ratos W. A excreção urinária de albumina nos ratos WMG aumentou para valores não significativamente diferentes dos valores dos ratos W e GK (Figura 11B).

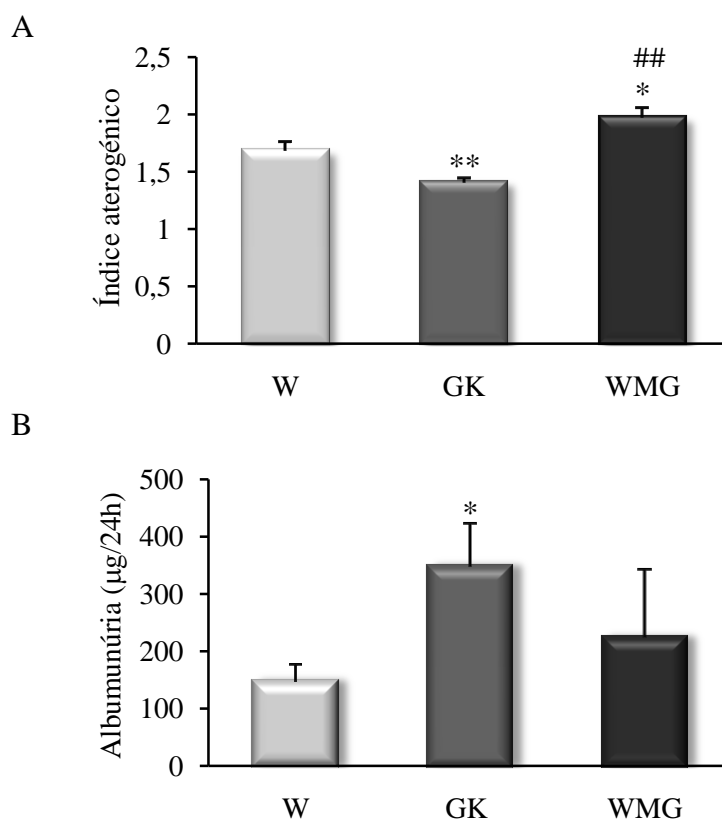


Figura 12: Índice aterogénico e albuminúria.

Foi determinado o índice aterogénico (A) dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem (W) metilglioxal, aos 6 meses de vida. Os níveis de albumina na urina (B) foram determinados por ELISA, nos mesmos animais e na mesma idade, e os seus valores apresentados em µg/24horas.

Os resultados são apresentados como média ± epm, n=8.

* p<0,05; ** p<0,01 em GK vs W; ### p<0,001 em WMG vs GK (teste *t Student*).

2. Avaliação do tecido cardíaco em condições basais

2.1 Níveis de metilglioxal

Os níveis de metilglioxal presentes no tecido cardíaco dos ratos GK foram significativamente superiores aos dos ratos W. A acumulação cardíaca de metilglioxal nos ratos WMG aumentou para valores não significativamente diferentes dos outros dois grupos (Figura 12).

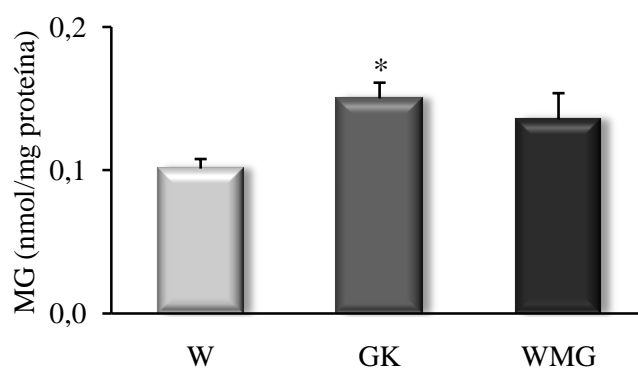


Figura 13: Níveis de metilglioxal no tecido cardíaco.

Foram determinados, pela técnica de HPLC, os níveis de metilglioxal acumulados no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de vida, e os seus valores apresentados em nmol/mg de proteína.

Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=8.

* $p < 0,0$ em GK vs W (teste *t Student*).

2.2 Níveis de Proteínas carbonilo

Os animais submetidos à administração de metilglioxal (grupo WMG) apresentaram um aumento significativo da carbonilação de proteínas quando comparados com os ratos controlo (grupo W). Nos ratos GK não foram observadas diferenças significativas mas apenas uma tendência para o aumento deste marcador de *stress* oxidativo proteico (Figura 13).

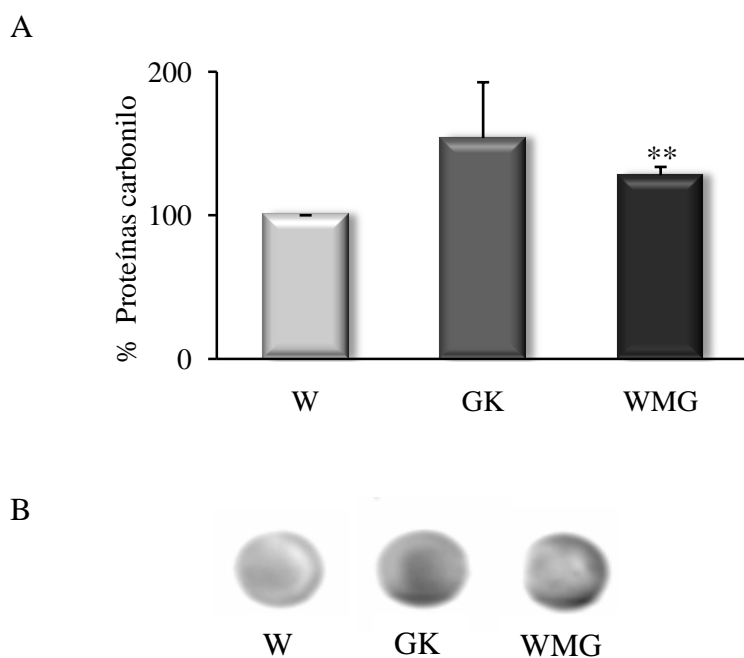


Figura 14: Proteínas carbonilo no tecido cardíaco.

A percentagem (%) de proteínas carbonilo presentes no tecido cardíaco nos ratos GK e nos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de vida, foi determinada por *dot blot*.

A - % relativa dos níveis de proteínas carbonilo em relação ao grupo W.

B - *Dot blot* representativo dos níveis de proteínas carbonilo nos três grupos.

Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=5.

** $p < 0,01$ em WMG vs W (teste *t Student*).

2.3 Níveis de AGEs e RAGEs

2.3.1 AGEs

Ao analisar a marcação dos cortes histológicos do coração, verificou-se que os ratos GK têm níveis superiores de produtos de glicação avançada (aumento de fluorescência), quando comparados com os ratos W. A administração de metilglioxal nos ratos normais (WMG) resultou num aumento de AGEs, assemelhando-se ao perfil observado nos ratos GK (Figura 14).

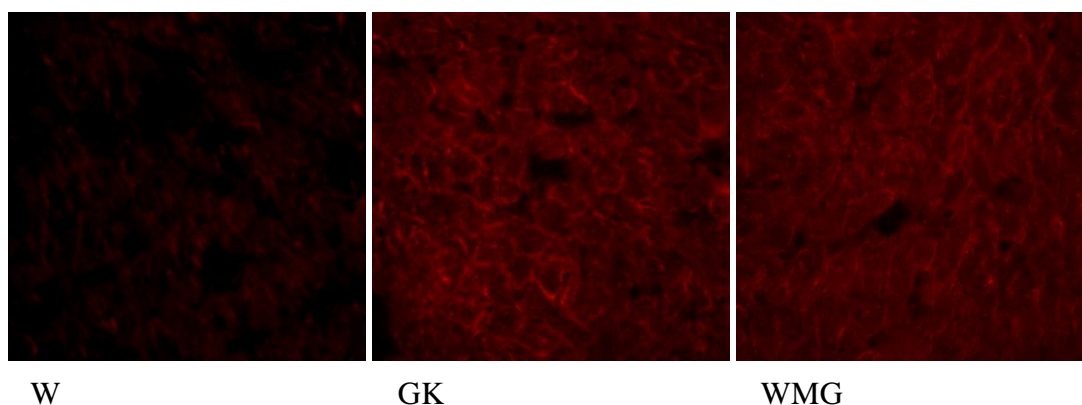


Figura 15: AGEs no tecido cardíaco.

