

TÍTULO

O PAPEL DA PIRIDOXAMINA NA REVERSÃO DA LESÃO RENAL INDUZIDA POR METILGLIOXAL

THE ROLE OF PYRIDOXAMINE IN REVERSION OF METHYLGLYOXAL-INDUCED
KIDNEY LESION

Adriana Roque^{*1}, Paulo Matafome¹, Cristina Sena¹, Raquel Seica¹

¹Laboratório de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Contactos*

Morada: Pólo III da Universidade de Coimbra, Faculdade de Medicina, Subunidade 1, 1º andar, Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-354 Coimbra, Portugal.

E-mail: adriroque05@hotmail.com

Trabalho financiado por:

IBILI, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT)

RESUMO

Introdução: A insuficiência renal crónica é uma fonte significativa de morbidade e mortalidade, sendo a Diabetes mellitus a sua principal causa. Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) têm um papel importante tanto na nefropatia diabética como noutras doenças renais e o Metilglioxal (MG), um intermediário reactivo da formação de AGEs, encontra-se aumentado nos indivíduos diabéticos. A Piridoxamina (PM) é um derivado da vitamina B6 que, *in vitro*, é um inibidor da formação de AGEs pós-*Amadori*.

Objectivo: Avaliar a capacidade da PM reverter ou atrasar a lesão renal induzida por MG.

Métodos: Foram estudados três grupos de animais (ratos Wistar) – um grupo controlo e dois grupos a que foi administrado MG (65 mg/kg/dia *per os*) durante 8 semanas, tendo um destes recebido, posteriormente, PM (1g/L) durante 4 semanas.

A análise de vários parâmetros (glicação, fibrose, apoptose e angiogénese) no tecido renal foi realizada por *Western Blot*. Procedeu-se também à avaliação do *stress* oxidativo local (sonda para anião superóxido) e da estrutura renal (técnica do Ácido Periódico de *Schiff*).

Resultados: O MG aumentou os níveis de AGEs (CML) e a expressão dos seus receptores a nível renal, e a administração de PM reduziu os níveis de CML. O MG induziu aumento da forma clivada do TGF- β e diminuição da razão Bcl-2/Bax, alterações restauradas com a terapêutica com PM. Não houve alteração da forma precursora do TGF- β e dos marcadores de angiogénese. Observou-se um aumento de *stress* oxidativo com a administração de MG, parcialmente revertido pela PM. As lesões histológicas induzidas pelo MG foram semelhantes às encontradas na nefropatia diabética, havendo reversão parcial destas com a PM.

Conclusão: O MG tem um papel relevante na indução de lesão renal e a PM, por reverter em parte estas lesões, pode afigurar-se como um agente terapêutico direccionado para as patologias renais em que os AGEs têm um papel significativo.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, produtos finais de glicação avançada, metilglioxal, nefropatia diabética, piridoxamina.

Abreviaturas: AGEs, *advanced glycation end-products* (produtos finais de glicação avançada); CML, N^ε-(Carboximetil)lisina; HbA_{1c}, hemoglobina glicada; HDL, *high-density lipoprotein* (lipoproteínas de alta densidade); MBG, membrana basal glomerular; MG, metilglioxal; PAS, técnica do Ácido Periódico de *Schiff*; PM, piridoxamina; RAGEs, receptor de AGEs; TGF- β , *Transforming Growth Factor- β* ; VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*.

ABSTRACT

Background: Chronic Kidney Disease is an important source of morbidity and mortality, and Diabetes is its major cause. Advanced glycation end-products (AGEs) are important in diabetic nephropathy and other kidney diseases and methylglyoxal (MG), a reactive intermediate of AGEs production, is increased in diabetic patients. Pyridoxamine (PM) is a B6 vitamin derivative that is an inhibitor of *post-Amadori* AGEs *in vitro*.

Purpose: Assess PM ability to reverse or delay kidney lesions induced by MG.

Experimental approach: We studied three groups of animals (Wistar rats) – one control group and two groups treated with MG (65 mg/kg/day *per os*) for 8 weeks. One of these groups was also treated with PM (1g/L) for 4 weeks.

The assessment of several kidney tissue parameters (glycation, fibrosis, apoptosis and angiogenesis) was made by Western Blot. Local oxidative stress was assessed by a superoxide anion probe and renal structure by Periodic Acid-*Schiff* stain method.

Key results: MG increased AGEs (CML) levels and their receptors' expression in the kidney and the administration of PM reduced CML levels. MG induced an increase in the cleaved form of TGF- β and a decrease of the Bcl-2/Bax *ratio*, which were restored by PM treatment. No significant changes were noticed in the precursor form of TGF- β or angiogenesis markers. An increase of oxidative stress was noticed with MG administration, partially reverted with PM. Histologic lesions induced by MG were similar to those found in diabetic nephropathy, and were also partly reversed with PM.

Conclusions: MG has an important role in kidney lesion induction and PM, reverting partly these lesions, can be considered as a therapeutic agent directed to AGE related kidney diseases.

Keywords: Diabetes mellitus, advanced glycation end products, methylglyoxal, diabetic nephropathies, pyridoxamine.

Abbreviations: AGEs, advanced glycation end products; CML, N^ε-(Carboxymethyl)lysine; HbA_{1c}, glycated haemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; MBG, glomerular basement membrane; MG, methylglyoxal; PAS, Periodic Acid-*Schiff* stain; PM, pyridoxamine; RAGEs, receptor for AGEs; TGF-β, Transforming Growth Factor-β; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus define-se como um conjunto de disfunções metabólicas que têm em comum a hiperglicémia crónica. Esta conduz a lesão micro e macrovascular de diferentes órgãos, nomeadamente do rim.¹⁻⁴

A insuficiência renal crónica afecta cerca de 10% da população norte-americana, sendo a diabetes mellitus a sua principal causa (45% dos novos casos) nos países desenvolvidos. Por sua vez, a nefropatia diabética, que constitui a mais grave complicação da Diabetes mellitus e é um factor de risco para morte prematura, atinge 20-40% dos cerca de 285 milhões de diabéticos a nível mundial (2010), um número que tende a aumentar grandemente nas próximas décadas.^{5,6}

A nefropatia diabética prende-se com um conjunto de lesões que frequentemente ocorrem concomitantemente no rim diabético ao nível dos vários compartimentos renais, e que se devem em parte à acção dos produtos finais de glicação avançada (AGEs).^{4,7,8}

Os AGEs são um grupo ubíquo e heterogéneo de compostos químicos que resultam de uma reacção não-enzimática entre açúcares redutores e grupos amina das proteínas (reacção de Maillard), mas também lípidos e ácidos nucleicos, formando bases de *Schiff*.¹ Estas sofrem rearranjos constituindo produtos de *Amadori*, que após um conjunto sucessivo de reacções se transformam em AGEs. A sua formação é particularmente potenciada em condições de hiperglicémia crónica.^{1,2,9-12}

O processo de glicação afecta, quer proteínas circulantes com formação de intermediários reactivos, quer proteínas com longo tempo de semi-vida como as da matriz extracelular, através da formação de *cross-linkings*. Para além disso, os AGEs podem ainda ligar-se ao seu receptor específico, RAGEs (receptor de AGEs), conduzindo a estados pró-oxidantes e pró-inflamatórios.^{1,2,9,10}

O Metilglioxal (MG) é um dicarbonilo reactivo (α -oxoaldeído), intermediário do metabolismo da glicose e precursor de AGEs, que se encontra aumentado nos indivíduos diabéticos, especialmente quando mal controlados.¹¹⁻¹⁴

Estudos prévios no nosso laboratório, comprovaram que as lesões renais da fase inicial e particularmente da fase tardia da Diabetes tipo 2, são especialmente potenciadas pela presença de AGEs e *stress* oxidativo, e que o MG exógeno agrava estes parâmetros, mesmo em animais normais. (resultados não publicados). Os AGEs estão também implicados na fisiopatologia de várias doenças renais para além da nefropatia diabética, como a nefrite lúpica, a nefropatia por IgA, a nefropatia hipertensiva, a rejeição crónica de transplante renal e o próprio envelhecimento renal.⁷

Uma vez que o MG é um precursor da formação de AGEs e estes estão implicados nas complicações da diabetes, em particular a nefropatia, a inibição da formação dos mesmos poderá ser benéfica.