Imagens representativas dos cortes histológicos cardíacos com marcação para AGEs.

Os níveis de AGEs presentes no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de idade, foram avaliados pela técnica de imuno-histoquímica, através da marcação com anticorpo específico para AGEs. (n=3, ampliação de 200x)

2.3.2 RAGEs

A marcação dos receptores de AGEs (RAGEs) no tecido cardíaco, mostrou ser mais pronunciada nos ratos GK quando comparada com os ratos W. A administração de metilglioxal aos ratos W resultou também num aumento desta marcação. (Figura 15)

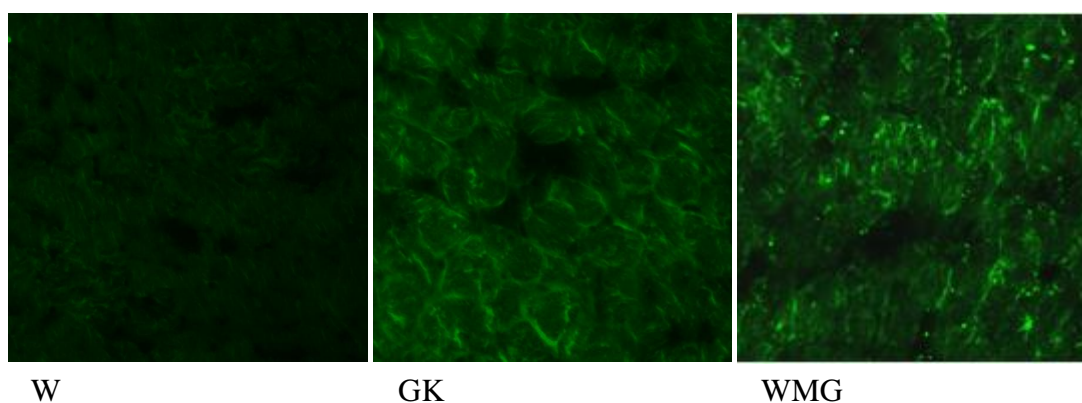


Figura 16: RAGEs no tecido cardíaco.

Imagens representativas dos cortes histológicos cardíacos com marcação para RAGEs.

Os níveis de RAGEs presentes no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de vida, foram avaliados pela técnica de imuno-histoquímica, através da marcação com anticorpo específico para RAGEs. (n=3, ampliação de 200x)

3. Caracterização da resposta cardíaca à isquemia

3.1 Níveis de HIF-1 alfa

As imagens apresentadas, resultados ainda preliminares, parecem mostrar a diminuição do HIF-1 alfa nos animais GK, quando comparados com os W. A direcção do corte no grupo WMG dificulta a abordagem, não sendo possível inferir da diminuição deste factor de transcrição (Figura 16).

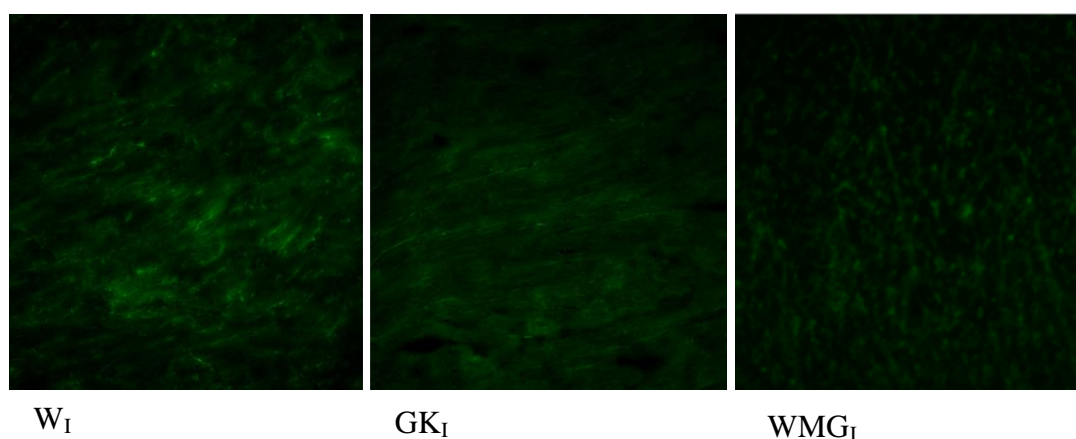


Figura 17: HIF-1 alfa no tecido cardíaco.

Imagens representativas dos cortes histológicos cardíacos com marcação para HIF-1 alfa.

Os níveis de HIF-1 alfa presentes no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilgloxal com 6 meses de idade, submetidos a isquemia (I), foram avaliados pela técnica de imuno-histoquímica, através da marcação com anticorpo específico para HIF-1 alfa. (n=2, ampliação de 200x)

3.2 Níveis de VEGF

Relativamente ao factor de crescimento endotelial vascular (VEGF), verificou-se não existirem diferenças significativas, quer entre os grupos, quer entre as três diferentes condições [controlo (C), isquemia (I) e isquemia/reperfusão (IR)] (Figura 17).

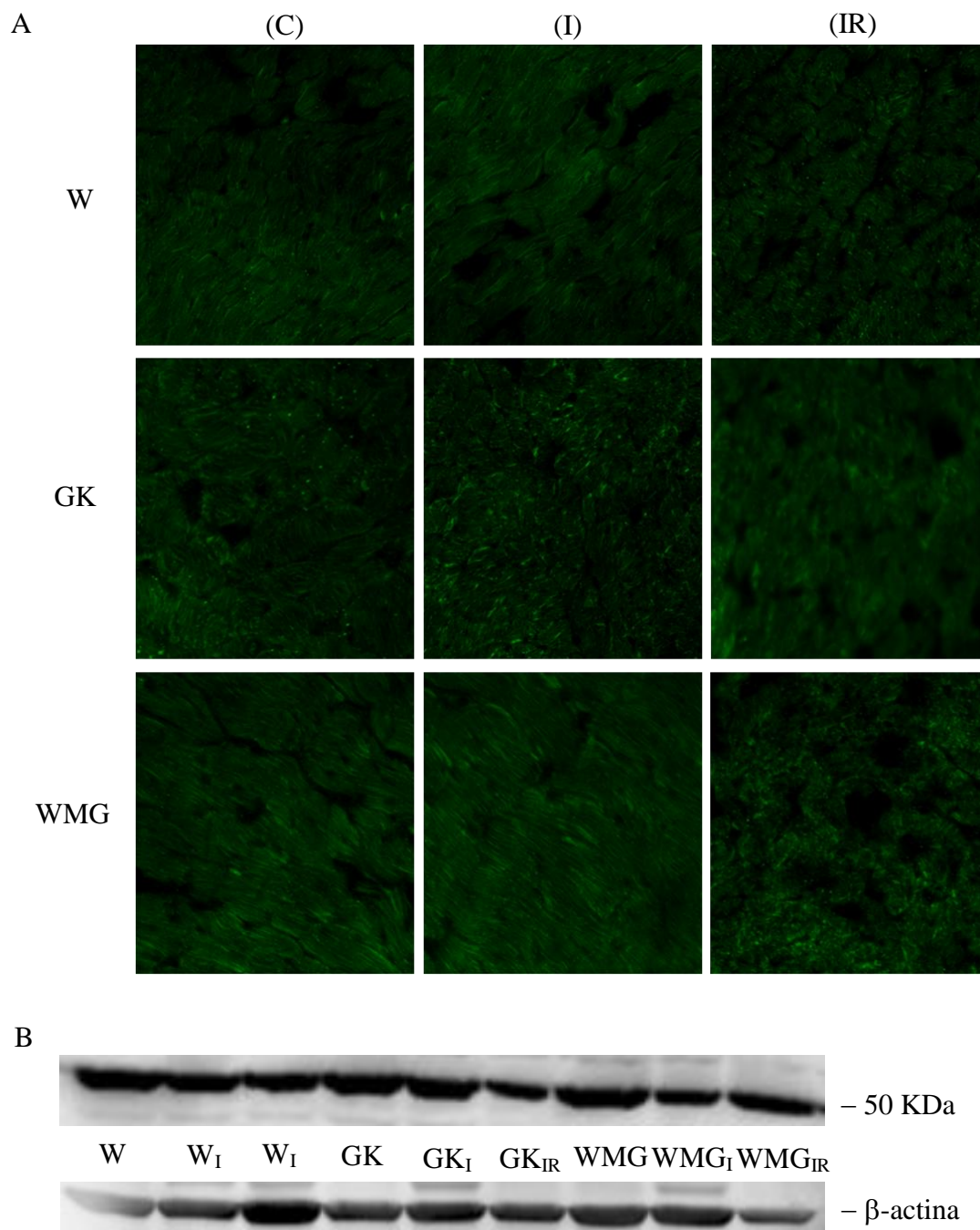


Figura 18: VEGF no tecido cardíaco.