A Piridoxamina (PM) é um derivado da vitamina B6 que, *in vitro*, inibe o rearranjo das interacções entre a glicose e os grupos amina das proteínas e a consequente formação de AGEs após a formação de produtos *Amadori*.¹⁵⁻¹⁸

Desta forma, o nosso objectivo foi investigar o papel do MG na indução de lesão renal e avaliar o papel da PM na reversão dessas mesmas lesões, permitindo-nos verificar se a PM é um candidato a ser usado como agente terapêutico direccionado, tanto na nefropatia diabética, como noutras patologias renais em que os AGEs tenham um papel relevante.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os sais e solventes orgânicos utilizados possuíam elevado grau de pureza analítica e foram adquiridos à Merck Darmstad – Alemanha, à Sigma-Aldrich – EUA e à Pancreac Química SA-Espanha.

Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anticorpo monoclonal anti-N- ϵ -carboximetil-lisina (CML; Trans Genic Inc., Japão), anticorpo policlonal anti-receptor para AGEs (RAGE); Abcam, Reino Unido), anticorpo policlonal anti-Bax e anti-Angiopoetina-2 (Santa Cruz Biotechnology, EUA), anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 (C-2) (Santa Cruz Biotechnology, EUA), anticorpo policlonal anti-TGF- β 1 (R&D Systems, EUA) e anticorpo monoclonal anti-VEGF (Calbiochem, EUA).

Modelos animais

Neste estudo foi usado um modelo animal normal de ratos Wistar provenientes da nossa colónia (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra).

Os animais foram mantidos num ambiente restrito sob temperatura e humidade controladas (21-24°C e 50-60%, respectivamente), ventilação adequada e ciclos alternados de luz (12 horas) e obscuridade (12 horas), tendo tido livre acesso a ração (dieta *standard* laboratorial A04-Panlab, Barcelona, Espanha) e a água (utilizada como veículo de administração nos grupos tratados).

Foram constituídos 3 grupos experimentais cada um com 12 animais (macho), tendo sido sacrificados com 6 meses de idade. O grupo controlo de ratos Wistar (W) não recebeu qualquer tratamento; os outros dois grupos foram submetidos à administração de MG (65 mg/kg/dia - Sigma, EUA), durante um período de 8 semanas, após o qual, um dos grupos foi

tratado com PM (1g/L - Sigma, EUA) durante 4 semanas (WMPir) e o outro mantido com água durante igual período (WM).

Os animais sujeitos a administração de MG com e sem PM (grupos WMPir e WM respectivamente) foram pesados semanalmente ao longo do tratamento com o objectivo de ajustar a dose de ambos os compostos.

Análises *in vivo*

O peso corporal foi determinado durante e no final do tratamento. A glicémia (mg/dL) foi determinada na veia da cauda, no final do tratamento, através do método da glicose-oxidase utilizando um glicómetro e tiras-teste (*Glucometer Elite* – Bayer SA, Portugal). Foram avaliados os níveis de glicose em jejum (16-18 horas) e 2 horas após administração intraperitoneal de 1,8gk de glicose a 30% (Braun, Queluz de Baixo, Portugal). Também os níveis de HbA_{1C} foram determinados no sangue total da veia da cauda, usando um analisador automático (*DCA 2000 Analyser*, Bayer, Health Care Diagnostics Division).

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

Para a determinação dos parâmetros séricos, o sangue recolhido na altura do sacrifício por punção cardíaca com os animais anestesiados com cloridrato de quetamina (75 mg/kg, i.m., Parke-Davis, Ann Arbor, MI, EUA) e cloridrato de clorpromazina (2.65 mg/kg, i.m., Lab. Vitória, Portugal), foi centrifugado (2500rpm) durante 10 min, a 4°C, sendo o soro guardado a – 80°C até serem processadas as amostras.

Sacrifício dos animais, remoção e armazenamento dos rins

Após a colheita de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Uma vez expostos os órgãos intra-abdominais, os dois rins foram removidos, limpos de tecido adiposo e da cápsula e pesados. Um dos órgãos foi congelado de imediato em azoto líquido e armazenado a - 80°C, enquanto do outro foi obtida uma pequena fatia transversal, conservada em meio de congelação (*Shandon Cryomatrix, Thermo Scientific, EUA*) para posteriores estudos renais, e o restante tecido conservado em formaldeído tamponado a 10% para estudos histológicos subsequentes.

Homogeneização do rim e detecção de proteínas por *Western Blot*

Foi obtida uma fatia transversal da zona mediana de cada rim congelado (córtex e medula), com cerca de 200 mg. Esta foi homogeneizada em 2 mL de tampão de lise (Tabela 1) e seguidamente sonicada.

Procedeu-se, então, a duas centrifugações (20', 14000xg, 4°C), recolhendo-se, sucessivamente, o sobrenadante. Calculou-se a concentração de proteína pelo método do BCA (*BCA protein assay, Pierce, EUA*) e as amostras foram aliqüotadas e, após adicionado tampão *Sample* (Tabela 1), armazenadas a - 80°C.

Western Blot

A identificação e quantificação das proteínas Bcl-2, Bax, TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), Ang-2 (Angiopoetina-2), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), CML (N^e-(Carboximetil)lisina) e RAGEs (receptor de AGEs) foram efectuadas utilizando a técnica de *Western Blot*. A β -actina serviu como controlo interno da quantidade de proteína das amostras. A quantificação das bandas foi calculada com o programa Image Quant, Molecular Dynamics, EUA.

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

Após a activação das membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride membrane*, Bio-Rad, EUA) com metanol, as proteínas foram transferidas para estas no sistema de transferência (*Mini Trans-Blot*, Bio-Rad, EUA), a amperagem constante de $\pm 300\text{mA}$, em tampão *CAPS* (Tabela 1). As membranas foram bloqueadas com solução TBST-BSA a 5% (Tabela 1), à temperatura ambiente durante 2 horas e depois lavadas com TBST (Tabela 1). Após o bloqueio, as membranas incubaram *overnight* a 4°C com os respectivos anticorpos primários. Repetiu-se a lavagem com TBST e incubaram-se com os respectivos anticorpos secundários durante 2 horas, com agitação constante e à temperatura ambiente.

Após remoção do anticorpo secundário em excesso, as membranas foram incubadas durante aproximadamente 2 minutos com o substrato enzimático ECF (*Mouse ECF Western Blotting Reagent Pack*, Amersham Biosciences, RU) e reveladas através do leitor de fluorescência (Typhoon, GE Healthcare, EUA).