Imagens representativas dos cortes histológicos cardíacos (A) dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de vida [controles (C), submetidos a isquemia (I) e submetidos a esquemia-reperfusão (IR)], marcados com anticorpo específico para VEGF por imuno-histoquímica (n=3, ampliação de 200x) e (B) membrana representativa com marcação específica para VEGF pela técnica de *western blot* (n=5).

3.3 Níveis de Akt total e fosforilada

3.3.1 Akt total

Relativamente aos três grupos na situação controlo, apenas foram encontradas diferenças significativas entre os ratos W e GK, tendo ocorrido uma diminuição da Akt nos ratos diabéticos. Verificou-se que a situação de isquemia induziu apenas um decréscimo significativo no sub-grupo W_{IR} , quando comparado com o respectivo controlo (Figura 18).

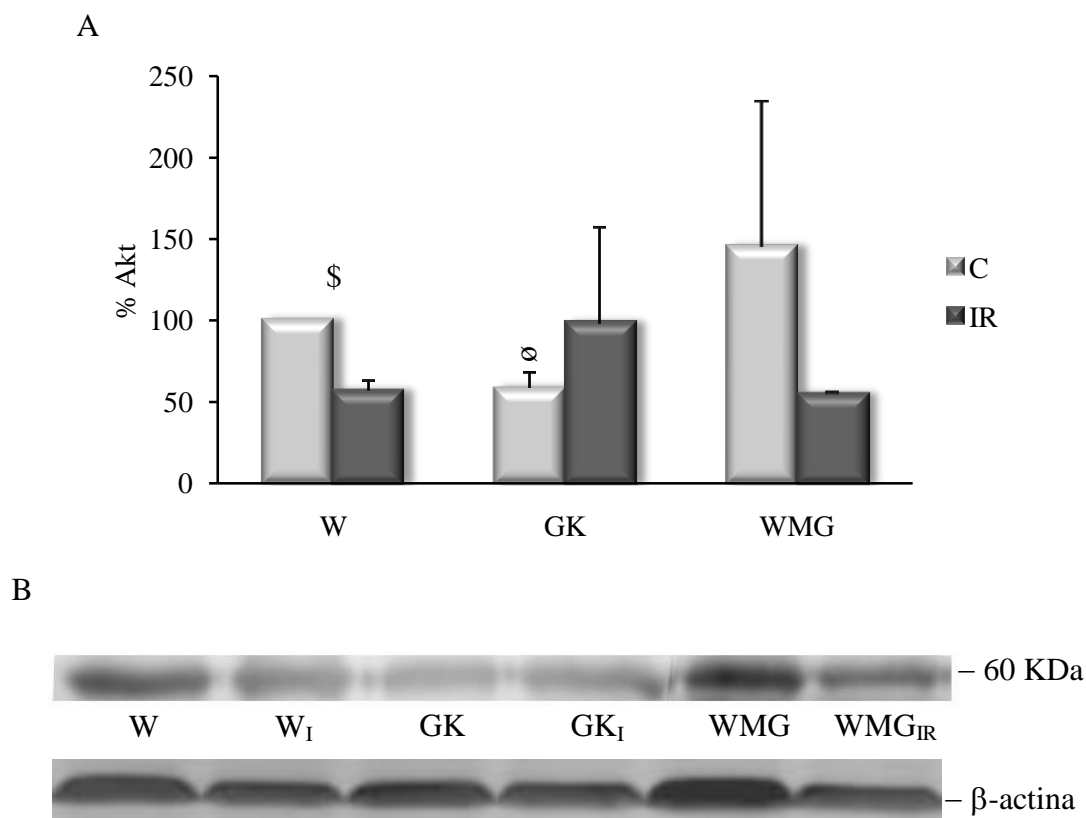


Figura 19: Akt no tecido cardíaco.

A percentagem (%) de Akt no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de idade [controlos (C) e submetidos a isquemia-reperfusão (IR)], foi determinada por *western blot*, com marcação específica para esta proteína.

A - % relativa dos níveis Akt em relação ao grupo W.

B - Membrana representativa dos níveis de Akt presente nos três grupos.

Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=5.

∞ $p < 0,05$ em GK_C vs W_C ; \$ $p < 0,05$ em W_{IR} vs W_C (teste *t Student*).

3.3.2 Akt fosforilada

Na situação controlo, verificou-se existir uma diminuição significativa da proteína fosforilada nos ratos GK, em relação aos ratos W, diminuição igualmente observada nos ratos WMG. Na situação pós reperfusão, observou-se uma diminuição significativa da proteína fosforilada nos ratos WMG, quando comparados com os ratos W. Verificou-se também que a isquemia-reperfusão induziu diminuições significativas quer nos ratos W_{IR}, quer nos ratos WMG_{IR}, quando comparados com os seus respectivos controlos (Figura 19).

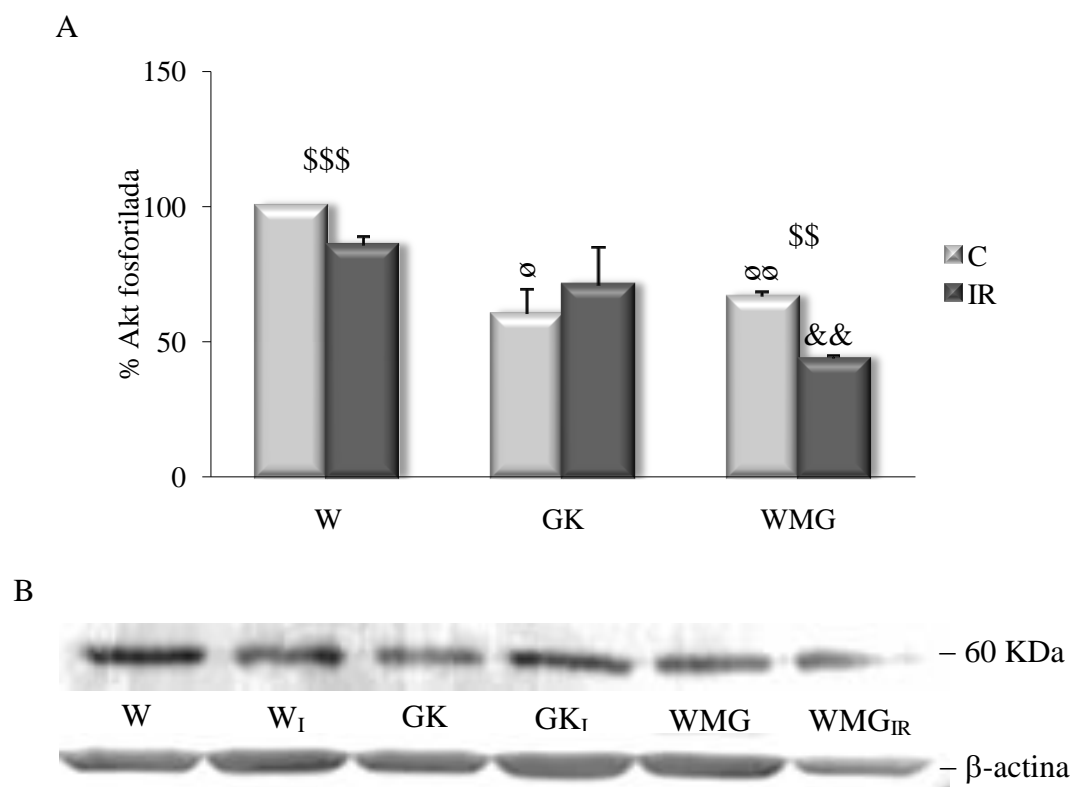


Figura 20: Akt fosforilada no tecido cardíaco.

Foi quantificada a percentagem (%) de Akt fosforilada no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de vida [controlos (C) e submetidos a isquemia-reperfusão (IR)] por *western blot*, com marcação específica para esta proteína.

A - % relativa dos níveis Akt fosforilada em relação ao grupo W.

B - Membrana representativa dos níveis de Akt fosforilada nos diferentes grupos.

Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=5.

\circ p<0,05; $\circ\circ$ p<0,01 em GK_C e WMG_C vs W_C; $\&\&\&$ p<0,001 em WMG_{IR} vs W_{IR}; $\&\&$ p<0,01; $\&\&\&$ p<0,001 em W_{IR} vs W_C e WMG_{IR} vs WMG_C (teste *t Student*).

3.4 Apoptose

3.4.1 Bax

Analisando os cortes histológicos cardíacos, verificou-se que esta proteína pró-apoptótica se encontra aumentada nos ratos W_I e GK_I , quando comparados com os seus controlos W_C e GK_C , respectivamente. Quanto ao grupo submetido à administração de metilglioxal (WMG), verificou-se que, logo na situação controlo, a Bax é bastante expressa, em relação aos outros dois grupos, não se observando diferenças relevantes após o período de isquemia (Figura 20).

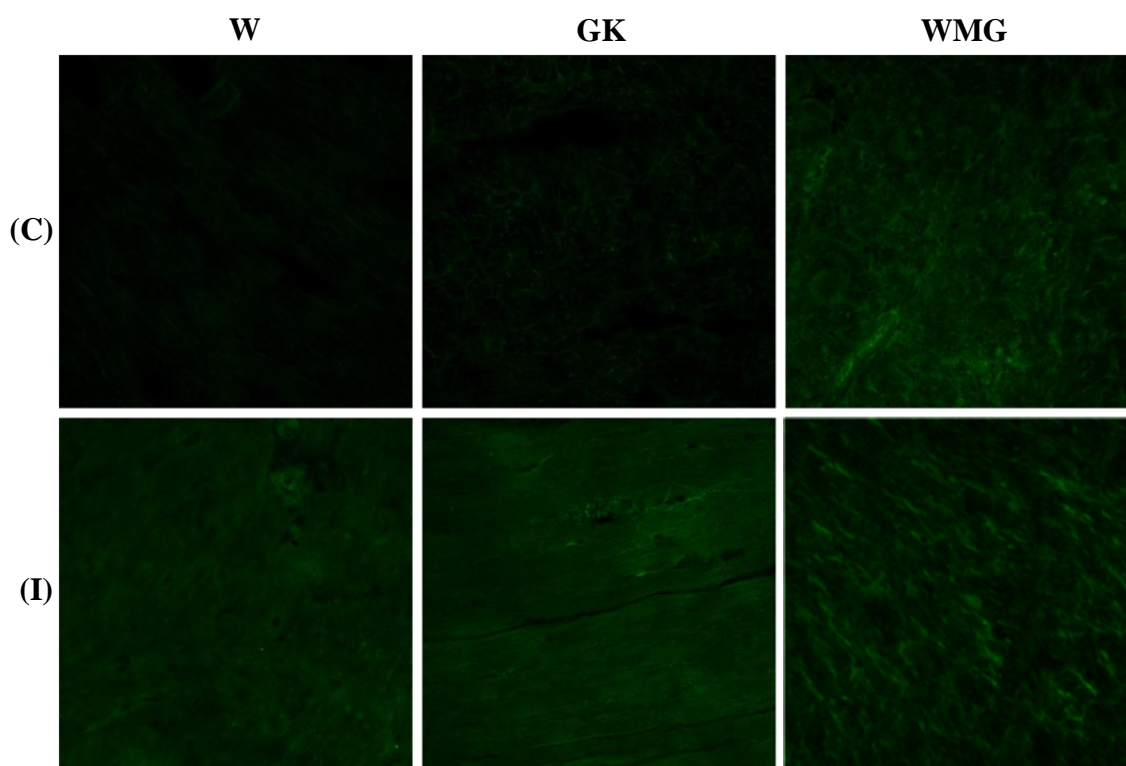


Figura 21: Bax no tecido cardíaco.

Imagens representativas dos cortes histológicos com marcação para Bax. Os níveis de Bax presentes no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de idade [controlo (C) e submetidos a isquemia (I)], foram avaliados pela técnica de imuno-histoquímica, através da marcação com anticorpo específico para esta proteína pró-apoptótica. (n=3, ampliação de 200x)

3.4.2 Bcl-2

Relativamente à Bcl-2, as marcações mostraram não existir diferenças entre os três grupos na situação controlo. É de realçar um aumento da expressão desta proteína anti-apoptótica na situação de isquemia, observada apenas nos grupos W e GK (Figura 21).

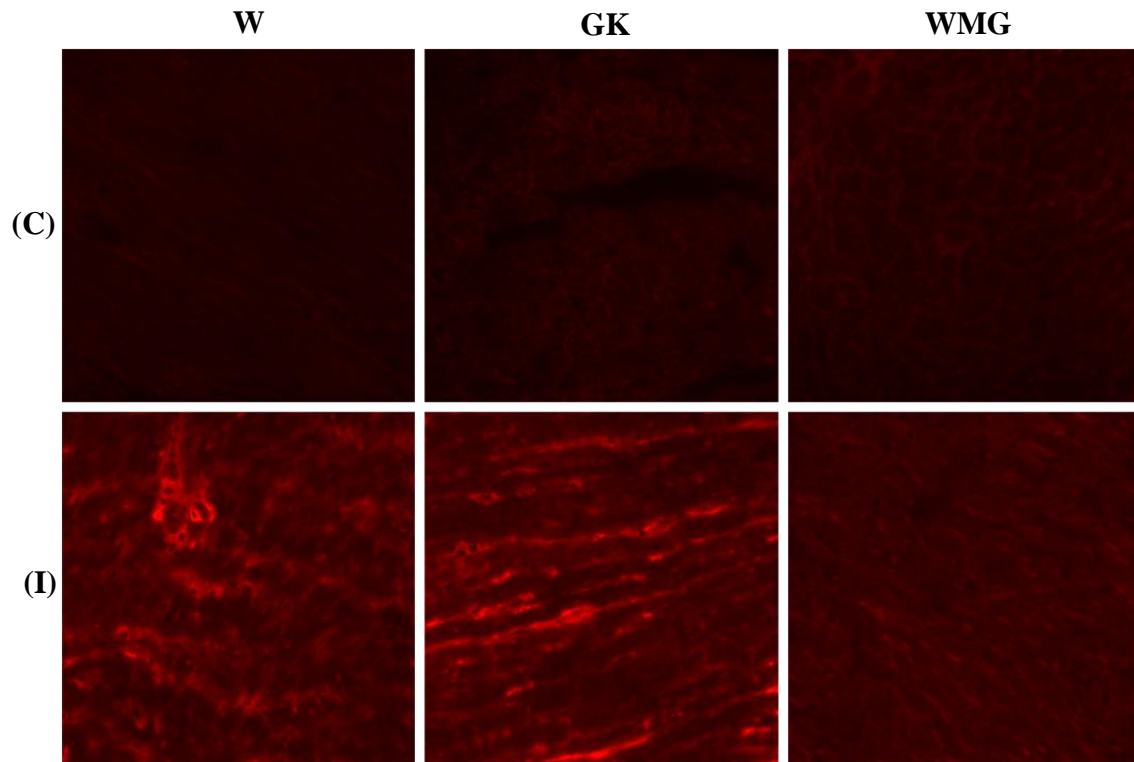


Figura 22: Bcl-2 no tecido cardíaco.

Imagens representativas dos cortes histológicos.

Os níveis de Bcl-2 presentes no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) [controlo (C) e submetidos a isquemia (D)], foram avaliados pela técnica de imuno-histoquímica, através da marcação com anticorpo específico para esta proteína anti-apoptótica. (n=3, ampliação de 200x)

3.4.3 Caspase-3

O grupos GK e WMG, na situação controlo, mostraram ter um aumento significativo da Caspase-3, quando comparados com o grupo controlo W, mostrando serem similares entre si. Verificou-se também que a isquemia induziu uma elevação significativa dos níveis desta proteína pró-apoptótica apenas nos ratos W (subgrupo W_{IR}) (Figura 22).