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

| |
|---|
| Tampão de lise |
| 25 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 20 mM NaF; 2mM Na ₃ VO ₄ ; 10 mM β-glicerofosfato; 2,5mM pirofosfato de sódio; 10mM PMSF e 20 µl cocktail inibidor de proteases por 0,5 g de tecido. |
| Tampão <i>Sample</i> |
| 62,5mM Tris-HCl, pH 6,6; 20% SDS 10%; 2,5 mL glicerol; 0,05% Bromefenol Blue |
| Tampão <i>Resolving</i> |
| 0,75mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 8,8 |
| Tampão <i>Stacking</i> |
| 0,25mM Tris-HCl; 0,2% SDS; pH 6,8 |
| Tampão <i>Running</i> |
| 125mM Tris-Base; 480mM Glicina; 9mM SDS; pH 8,8 |
| Tampão CAPS |
| 50mM CAS; 2% NaOH; pH 11;10% metanol |
| Tampão TBS |
| 250mM Tris;1,5mM NaCl; pH 7,6 |
| Tampão TBST |
| Solução TBS; 1% Tween-20 |

Parâmetros de stress oxidativo: anião superóxido (O⁻)

Após efectuadas crio-secções (com cerca de 7µm de espessura) do material conservado em meio de congelação, estas foram deixadas a secar durante cerca de 45 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se lavagens rápidas em tampão fosfato (PBS).

Os cortes foram então incubados com as sondas fluorescentes para O⁻ (*Dihydroethidium (hydroethidine) (DHE)*, *Molecular Probes, Invitrogen*, EUA) a uma concentração de 2 µM, durante 30 minutos, a 37°C e em ambiente humidificado. De seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e fixadas durante 10 minutos com paraformaldeído a 4%, à temperatura ambiente. As crio-secções foram novamente lavadas em PBS e procedeu-se à montagem das preparações colocando-se 50 µl de meio de montagem (*DPX, Panreac*, Espanha) sobre cada lâmina e cobrindo-se as crio-secções com lamelas, deixando secar no escuro. Por fim, selaram-se as lâminas com verniz e analisaram-se por microscopia de fluorescência.

Análise da estrutura renal

O tecido renal conservado em formol foi seccionado em cortes histológicos de 4µm.

Para avaliação da estrutura renal e identificação dos complexos de hidratos de carbono, foi aplicada a técnica do Ácido Periódico de *Schiff* (PAS).

Análise estatística

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

RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO GERAL

Não se verificaram diferenças significativas do peso corporal e do peso do rim (% peso corporal) entre os três grupos estudados (Tabela 2).

Os valores de glicemia (em jejum e duas horas após administração de glicose), da HbA_{1c} e dos parâmetros lipídicos (níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL) não foram significativamente diferentes entre os três grupos (Tabela 2).

Tabela 2 – Peso corporal (g), peso do rim (% peso corporal), glicemia (mg/dL) em jejum e duas horas após administração intraperitoneal de glicose (1,8g/kg), HbA_{1c} (%), triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL (mg/dL).

| | <i>W</i> | <i>WM</i> | <i>WMPir</i> |
|--------------------------------------|------------|------------|--------------|
| Peso corporal (g) | 429,6±17,2 | 439,5±17,6 | 432,6±11,9 |
| Peso do rim (% peso corporal) | 0,15±0,03 | 0,14±0,03 | 0,14±0,02 |
| Glicemia em jejum (mg/dL) | 63,3±1,0 | 62,9±1,5 | 64,3±2,0 |
| Glicemia às 2h (mg/dL) | 92,0±6,1 | 91,3±1,8 | 92,5±3,1 |
| HbA_{1c} (%) | 3,6±0,1 | 3,6±0,0 | 3,7±0,1 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 95,8±9,1 | 78,6±5,6 | 98,0±10,8 |
| Colesterol total (mg/dL) | 92,5±5,8 | 84,7±4,7 | 91,3±4,5 |
| Colesterol HDL (mg/dL) | 53,8±2,6 | 49,4±2,7 | 53,4±1,9 |

W (rato Wistar de 6 meses); WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

Os resultados são apresentados como média ± epm (n=12).

2. STRESS OXIDATIVO

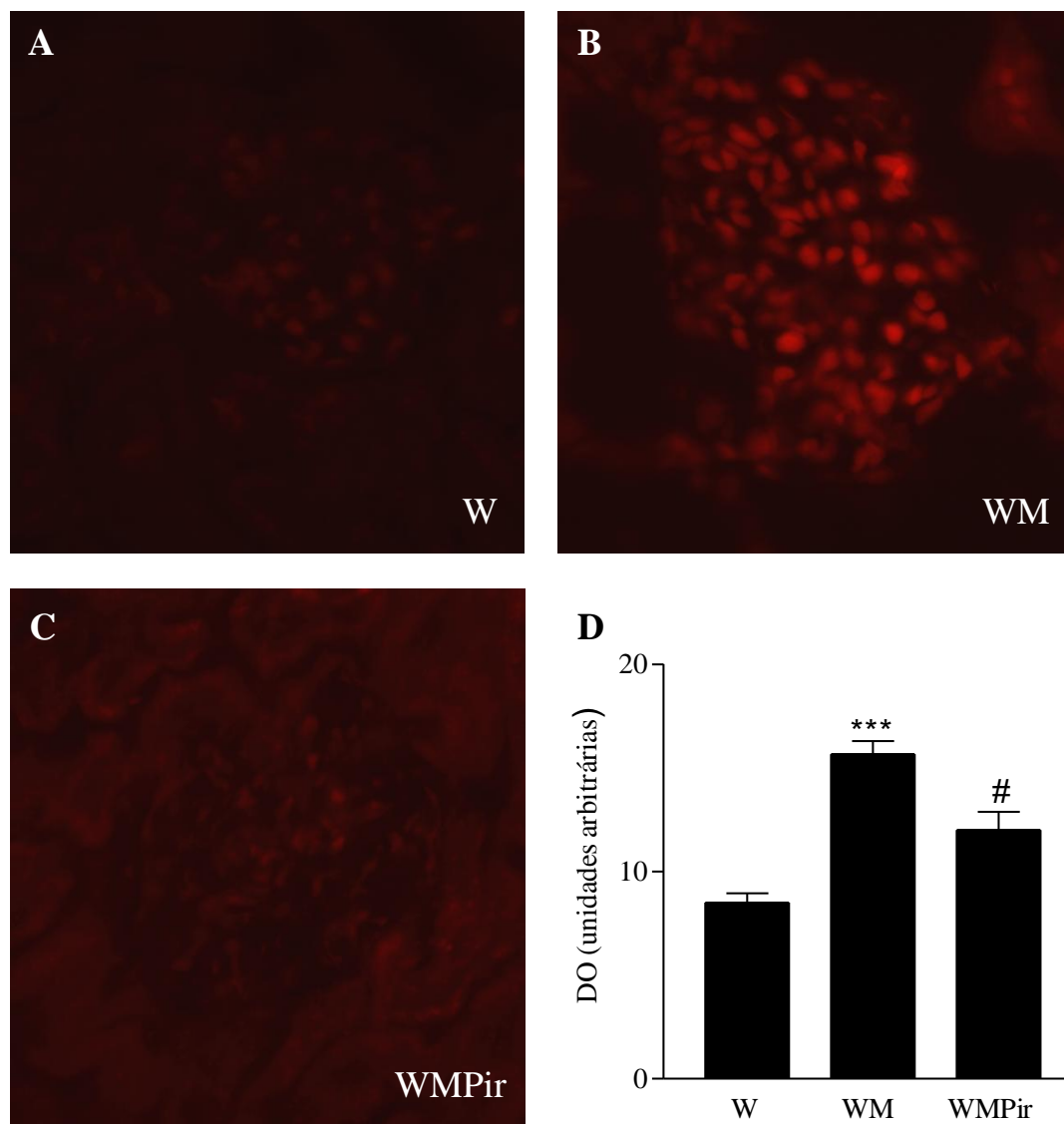


Figura 1 – Localização por imunofluorescência do anião superóxido (marcador de *stress* oxidativo) no tecido renal (400x).

1A – W (rato Wistar de 6 meses); **1B** – WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); **1C** – WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas); **1D** – Avaliação quantitativa da imunofluorescência do brometo de etídio nos diferentes grupos de animais.

Os resultados são apresentados como média \pm epm (n=3-4).

***p<0,001vsW; # p<0,05vsWM (teste T de *Student*).

O grupo tratado com MG (WM) apresentou níveis superiores de stress oxidativo, ostentando níveis superiores de fluorescência para a sonda do anião superóxido quando comparados com os controlos (W) ($p < 0,001$) (Figuras 1B e 1D). A administração de Piridoxamina (WMPir) resultou na diminuição parcial da intensidade de fluorescência em relação ao grupo WM ($p < 0,05$) (Figuras 1C e 1D).

3. GLICAÇÃO

Os animais tratados com MG (WM) apresentaram níveis superiores de CML (um produto de glicação avançada), quando comparados com os controlos (W) ($p < 0,05$). A administração de Piridoxamina (WMPir) resultou na diminuição dos níveis renais de CML em relação ao grupo WM ($p < 0,05$) (Figura 2).

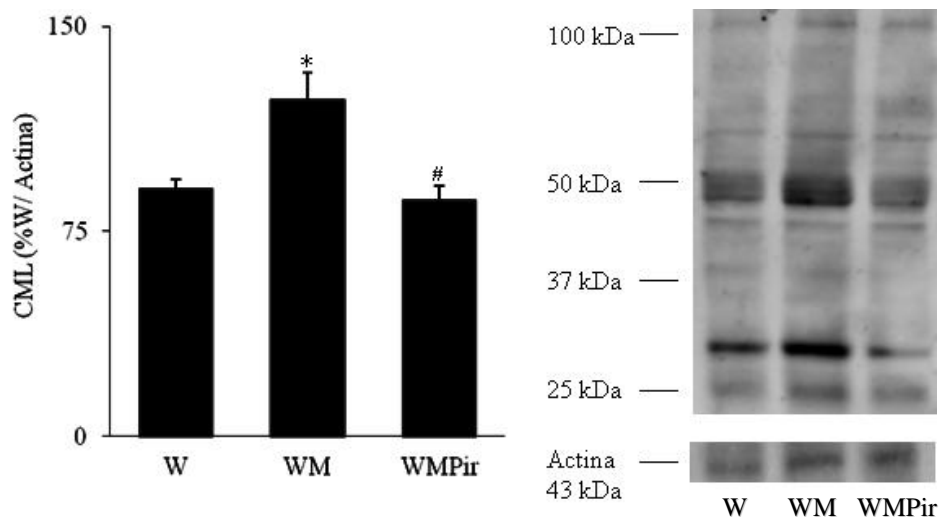


Figura 2 – AGEs (CML) no parênquima renal: quantificação de CML (em %) no tecido renal avaliado por *Western Blot*, com marcação específica para esta proteína e respectiva membrana.

W (rato Wistar de 6 meses); WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

Os resultados são apresentados como média \pm epm ($n=4$).

* $p < 0,05$ vs W; # $p < 0,05$ vs WM (teste T de *Student*).

A expressão de RAGEs (receptor de AGEs) no tecido renal dos animais tratados com MG (WM) foi superior à dos controlos ($p < 0,05$). Com o tratamento com PM (WMPir) houve uma diminuição desta expressão, embora não estatisticamente significativa (Figura 3).

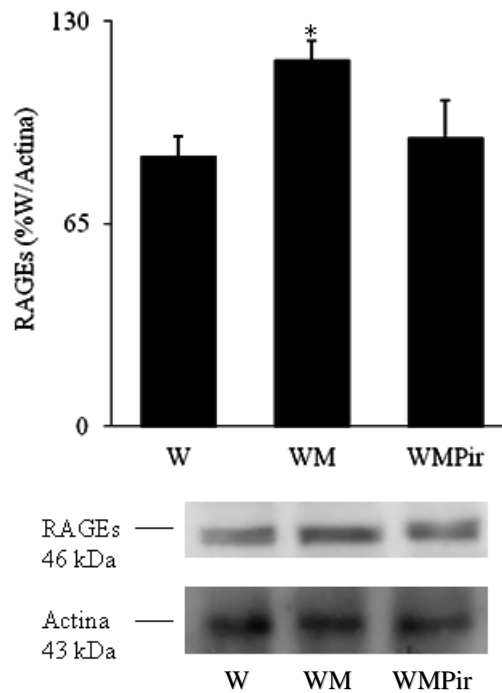


Figura 3 – RAGEs no parênquima renal: quantificação de RAGEs (em %) no tecido renal avaliada por *Western Blot*, com marcação específica para esta proteína e respectiva membrana.

W (rato Wistar de 6 meses); WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

Os resultados são apresentados como média \pm epm ($n=4$).

* $p < 0,05$ vs W (teste T de *Student*).

4. FIBROSE

Relativamente à análise do TGF- β (um factor pró-fibrótico), não existiram alterações estatisticamente significativas entre os três grupos no que respeita à forma precursora. (Figura 4A) Quanto à forma clivada observou-se um aumento estatisticamente significativo após a administração de MG (WM) ($p < 0,05$) e uma reversão relativamente ao grupo WM ($p < 0,05$) após administração de PM (WMPir) (Figura 4B).

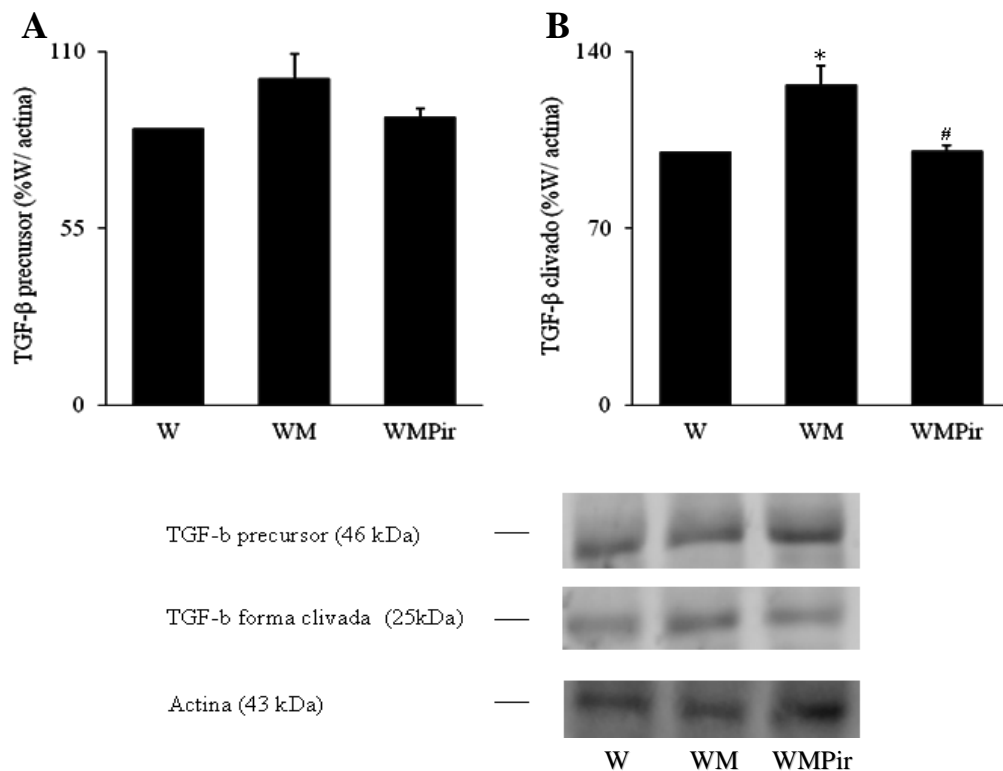


Figura 4 – TGF- β no parênquima renal: quantificação do TGF- β (em %) na forma precursora e forma clivada no tecido renal avaliada por *Western Blot*, com marcação específica para estas proteínas e respectivas membranas.