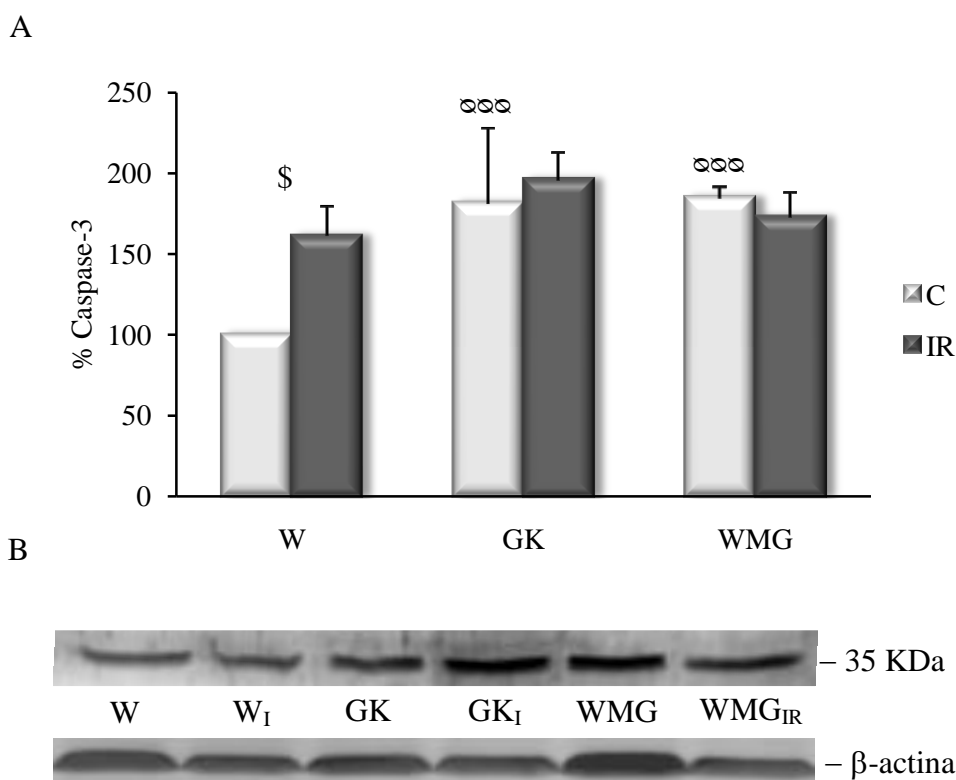


Figura 23: Caspase-3 no tecido cardíaco.

Foi quantificada a percentagem (%) de Caspase-3 no tecido cardíaco dos ratos GK e dos ratos W com (WMG) e sem metilglioxal (W) com 6 meses de vida [controlos (C) e submetidos a isquemia-reperfusão (IR)] por *western blot*, com marcação específica para esta proteína pró-apoptótica.

A - % relativa dos níveis Caspase-3 em relação ao grupo W.

B - Membrana representativa dos níveis Caspase-3.

Os resultados são apresentados como média \pm epm, n=5.

\$\$\$ p<0,001 em GK_C e WMG_C vs W_C; \$ p<0,05 em W_{IR} vs W_C (teste *t Student*)

CAPÍTULO 4

Discussão

Actualmente é de conhecimento lato que a diabetes *mellitus* está associada a um aumento da incidência da doença isquémica cardíaca (Mooradian, 2003; Stolar, 2003). Sabe-se também que o processo de recuperação de um evento isquémico, por parte da população diabética, é mais moroso e difícil, e muito se tem estudado para tentar perceber o porquê desta realidade.

A hiperglicemia tem um papel central no desenvolvimento das complicações associadas à síndrome diabética, nomeadamente no que diz respeito ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Browlee, 2005).

No presente trabalho, a proposta de estudo centrou-se num dos possíveis mecanismos de toxicidade da glicose, através da avaliação das implicações sistémicas e cardíacas de um produto secundário da glicose, o metilglioxal. Sugeriu-se então que, os animais normais submetidos à administração de metilglioxal (WMG), pudessem ter um perfil idêntico aos animais GK, com parâmetros agravados de forma semelhante aos que apresentam estes animais diabéticos tipo 2.

Desta forma, e por um lado, averiguou-se o efeito do composto no coração de ratos normais (grupo WMG) no estado basal, comparando-o com o perfil apresentado pelos animais diabéticos (grupo GK). Por outro lado, e comparativamente ao grupo GK, tentou-se perceber qual a sua influência na capacidade de resposta a um acidente isquémico.

No que respeita à caracterização geral dos três grupos experimentais, os ratos GK (quando comparados com os ratos W) apresentaram uma moderada hiperglicemia em jejum e uma marcada intolerância à glicose, como já havia sido demonstrado na colónia em estudo (Seiça et al., 2004). A hiperglicemia observada na diabetes traduz-se num aumento da glicação da hemoglobina, não sendo excepção, nestes animais, o aumento desse valor, acompanhando o seu perfil glicémico. No quadro diabético, surge

frequentemente a dislipidemia, amplamente relacionada com a insulino-resistência (Mooradian, 2003; Stolar et al., 2003). Os animais diabéticos apresentaram níveis de ácidos gordos livres, triglicerídeos e colesterol total e HDL superiores aos dos ratos normais. Do aumento dos valores de colesterol-HDL resulta a diminuição do índice aterogénico nestes animais, característica adaptativa verificada noutros trabalhos com este modelo diabético (Sena et al., 2009). Em relação aos animais normais submetidos à administração de metilglioxal (WMG), e ainda comparando com os animais basais, de referir o aumento dos ácidos gordos e também a diminuição dos níveis de colesterol-HDL, traduzindo-se num aumento do índice aterogénico. Os restantes parâmetros glicémicos e lipídicos mantiveram-se sem alterações significativas.

Alterações na concentração do metilglioxal mostraram estar implicadas em patologias como o cancro, a malária, a falência renal e as doenças vasculares associadas à diabetes (Agalou et al. 2003; Beisswenger et al. 2003; Iozef et al. 2003; Riboulet-Chavey et al. 2006; Thornalley 2003). Neste sentido, vários estudos já demonstraram que a população diabética possui níveis aumentados de metilglioxal em circulação (Hsuuw et al., 2005; Berlanga et al., 2005), corroborando os nossos resultados (grupo GK). Estes valores referem-se aos níveis plasmáticos, pelo que foram determinados os níveis de metilglioxal acumulados no tecido cardíaco, Apenas parte do metilglioxal na corrente sanguínea é acumulado nos tecidos; grande parte é excretado pela urina e também convertido em produtos inactivos pelo sistema da glioxalase (Xu et al., 2006). No coração, os níveis de metilglioxal dos ratos GK foram, uma vez mais, superiores aos dos ratos W. A administração de metilglioxal induziu um aumento dos seus níveis plasmáticos nos ratos normais, superiores aos dos animais diabéticos e, no coração, a acumulação deste composto foi similar à dos ratos GK, permitindo garantir a comparação entre animais GK e WMG, ao nível desse tecido. Desta forma, também é

possível perceber a grande influência da alimentação, sugerindo que a ingestão exagerada de alimentos ricos em metilglioxal pode afectar os sujeitos normais.

O coração é um órgão bastante afectado com a patologia diabética (Monteiro et al., 2005). A sua vasta rede de coronárias sofre frequentemente de disfunção endotelial vascular que contribui para o desenvolvimento de aterosclerose, por favorecer processos de coagulação, adesão celular e inflamação, por promover uma inapropriada vasodilatação/vasoconstrição e ainda por aumentar o transporte de lipoproteínas aterogénicas (Cersosimo et al., 2006). A aterosclerose pode, desta forma, atingir a rede de vasos cardíacos, aumentando o risco de eventos isquémicos cardíacos.

Estudos recentes mostraram também que o aumento da formação de metilglioxal está ligado ao desenvolvimento das complicações vasculares associadas à diabetes (Berlanga et al, 2005), tendo-se verificado neste trabalho que os animais submetidos à administração de metilglioxal têm um maior índice aterogénico, logo uma maior probabilidade de desenvolver processos ateroscleróticos. Sendo um marcador da doença renal, a albuminúria indica também a presença de danos vasculares e endoteliais, (Satchell, 2008; Jermendy, 2007) sendo, portanto, um bom marcador da função vascular, prevendo o risco cardiovascular (Hadi et al., 2007). Os resultados encontrados vão de encontro ao esperado, mostrando o aumento da excreção de albumina nos ratos GK e nos animais com metilglioxal (grupo WMG), embora menos pronunciado neste ultimo grupo. Efectivamente, vários estudos efectuados no nosso laboratório com ratos GK, bem como com o grupo WMG (dados não publicados), demonstraram o comprometimento da função endotelial vascular (Sena et al. 2007 e 2009).

A hiperglicemia característica da diabetes traduz-se num aumento de *stress* oxidativo, resultado da convergência das quatro vias patológicas abordadas anteriormente (Browlee, 2005). A via de formação de AGEs parece ser uma das mais importantes e

hoje é sabido que a acumulação destes compostos acarreta problemas extracelulares, através das suas ligações, induzindo modificação/inactivação de componentes celulares, diminuição da elasticidade vascular e aprisionamento de macromoléculas. Ao nível intracelular, a ligação aos receptores RAGE leva à transdução de várias vias de sinalização, gerando ROS, moléculas de adesão e citocinas pró-inflamatórias, factores desencadeadores de problemas vasculares (Hudson et al., 2004; Ramasamy et al., 2004; Goldin et al., 2006). Os níveis cardíacos de AGEs mostraram estar aumentados nos grupos GK e WMG, bem como os níveis dos seus receptores (RAGEs), aumentados por um processo de retrocontrolo positivo (Goldin et al., 2006). Existem outros receptores para AGEs, mas os RAGEs mostraram estar relacionados com o impacto adverso da isquemia-reperfusão, segundo o estudo de Bucciarelli (2008).

Não se podendo dissociar da formação de AGEs, o *stress* oxidativo encontrou-se concordante com estes resultados. O desequilíbrio entre o estado oxidativo e as defesas antioxidantes resulta num aumento de *stress* oxidativo, com aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio que podem reagir com vários constituintes celulares (Wellen et al., 2005). Os níveis de proteínas carbonilo indicam a presença de *stress* oxidativo proteico, uma vez que, para a formação destes compostos, as espécies reactivas atacam os grupos *heme* das proteínas. Nos ratos GK observou-se uma tendência ao aumento destes compostos e nos ratos normais a administração de metilglioxal resultou num aumento de *stress* oxidativo das proteínas. Os resultados observados são concordantes com o trabalho de Hsuuw (2005); de facto Hsuuw concluiu que o metilglioxal induz um aumento da produção de espécies reactivas de oxigénio, através das reacções de glicação com amino-ácidos ou proteínas e, também, porque impede a sua normal remoção, quer por esgotar o conteúdo das enzimas antioxidantes, quer, através da sua ligação, modificando e inactivando essas enzimas.

O perfil encontrado nesta primeira abordagem do tecido cardíaco antevê e explica, em parte, a maior probabilidade de ocorrência de acidentes isquêmicos cardíacos na diabetes, bem como a menor capacidade de resposta a um evento dessa natureza, que foi encontrada nos animais diabéticos e nos normais que tomaram metilglioal. Estes animais mostraram então ter um aumento de proteínas carbonilo, de AGEs e de RAGEs, factores que podem conduzir ao desenvolvimento de problemas cardiovasculares (Browlee, 2005; Ramasamy et al., 2005; Bucciarelli et al., 2008).

A fim de perceber a semelhante inabilidade de resposta por parte daqueles dois grupos (GK e WMG), estudaram-se algumas vias que se consideram de grande importância para a sobrevivência celular após isquemia-reperfusão.

Num estudo recente, El-Omar demonstrou a existência de disfunção cardíaca nos ratos Goto-Kakizaki, numa situação de hipoxia (El-Omar, 2004), mas pouco se sabe sobre os mecanismos da resposta a este tipo de eventos por parte destes animais.

Numa situação de isquemia, o tecido afectado permanece, até à sua reperfusão, numa situação de hipoxia. Quando o oxigénio celular escasseia, o factor de transcrição induzido por hipoxia (HIF-1 alfa) activa a transcrição de mais de 70 genes que levam à transcrição de diversas proteínas envolvidas na proliferação e sobrevivência celulares, na angiogénese e no metabolismo glicolítico, que são exemplos de respostas sistémicas, tecidulares e intracelulares, respectivamente, de adaptação à hipoxia (Semenza, 2004; Pugh et al., 2003). Em normoxia, esta subunidade é degradada pelo proteossoma e, na presença de hiperglicemia, este factor também é destabilizado, pelo que se pensa que seja degradado por um mecanismo diferente daquele que ocorre em normoxia (Catrina et al., 2004). Propôs-se então, com o presente trabalho, que o metilglioal pudesse ser o responsável pela destabilização do HIF-1 alfa em condições de hiperglicemia. Embora sejam resultados preliminares, a marcação para este factor de transcrição pareceu

mostrar a sua diminuição nos animais GK, e talvez também nos WMG, não sendo possível ainda concluir acerca da hipótese da destabilização pelo metilgloxal. Estudos recentes indicam que o HIF-1 alfa pode ser considerado um cardioprotector, estando relacionado com a dimensão do enfarte e com o desempenho funcional do coração (Kido et al., 2005; Ning et al., 2006).

A angiogénese, com a formação de vasos colaterais, pode solucionar a falta de acesso a oxigénio e nutrientes na área cardíaca isquemiada. Vários estudos têm mostrado a incapacidade angiogénica por parte de células e modelos animais em condições de hiperglicemia, e mesmo em doentes diabéticos que sofreram isquemia cardíaca (Abaci et al., 1999; Larger et al., 2004). Esta incapacidade de resposta pode prender-se com a alteração da expressão de VEGF que pode estar relacionada com a destabilização do HIF-1 alfa (Larger et al., 2004; Kido et al., 2005), com a ligação dos AGEs aos seus receptores RAGE (Treins et al., 2001; Goldin et al., 2006), ou outros mecanismos ainda não explorados. Todavia, no presente estudo, não foram encontradas diferenças nos níveis de VEGF nos diferentes grupos.

A Akt, também conhecida como PKB (proteína cinase B), é considerada a reguladora central da sobrevivência dos cardiomiócitos após danos isquémicos, quer *in vitro*, quer *in vivo* (Shao et al., 2006). Um estudo de Matsui (2001) demonstrou que a Akt/PKB reduziu a apoptose induzida por hipoxia em miócitos ventriculares, tendo também reduzido a apoptose e a dimensão da zona enfartada em corações com enfarte do miocárdio. Neste sentido, quantificou-se a proteína na sua forma normal e após fosforilação no resíduo *Ser 473*. Ainda não são claros os mecanismos responsáveis por esta fosforilação, mas pensa-se ser de extrema importância para a actividade da enzima (Shaw et al., 2006). No presente trabalho, verificou-se então que, na sua forma inactiva, não foram encontradas grandes diferenças entre os três grupos (W, GK e WMG) e seus

subgrupos, ao contrário do que se verificou na percentagem desta proteína no seu estado fosforilado. Uma diminuição marcada desta proteína nos grupos GK e WMG, mesmo no estado basal, prevê uma pior resposta anti-isquémica por parte destes grupos, sendo os animais submetidos à administração de metilglioxal, os que viram mais reduzida esta proteína.

Os resultados obtidos no que diz respeito à apoptose vieram consolidar os níveis de Akt nos diferentes grupos. Durante e após um fenómeno isquémico, para além de ocorrer necrose do tecido afectado, a morte celular programada atinge também grandes proporções (Moens et al., 2005). A apoptose tem um papel chave na patogénese de várias doenças cardiovasculares, tendo sido encontrados fenómenos apoptóticos em cardiomiócitos de pacientes com enfarte do miocárdio, cardiomiopatia diabética e falência cardíaca (Lee et al., 2009). A apoptose é um processo de morte celular programada, mediada por receptores na membrana plasmática assim como pela mitocôndria e pelo retículo endoplasmático (Lee et al., 2009). Com base em estudos anteriores, em que se verifica que a mitocôndria isquémica tem um papel crítico na indução de apoptose (Moens et al., 2005; He et al., 2007), foram avaliadas as proteínas Bax e Bcl-2. Proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, podem ser translocadas do citosol mitocondrial, promovendo a permeabilização da membrana mitocondrial. A proteína anti-apoptótica Bcl-2, localizada maioritariamente na membrana mitocondrial, pode bloquear essa translocação, bloqueando a permeabilização. Desta forma, um aumento da razão Bax/Bcl-2 leva à formação de poros na membrana mitocondrial, resultando na libertação de componentes mitocondriais que actuam como factores pró-apoptóticos (Crompton, 2000). Não sendo possível calcular a razão entre as duas proteínas, foi possível verificar um aumento da Bax nos subgrupos W_I e GK_I , aumento esse notado, à partida, na situação controlo dos WMG. Relativamente à proteína anti-apoptótica Bcl-2,

observou-se um notável aumento desta nos subgrupos W_I e GK_I , possivelmente na tentativa de resposta ao insulto. Este aumento já não foi notado no grupo WMG, mostrando a incapacidade de reacção por parte destes animais.