W (rato Wistar de 6 meses); WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

Os resultados são apresentados como média \pm epm (n=4).

* $p < 0,05$ vs W; # $p < 0,05$ vs WM (teste T de *Student*).

5. APOPTOSE

A razão Bcl-2/Bax (duas proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, respectivamente) encontra-se diminuída nos ratos que receberam MG (WM) ($p < 0,05$) relativamente aos controlos (W). Com a administração de PM (WMPir), observou-se uma diminuição da razão razão Bcl-2/Bax ($p < 0,05$), com recuperação dos níveis dos controlos (Figura 5).

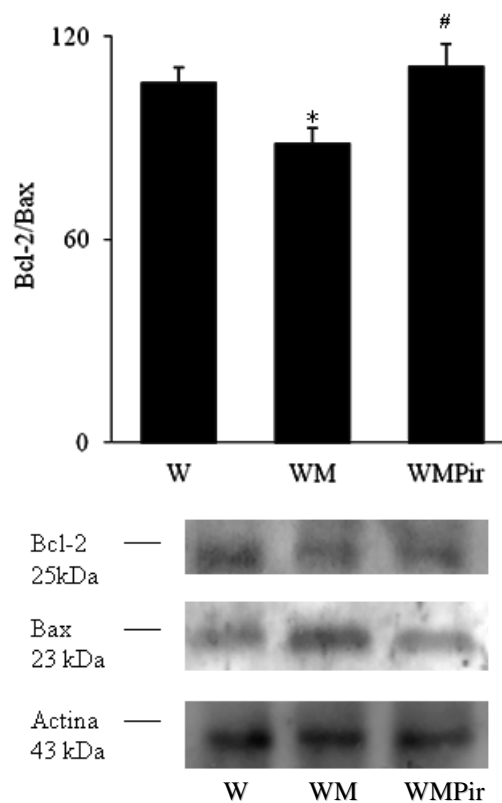


Figura 5 – Razão Bcl-2/Bax no parênquima renal: os níveis das proteínas foram avaliados por *Western Blot*, com marcação específica para as mesmas e respectivas membranas.

W (rato Wistar de 6 meses); WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

Os resultados são apresentados como média \pm epm ($n=4$).

* $p < 0,05$ vs W; # $p < 0,05$ vs WM (teste T de *Student*).

6. ANGIOGÊNESE

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos relativamente aos parâmetros de angiogênese (VEGF e Angiopoetina-2) (Figura 6).

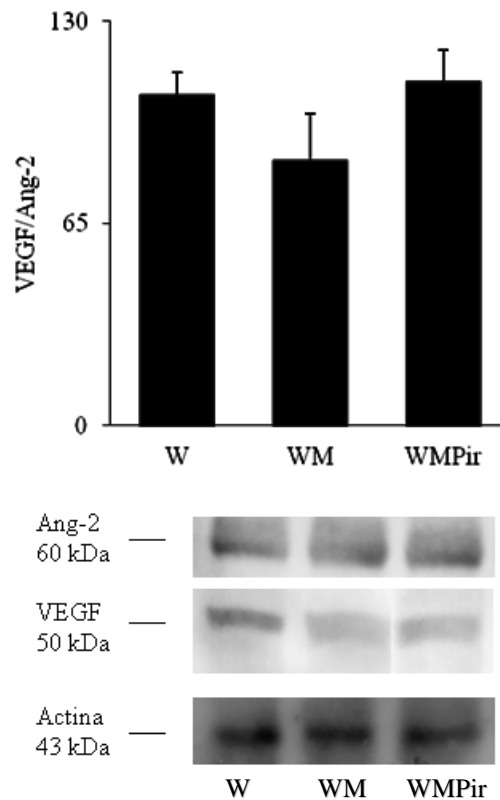


Figura 6 – Razão VEGF/Ang-2 no parênquima renal: os níveis das proteínas foram avaliados por *Western Blot*, com marcação específica para as mesmas e respectivas membranas.

W (rato Wistar de 6 meses); WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

Os resultados são apresentados como média \pm epm (n=4).

7. ANÁLISE DA ESTRUTURA RENAL

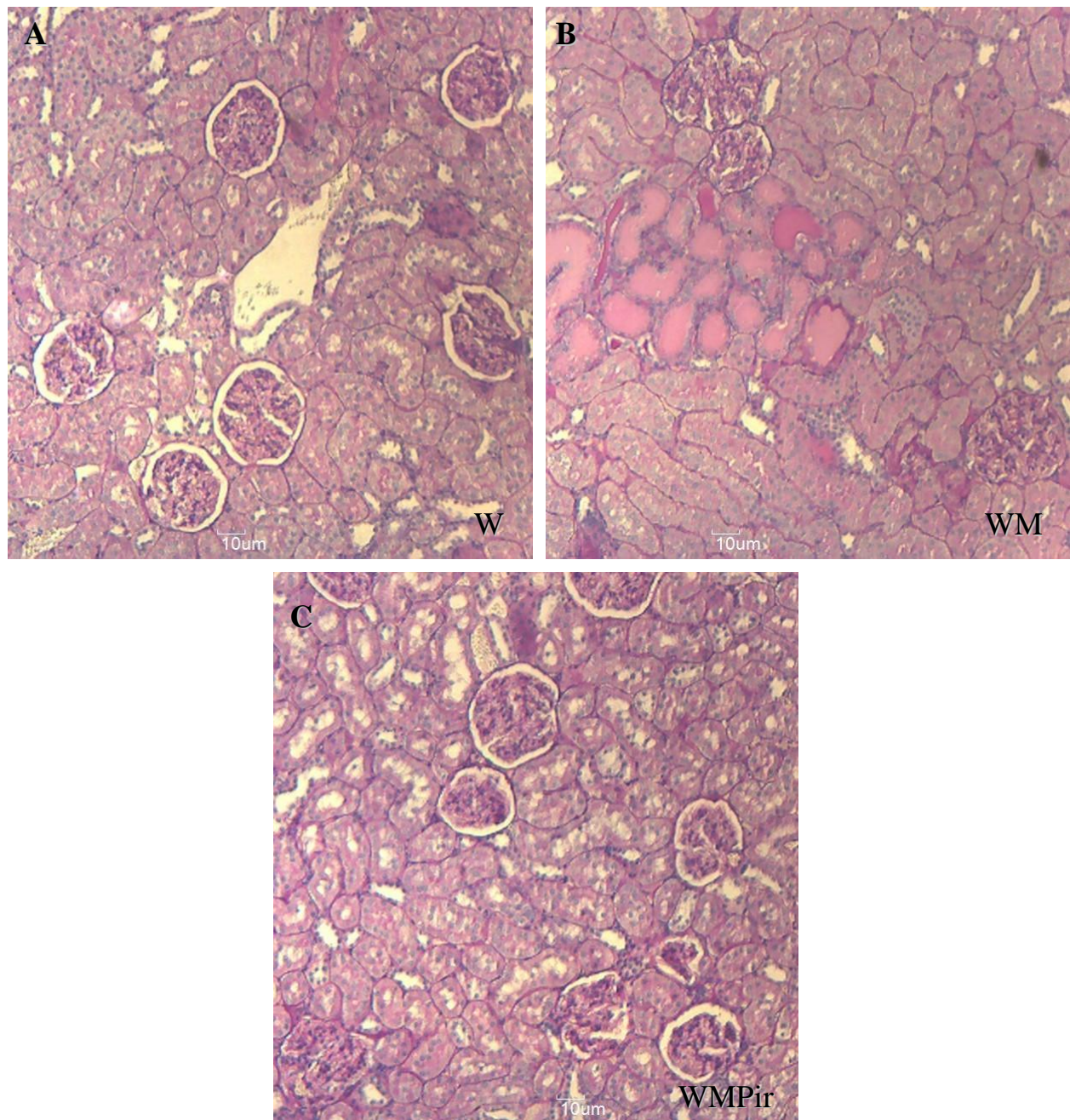


Figura 7 – Imagens histológicas do rim dos ratos W, WM e WMPir coradas pelo método do Ácido Periódico de *Schiff* (100x).

A - W (rato Wistar de 6 meses); **B** - WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); **C** - WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

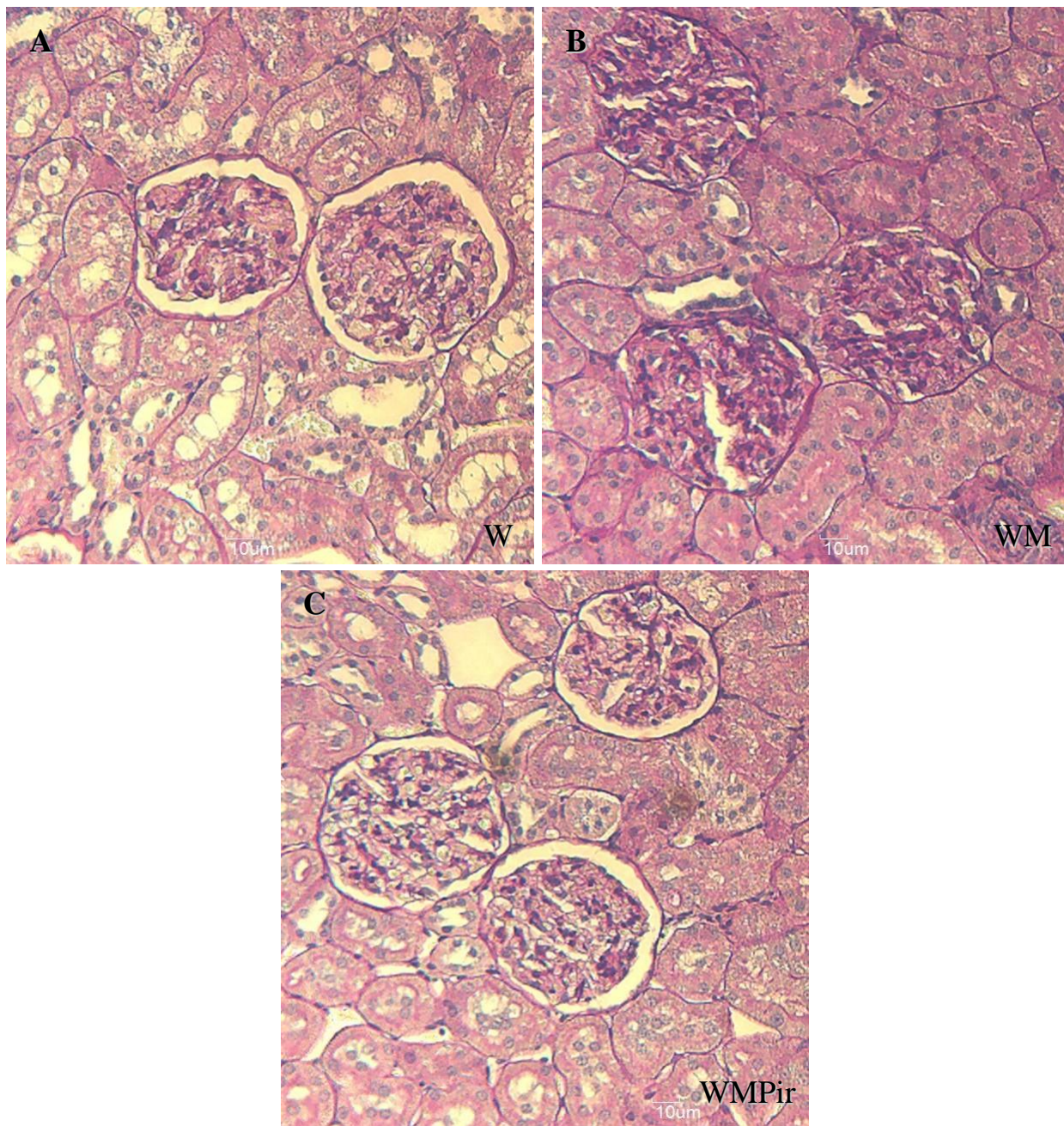


Figura 8 – Imagens histológicas do rim dos ratos W, WM e WMPir coradas pelo método do Ácido Periódico de *Schiff* (200x).

A - W (rato Wistar de 6 meses); **B** - WM (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas); **C** - WMPir (rato Wistar de 6 meses com administração de MG durante 8 semanas e PM durante 4 semanas).

A administração de MG induziu um ligeiro espessamento da membrana basal glomerular (MBG) e expansão da matriz mesangial com discreto depósito de substância hialina acelular, existindo nalguns glomérulos espessamento da cápsula de Bowman, o que constitui um padrão de glomerulosclerose difusa. Foi também possível visualizar espessamento da membrana basal dos túbulos com focos de pseudo-tiroidização e atrofia do epitélio tubular (Figuras 7B e 8B).

A administração da PM reverteu parcialmente as lesões (Figuras 7C e 8C).

DISCUSSÃO

A hiperglicémia induz lesão pelo aumento da produção de AGEs e activação das suas vias de sinalização, aumento do fluxo pela via do poliol e da hexosamina e activação da proteína cinase C, sendo a causa primária das lesões tecidulares ocorrentes na Diabetes.^{1,2} No rim, conduz a alterações do ciclo e crescimento celulares, a síntese excessiva e acumulação dos constituintes da matriz mesangial e ao aumento da permeabilidade vascular.^{4,6-8} Associadamente, existe um aumento da produção e actividade de factores que contribuem para a hiperfiltração, hiperpressão capilar e hipertrofia glomerulares, que caracterizam os estádios iniciais da nefropatia diabética.^{4,6-8,19,20} Os AGEs são produzidos em pequenas quantidades em condições fisiológicas, como o envelhecimento, mas os seus níveis encontram-se marcadamente aumentados intra e extracelularmente em situações de hiperglicémia, particularmente nos órgãos mais vascularizados.^{2,9} Os seus níveis são o resultado do balanço entre os AGEs formados endogenamente e os absorvidos (principalmente pela dieta) e os AGEs degradados e eliminados por sistemas especializados, como a glioxalase.^{1,9,10,12,21-23}

Os AGEs podem formar-se através da reacção de dicarbonilos reactivos com os grupos amina das proteínas, da auto-oxidação da glicose a glioxal, da decomposição dos produtos de *Amadori* a 3-deoxiglicosona ou da fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato e da dihidroxiacetona-fosfato a MG.^{1,2,9,14}