Cada vez mais se coloca de lado a distinção das vias (mitocondrial e receptores de morte) da morte celular, ocorrendo uma interacção constante entre os factores de ambas as vias (Lee et al., 2009). Validando esta ideia, um estudo de Haudek (2007) com corações de rato, demonstrou que as vias apoptóticas se complementavam, sendo, de alguma forma, ambas activadas pelo factor de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$).

No final da cascata apoptótica surge a Caspase-3 que, uma vez clivada, torna irreversível a morte celular, sendo desta forma importante quantificá-la e calcular a sua actividade. A actividade não foi ainda averiguada mas, no que diz respeito à sua quantificação por *western blot*, verificou-se que esta proteína está grandemente aumentada nos grupos GK e WMG, mesmo na situação controlo. Comparando a situação controlo com a situação pós isquemia-reperfusão, verificou-se que houve um aumento marcado no subgrupo W_{IR} , não sendo notado este aumento nos outros grupos, uma vez que seus níveis já eram muito aumentados no estado basal. O estudo de Hsuuw (2005), relativamente à indução de apoptose pelo metilglioxal, corrobora os resultados obtidos no presente trabalho confirmando a toxicidade deste composto.

CAPÍTULO 5

Conclusão

Os ratos GK, quando comparados com os ratos W, apresentaram um perfil glicémico e lipídico agravado, bem como indicação de danos na função vascular, aspecto também notado nos ratos WMG pelo aumento do índice aterogénico. Os ácidos gordos deste grupo aumentaram e os restantes parâmetros lipídicos e glicémicos não mostraram quaisquer alterações quando comparados com o grupo basal.

A determinação do metilglioxal garantiu, através dos seus valores (similares entre GK e WMG), a possibilidade de comparação entre estes dois grupos experimentais, sendo possível concluir que este composto, nos animais normais, foi capaz de mimetizar o perfil cardíaco encontrado nos animais diabéticos.

Desta forma, no que respeita à avaliação do tecido cardíaco, e comparando com os ratos normais, os níveis de proteínas carbonilo, de AGEs e seus receptores RAGEs foram superiores nos ratos GK e WMG e similares entre si. Estes resultados consideram-se explicativos no que respeita ao desenvolvimento danos vasculares e ocorrência de isquemia na diabetes, sendo nos ratos WMG, consequência da acção do metilglioxal.

A diminuição Akt, resultando numa possível diminuição da activação da via de sobrevivência promovida por esta, foi bem notória nos grupos GK e WMG, provando, mais uma vez, a capacidade do metilglioxal induzir alterações no metabolismo de um rato normal, tornando-o em muito semelhante ao diabético que, vendo esta via diminuída tem uma maior probabilidade de sobrevivência celular.

O estudo da apoptose veio consolidar o que se verificou acontecer com a Akt. A percentagem de Caspase-3 foi notoriamente mais elevada nos grupos GK e WMG. Os ratos GK viram aumentada a proteína pró-apoptótica Bax na situação de isquemia, mas ainda foram capazes de aumentar a anti-apoptótica Bcl-2 nessa situação. Mais agravado, o grupo WMG viu a Bax aumentada logo na situação controlo e foi incapaz de reagir ao insulto isquémico, não tendo aumentado a expressão de Bcl-2. Estes resultados podem

estar na chave da incapacidade de resposta, por parte da população diabética, a eventos isquêmicos, podendo estar de alguma forma relacionados com os níveis de HIF-1α. Confirma-se então mais uma vez, através dos resultados verificados na apoptose, a potente toxicidade do metilglioxal nos animais normais, que experimentam mecanismos em muito semelhantes aos dos animais diabéticos.

Desta forma, comprovou-se o importante papel do metilglioxal na patologia da diabetes, tornando-o um potente alvo terapêutico na luta contra a doença e as suas complicações associadas.

Finalmente, este trabalho permitiu ainda concluir a influência da alimentação no surgimento/desenvolvimento de diversas patologias, confirmando então que a ingestão exagerada de alimentos ricos em metilglioxal pode ter um efeito nefasto, inclusivamente em sujeitos normais.

CAPÍTULO 6

Referências Bibliográficas

- Abaci A., Kahraman S., Eryol N. K., Arienç H. & Ergin A. (1999) Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 99: 2239-2242.
- Agalou S., Ahmed N., Danway A. & Thornalley P. J. (2003) Removal of advanced glycation end products in clinical renal failure by peritoneal dialysis and haemodialysis. *Biochem Soc Trans* 31: 1394-1396.
- Basta G. (2008) Receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: from Basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 196: 9-21.
- Beisswenger P. J., Howell S. K., Nelson R. G., Mauer M. & Szwegold B. S. (2003) Alpha-oxoaldehyde metabolism and diabetic complications. *Biochem Soc Trans* 31: 1358-1363.
- Berlanga J., Cibrian D., Guillén I., Freyre F., Alba J. S., Lopez-Saura P., Merino N., Aldama A., Quintela A. M., Triana M. E., Montequin J. F., Ajamieh H., Urquiza D., Ahmed N. & Thornalley P. J. (2005) Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. *Clinical Science* 109: 83-95.
- Brownlee M. (2005) The pathobiology of Diabetic complication. *Diabetes* 54: 1615-1625.
- Bucciarelli L. G., Ananthakrishnan R., Hwang Y. C., Kaneko M., Song F., Sell D. R., Strauch C., Monnier V. M., Yan S. F., Schmidt A. M. & Ramasamy R. (2008) RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. *Diabetes* 57: 1941-1951.
- Caretti A., Morel S., Milano G., Fantacci M., Bianciardi P., Ronchi R., Vassalli G., Segesser L. K. & Samaja M. (2007) Heart HIF-1 α and MAP kinases during hypoxia: are they associated in vivo? *Experimental Biology and Medicine* 887-894.

- Carmeliet P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9: 653-660.
- Catrina SB., Okamoto K., Pereira T. Brismar K. & Poellinger L. (2004) Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function. *Diabetes* 53: 3226-3232.
- Cersosimo E. & DeFronzo R. A. (2006) Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 423-436.
- Doronzio G., Russo I., Mattiello L., Riganti C., Anfossi G & Trovati M. (2006) Insulin activates hypoxia-inducible factor-1 α in human and rat vascular smooth muscle cells via phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways: impairment in insulin resistance owing to defects in insulin signaling. *Diabetologia* 49: 1049-1063.
- Duh E. & Aiello L. P. (1999) Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Circulation* 99: 2239-2242.
- Eefting F., Rensing B., Wigman J., Pannekoek W. J., Liu W. M., Cramer M. J., Lips D. J. & Doevendans P.A. (2004) Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 61: 414-426.
- El-Omar M. M., Yang Z., Philips A. O. & Shah A. M. (2004) Cardiac dysfunction in Goto-Kakizaki rat. *Basis Res Cardiol* 99: 133-141.
- Evora P. R. B., Pearson P. J., Seccombe J. F., Schaff H.V. & Preto R. (1996) Lesão de isquemia-reperfusão. Aspectos fisiopatológicos e a importância da função endotelial. *Arq Bras Cardiol* 66(4): 239-245.
- Ferdinandy P., Schulz R. & Baxter G. F. (2007) Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev* 59: 418-458.

- Goldin A., Beckman J.A., Schmidt A.M. & Creager M.A. (2006). Advanced Glycation End Products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 114: 597-605.
- Gugliucci A. (2000) Glycation as the glucose link to diabetic complications. *Clinical Practice* 100(10): 621-634.
- Hadi H. AR. & Suwaidi J. AI. (2007) Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vascular Health and Risk Management* 3(6): 853-876.
- Hartge M.M.; Unger T. & U. Kintscher (2007) The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res* 4: 84-88.
- Haudek S. B., Taffet G. E., Schneider M. D. & Mann D. L. (2007) TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodelling through activation of multiple cell death pathways. *J Clin Invest* 117: 2692-2701.
- He A., Wang J., Gui C., Jiang Y., Sun Y. & Chen T. (2007) Changes of mitochondrial pathway in hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes apoptosis. *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 45(4): 379-400.
- Hsuuw Y., Chang C., Chan W. & Yu J. (2005) Curcumin prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryonic stem cell and blastocysts. *Journal of Cellular Physiology* 205: 379-386.
- Huang J.S., Guh J.Y., Chen H.C., Hung W.C, Lai Y.H. & L.Y. Chuang (2001) Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 81: 102-113.
- Huebschmann A.G., Vlassara H., Regensteiner J.G. & J.E.B. Reusch (2006) Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care* 29(6): 1420-1432.