Os AGEs produzem lesões por vários mecanismos. Podem modificar os componentes da matriz extracelular com longo tempo de semi-vida por formação de *cross-linkings*, passando estes a interagir de forma anómala com os outros componentes da matriz e com receptores celulares; condicionar modificação das proteínas circulantes, hormonas e citocinas que se ligam a receptores de superfície nas células endoteliais, células mesangiais e macrófagos, levando à produção aumentada de radicais livres de oxigénio; interferir com a função de

proteínas intracelulares.^{1,2,7,9} A ligação ao receptor de AGEs (RAGE) condiciona ainda a activação do factor de transcrição NF-κB, levando a alterações na expressão génica, conduzindo a estados pró-oxidantes e pró-inflamatórios.^{1,2,8}

Os peptídeos resultantes da degradação dos AGEs podem ser eliminados pelo rim (o principal local de *clearance*) ou persistirem em circulação, com formação de novos AGEs.^{11,21} Devido ao facto do rim estar exposto, quer aos AGEs presentes a nível das células renais, quer aos que são excretados pela urina, torna-se particularmente susceptível à agressão por parte destes.^{8,23,24} A presença de AGEs no rim resulta da retenção, glicação *in situ* e reabsorção tubular.⁷ Além disso, os níveis de AGEs correlacionam-se de forma inversa com a função renal, sendo o rim um elemento de regulação fundamental no metabolismo destes compostos.^{10,11,25,26}

A administração exógena de MG leva ao aumento dos níveis de AGEs.^{10,21,22} O MG é um metabolito fisiológico formado pela fragmentação por glicoxidação de produtos *Amadori* na presença de iões metálicos, sendo também gerado durante a peroxidação lipídica e a glicólise. Reage com aminoácidos livres e resíduos de arginina e lisina para formar AGEs (nomeadamente CML (N^ε-(Carboximetil)lisina), um AGE estável), tendo um papel relevante na fisiopatologia das complicações diabéticas, encontrando-se aumentado no sangue dos indivíduos diabéticos.^{2,9,18,26} Assim, elegeu-se o MG como o composto ideal para simular lesões resultantes unicamente dos AGEs, eliminando outras variáveis.

Pelo facto de não termos observado diferenças significativas nos parâmetros gerais, nomeadamente aqueles relacionados com o peso e o metabolismo da glicose e dos lípidos, podemos inferir que as alterações encontradas a nível renal não se deveram a alterações do perfil metabólico, mas sim a efeitos directos do MG. A análise dos níveis de AGEs e RAGEs neste estudo é fundamental uma vez que as evidências apontam, como referimos

anteriormente, para que estes tenham um papel relevante na fisiopatologia das complicações da diabetes em vários órgãos, incluindo o rim.

A verificação de que a administração de MG induz aumento de AGEs (CML) e da expressão de RAGEs está em conformidade com outros resultados²¹ incluindo os previamente realizados no nosso laboratório.¹³

Estudos *in vitro* mostraram que o MG inibe a cadeia respiratória mitocondrial por promoção de *stress* oxidativo.²⁴ Nesse seguimento, procurámos analisar os níveis de *stress* oxidativo através de uma sonda, admitindo que níveis aumentados de *stress* oxidativo estão associados a níveis aumentados de AGEs,¹ o que igualmente verificámos neste estudo.

Até ao momento, as únicas armas terapêuticas para evitar a progressão da nefropatia diabética resumem-se ao controlo da glicémia e da dislipidémia, à restrição proteica e ao controlo da hipertensão arterial, particularmente com moduladores do sistema renina-angiotensina-aldosterona.^{5,6,27,28}

O desenvolvimento de fármacos para inibir a formação de AGEs e, por conseguinte, minorar as complicações diabéticas, representa um importante desafio para a indústria farmacêutica.²⁰

Embora possam não impedir por completo o processo subjacente às complicações diabéticas, os inibidores de AGEs podem retardar o seu desenvolvimento.⁷

Vários estudos em modelos animais mostraram que inibidores dos AGEs como a aminoguanidina,²⁹ o OPB-9195³⁰ e o ALT-711³¹ previnem parcialmente as alterações estruturais associadas à doença microvascular renal na Diabetes, sem influenciar o controlo glicémico.

Khalifah et al. (1999) descreveram uma nova classe de inibidores de AGEs pós-*Amadori*, designados *Amadorins*, que inibem a conversão de produtos de *Amadori* a AGEs, na ausência de excesso de açúcares livres (bases de *Schiff*), de que é exemplo a Piridoxamina, um intermediário natural da vitamina B6.¹⁶

O mecanismo de acção da PM *in vivo* não é totalmente conhecido, mas parece inibir a formação de AGEs por bloquear a conversão oxidativa dos produtos de *Amadori*, sequestrar os produtos carbonilados tóxicos resultantes da degradação da glicose e lípidos e tamponar as espécies reactivas de oxigénio, formando complexos estáveis com iões metálicos.^{17,18,32,33} A inibição da reacção de *Maillard* pela PM é devida, pelo menos parcialmente, à formação de um dímero PM-MG.³²

Estudos em ratos com Diabetes induzida por estreptozotocina (STZ), mostraram que para doses comparáveis, a PM é superior à aminoguanidina no atraso do desenvolvimento de lesão renal, apresentando baixa toxicidade e boa biodisponibilidade com um tempo de semi-vida plasmática superior.^{15,20,35} Outro estudo mostrou que todas as doses de PM (*Pyridorin*TM) foram bem toleradas sem efeitos adversos graves.²¹

Um ensaio clínico multicêntrico de fase II avaliou o uso da PM na doença renal terminal em doentes diabéticos. Revelou não existirem diferenças significativas entre a PM e o placebo relativamente aos efeitos adversos. Por outro lado, a PM reduziu significativamente o aumento de creatininémia, e a excreção de TGF- β 1 urinário e CML, não tendo existido alterações da albuminúria.³³ No modelo obeso não diabético *Zucker (fa/fa)*, a protecção da PM para a patologia renal é acompanhada pela inibição da formação de CML.³⁴

A verificação de que a PM diminui os níveis de AGEs vai ao encontro de resultados de outros estudos em modelo animal e em humanos, constatando a sua eficácia na diminuição das vias da glicação a nível renal,^{20,27,34,35} tal como a diminuição do *stress* oxidativo que observámos acompanha a diminuição da glicação.

A glicotoxicidade está relacionada com a disfunção celular que existe na nefropatia diabética pela acumulação de matriz extracelular no glomérulo e no interstício.^{4,8} A citocina pró-fibrótica TGF- β é o principal mediador deste fenómeno, sendo que a maioria dos factores hormonais e humorais característicos da Diabetes, nomeadamente os AGEs e ROS,

convergem para uma via comum que leva à estimulação da expressão de TGF- β e seus receptores no rim. Este induz hiperplasia e hipertrofia das células mesangiais, fibrose tubulointersticial e insuficiência renal.^{4,8,36} O TGF- β liga também a teoria metabólica à teoria hemodinâmica, uma vez que a hipertensão glomerular é um estímulo potente para a activação do sistema renal do TGF- β .³⁷

Os nossos resultados estão de acordo com estes dados, verificando-se um aumento do TGF- β (forma clivada) com a administração de MG. Este aumento é significativamente revertido (para os níveis iniciais) pela terapêutica com PM, afigurando-se esta como um bom agente para actuar sobre estímulos de glomerulosclerose, um dos principais marcos da nefropatia diabética.