- Hudson B.I. & A.M. Schmidt (2004) RAGE: a novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharmaceutical Research* 21(7): 1079- 1086.
- Iozef R., Rahlfs S., Schirmer H & Becker K (2003) Glioxalase I of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*:evidence for a subunit fusion. *FEBS* 554: 284-288.
- Jakus V. & Rietbrock N. (2004) Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 53: 131-142.
- Jia X., Olson D.J.H., Ross A.R.S. & Wu L. (2006) Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *FASEB J* 20: E871-E879.
- Kalapos M. P. (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions* 171: 251-271.
- Kaneto H., Matsuoka T., Nakatani Y., Kawamori D., Miyatsuka T., Matsuhisa M. & Yamasaki Y. (2005) Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med* 83: 429-439.
- Kang Y. V., Edwards L. G. & Thornalley P. J. (1996) Effect of methylglyoxal on human leukaemia 60 cell growth: modification of DNA G1 growth arrest and induction of apoptosis. *Leuk Res* 20: 397-405.
- Kasai H., Kumeno K., Yamaizumi Z., Nishimura S., Nagao M., Fujita Y., Sugimura T., Kukaya H. & Kosuge T. (1982) Mutagenicity of methylglyoxal in coffee. *Gann* 73: 681-683.
- Kido M., Du L., Sullivan C. C., Li X., Deutsch R., Jamieson S. W. & Thistlethwaite P. A. (2005) Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 46: 2116-2124.
- Kumagai T., Nangaku M., Kojima I., Nagai R., Ingelfinger J. R., Miyata T., Fujita T. &

- Inagi R. (2009) Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: F912–F921.
- Larger E., Marre M., Corvol P. & Gasc J.M. (2004) Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Diabetes* 53: 752-761.
- Lee Y. & Gustafsson A. B. (2009) Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 14: 536-548
- Lisa D. F. & Bernardi P. (2006) Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovascular research* 70: 191-199
- Matsui T., Tao J., del Monte F., Lee K. H., Li L., Picard M., Force T. L., Franke T. F. Hajjar R. JH. & Rosenzweig A (2001) Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104: 330-335.
- McAfee M., Hashimoto H., Pearson P. J. & Schaff H. V. (1990) Endothelial dysfunction following global cardiac ischemia and reperfusion. *Surgical Forum* 41: 301-311.
- Moens A.L., Claeys M.J., Timmermans J.P. & Vrints C.J. (2005) Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *International Journal of Cardiology* 100: 179-190.
- Monteiro P., Gonçalves L. & Providência L. A. (2005) Diabetes and cardiovascular disease: the road to cardioprotection. *Heart* 91: 1621-1625.
- Mooradian A. D. (2003) Cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 163: 33-40.
- Muniyappa R., Montagnani M., Koh K. K. & Quon M. J. (2007) Cardiovascular actions of insulin. *Endocrine Reviews* 28(5): 463-491.

- Negre-Salvayre A., Coatrieux C., Ingueneau C. & R. Salvayre (2008) Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *British Journal of Pharmacology* 153: 6-20.
- Ning XH., Chen SH., Buroker N. E., Xu CS., Li FR., Li SP., Song DS., Ge M., Hyyti O.M., Zhang M. & Portman M. A. (2007) Short-cycle hypoxia in the intact heart: hypoxia- inducible factor 1 α signalling and the relationship to injury threshold. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H333-H341.
- Petersen K.F. & G.I. Schulman (2006) Etiology of insulin resistance. *The American Journal of Medicine* 119(5A): 10S-16S.
- Phillips S. A. & Thomalley P.J. (1993) The formation of metylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for metylglyoxal. *European Journal of Biochemistry* 212: 102-105.
- Pugh C. W. & Ratcliffe P. J. (2003) Regulation angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature Medicine* 9: 677-684.
- Ramasamy R., Vannucci S.J., Yan S.S.D., Herold K., Yan S.F. & Schmidt A.M. (2005) Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* 15: 16R-28R.
- Riboulet-Chavey A., Pierron A., Durand I., Murdaca J., Giudicelli J. & Obberghen E.V. (2006). Methylglyoxal impairs the insulin signalling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes* 55: 1289-1299.
- Robbins & Cotran (2005) *Pathologic basis of disease*. Elsevier Sanders, 7^a edição, 14-32; 571-586.

- Rolo A. P. & Palmeira C. M. (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycaemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212: 167-178.
- Schulz R., Kelm M. & Heusch G. (2004) Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 61: 402-413.
- Seiça R., Susuki K., Santos R.M. & Do Rosário L.M. (2004) Deficiência primária da secreção de insulina de ilhéus isolados de ratos Goto-Kakisaki, um modelo animal de diabetes tipo 2 não obesa. *Acta Med Port* 17: 42-48.
- Semenza G. L. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology* 19: 176-182.
- Sena C. M., Louro T., Matafome P., Nunes E., Monteiro P. & Seiça R. (2009) Antioxidant and vascular effects of glicazida in type 2 diabetic rats fed high-fat diet. *Physiol Res* 58(2): 203-209
- Sena C.M., Nunes E., Louro T., Proença T., Fernandes R., Boarder M.R. & Seiça R.M. (2008) Effects of α -lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *British Journal of Pharmacology* 1-13.
- Sena C. M., Nunes E., Louro T., Proença T. & Seiça R. M. (2007) Endothelial dysfunction in type 2 diabetes: effect of antioxidants. *Rev Port Cardiol* 26(6): 609-619.
- Sesti G. (2006) Pathophysiology of insulin resistance. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 20(4): 665-679.
- Shao Z., Bhattacharya K., Hsich E., Park L., Walters B., Germann U., Wang Y., Kyriakis J., Mohanlal R., Kuida K., Namchuk M., Salituro F., Yao Y., Hou W., Chen X., Aronovitz M., Tschlis P. N., Bhattacharya S., Force T. & Kilter H.

- (2006) c-Jun N-terminal kinases mediate reactivation of Akt and cardiomyocyte survival after hypoxic injury in vitro and in vivo. *Circ res.* 98: 111-118.
- Shaw J., Kirshenbaum L. A. (2006) Prime time for JNK-mediated Akt reactivation in hypoxia-reoxygenation. *Circ Res.* 98: 7-9.
- Smith U. (2007) Introduction: symposium on diabetes, inflammation and cardiovascular disease. *Journal of Internal Medicine* 262: 142-144.
- Stolar M. W. & Chilton R. J. (2003) Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance. *Clinical Therapeutics* 25: 4-31.
- Tan K.C.B., Shiu S.W.M., Chow W.S., Bucala R. & Betteridge D.J. (2006) Association between serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and circulating advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetologia* 49: 2756-2762.
- Thormalley P. J. (2003) Glyoxalase I – structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans* 31: 1343-1348.
- Treins C., Giorgetti-Peraldi S., Murdaca J. & Obberghen E. V. (2001) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation and products. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 43836-43841.
- Tsutsui H. (2001) Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Internal Medicine* 40: 1177-1182.
- Uriuhara A., Miyata S., Liu B.F., Miyazaki H., Kusunoki H., Kojima H., Yamashita Y., Suzuki K., Inaba K. & M. Kasuga (2007) Methylglyoxal induces prostaglandin E₂ production in rat mesangial cells. *Kobe J Med Sci* 53(6): 305-315.
- Vlassara H. & J. Uribarri (2004) Glycooxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 5: 181-188.
- Walsh K. (2009) Apokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ J* 73: 13-18.

- Ward R.A. & K.R. McLeish (2004) Methylglyoxal: a stimulus to neutrophil oxygen radical production in chronic renal failure? *Nephrol Dial Transplant* 19: 1702-1707.
- Wellen K.E. & G.S. Hotamisligil (2005) Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119.
- Xu Y. & X. Chen (2006) Glyxalase II, a detoxifying enzyme of glycolysis byproduct methylglyoxal and a target of p63 and p73, is a pro-survival factor of the p53 family. *The Journal of Biological Chemistry* 281(36): 26702-26713.
- Yao D., Taguchi T., Matsumura T., Pestell R., Edelstein D., Giardino I., Suske G., Rabbani N., Thornalley P.J., Sarthy V.P., Hammes H.P. & M. Brownlee (2007) High glucose increases angiopoietin-2 transcription in microvascular endothelial cells through methylglyoxal modification of mSin3A. *The Journal of Biological Chemistry* 282(42): 31038-31045.