As proteínas Bax (pró-apoptótica) e Bcl-2 (anti-apoptótica) participam de forma antagónica na via intrínseca do processo apoptótico. Enquanto a Bax promove o aumento da permeabilidade mitocondrial que culmina na libertação de moléculas favorecedoras da apoptose no citoplasma, a produção de proteínas da família da Bcl-2 é estimulada por factores de crescimento e outros sinais de sobrevivência. É o balanço final entre estímulos anti e pró-apoptóticos que leva ou não à iniciação da cascata das caspases e posterior activação da caspase-9.⁴ Verificámos uma diminuição da relação Bcl-2/Bax após administração de MG que pode favorecer a apoptose das células renais, e uma reversão deste efeito induzida pela PM, que pode favorecer a sobrevivência celular. Isto é demonstrado noutros estudos que revelam que o MG induz a apoptose de podócitos³⁸ e de células mesangiais,³⁹ por activar a via da MAP cinase-p38. A indução da apoptose e disfunção mesangial por parte dos AGEs contribui para a hiperfiltração glomerular, sendo importante numa fase precoce da doença.^{27,40}

O VEGF e a Ang-2 são citocinas que estimulam a angiogénese, a permeabilidade vascular e a vasodilatação dependente do endotélio.⁸ As vias de sinalização do VEGF reduzem a expressão de nefrina, uma proteína da membrana glomerular, que regula a passagem

transcapilar de proteínas plasmáticas e cuja diminuição acentua a proteinúria na Diabetes. O VEGF participa também no desenvolvimento de hiperfiltração e albuminúria.^{8,27}

Não foram verificadas alterações nem com o MG nem com a PM em relação aos marcadores de angiogénese, provavelmente devido ao facto do tratamento ter sido de curta duração.

Cerca de 1-2 anos após o aparecimento clínico da Diabetes, desenvolvem-se alterações morfológicas a nível renal.⁶ Estas alterações são idênticas na Diabetes mellitus tipo 1 e 2, assim como a sua história natural, e encontram-se em todos os compartimentos renais, sendo que o glomérulo é afectado mais precocemente e o compartimento tubulo-intersticial num estágio mais tardio.⁸ Na Diabetes humana, a nível do glomérulo existe espessamento da MBG, aumento da matriz mesangial (esclerose mesangial difusa) e nódulos de *Kimmelstiel-Wilson* (glomeruloesclerose nodular). No compartimento tubulo-intersticial são usualmente visualizados hipertrofia tubular, espessamento da membrana basal dos túbulos e fibrose do interstício e, menos frequentemente, imagens de pseudo-tiroidização. Ao nível das arteríolas aferentes e interlobulares pode existir espessamento e hialinização com apagamento do seu endotélio (esclerose arteriolar hialinizante).^{4,6,8}

Níveis aumentados de AGEs séricos mostraram prever a progressão das alterações histológicas na nefropatia diabética humana.^{7,41} As alterações encontradas no nosso estudo após a administração de MG são semelhantes, embora menos pronunciadas, provavelmente pelo facto da exposição ao MG ter sido de curta duração. Após administração da PM há uma diminuição das alterações morfológicas, sem reversão completa das mesmas, o que vai ao encontro do estudo realizado por Nakamura et al. (2007) que mostrou uma correcção parcial da hipertrofia glomerular, não existindo diminuição significativa do espessamento da MBG e volume mesangial.⁴²

CONCLUSÃO

Podemos concluir que o MG induz alterações nos parâmetros de glicação, fibrose, apoptose e *stress* oxidativo, alterações essas que são parcialmente reversíveis com a administração de PM. Como tal, a PM apresenta-se como um agente terapêutico direccionado nas nefropatias em que os AGEs tenham um papel determinante, particularmente na nefropatia diabética.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm qualquer conflito de interesse a reportar.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Raquel Seça, pela sua preciosa orientação, simpatia e constante disponibilidade e por me ter dado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Professora Doutora Cristina Sena, pelo apoio e conselhos.

Ao Doutor Paulo Matafome, pelo auxílio, monitorização e ensino.

Aos colegas e amigos de laboratório, Daniela, Teresa, Joana, Ana e Tiago, por toda a colaboração.

Ao Sr. Mário Simões pelo apoio, amizade e incentivo e à D. Hilda da Conceição pelo apoio na preparação das lâminas histológicas.

Aos meus amigos e colegas, pela companhia no trilho deste caminho.

À minha família, por tudo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, ao qual agradeço o apoio económico na concretização do trabalho prático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
- 2- Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(12):3071-109.
- 3- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 (Suppl 1):S64-71.
- 4- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th edition. Elsevier Saunders; 2010.
- 5- Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD, Canani LH. Diabetic nephropathy. *Diabetol. Metab Syndr*. 2009;1(1):10.
- 6- Longo DL, Fauci AS, Kasper JL, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18th edition. McGraw-Hill; 2012.
- 7- Daroux M, Prévost G, Maillard-Lefebvre H, Gaxatte C, D'Agati VD, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. *Diabetes Metab*. 2010;36 (1):1-10.
- 8- Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu FY, Chen S. A glimpse of various pathogenic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:395-423.
- 9- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006;114(6):597-605.
- 10- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE.. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1420-32.
- 11- Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93 (4):1143-52.

- 12- Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res.* 2010;59(2):147-56.
- 13- Sena CM, Matafome P, Crisóstomo J, Rodrigues L, Fernandes R, Pereira P, et al. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacol Res.* 2012;65(5):497-506.
- 14- Matafome P, Sena CM, Seïça R. Methylglyoxal, obesity, and diabetes. *Endocrine.* 2012; 41(1)1-166.
- 15- Booth AA, Khalifah RG, Hudson BG. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;7;220(1):113-9.
- 16- Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;257(2):251-8.
- 17- Voziyan PA, Khalifah RG, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, et al. Modification of proteins in vitro by physiological levels of glucose: pyridoxamine inhibits conversion of Amadori intermediate to advanced glycation end-products through binding of redox metal ions. *J Biol Chem.* 2003;278(47):46616-24.
- 18- Voziyan PA, Hudson BG. Pyridoxamine as a multifunctional pharmaceutical: targeting pathogenic glycation and oxidative damage. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(15):1671-81.
- 19- Chen S, Cohen MP, Ziyadeh FN. Amadori-glycated albumin in diabetic nephropathy: pathophysiologic connections. *Kidney Int Suppl.* 2000;77:S40-4.
- 20- Metz TO, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW.. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):41-9.
- 21- Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res.* 2004;53(2):131-42.

- 22- Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. O papel dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares da diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008;52/6: 940-950.
- 23- Pugliese G. Do advanced glycation end products contribute to the development of long-term diabetic complications? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008;18(7):457-60.
- 24- Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, Szweda LI, et al. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(2):F420-30.
- 25- Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8 Suppl 3):S254-8.
- 26- Vlassara H, Uribarri J. Glycooxidation and diabetic complications: modern lessons and a warning? *Rev Endocr Metab Disord.* 2004;5(3):181-8.
- 27- Sourris KC, Harcourt BE, Forbes JM. A new perspective on therapeutic inhibition of advanced glycation in diabetic microvascular complications: common downstream endpoints achieved through disparate therapeutic approaches? *Am J Nephrol.* 2009;30(4):323-35.
- 28- Bakris GL. Recognition, pathogenesis, and treatment of different stages of nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 2011;86(5):444-56.
- 29- Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes.* 1991;40(10):1328-34.
- 30- Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, et al. Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes.* 1997;46(5):895-9.

- 31- Peppas M, Brem H, Cai W, Zhang JG, Basgen J, Li Z, et al. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). *Am J Nephrol.* 2006;26(5):430-6.
- 32- Nagaraj RH, Sarkar P, Mally A, Biemel KM, Lederer MO, Padayatti PS. Effect of pyridoxamine on chemical modification of proteins by carbonyls in diabetic rats: characterization of a major product from the reaction of pyridoxamine and methylglyoxal. *Arch Biochem Biophys.* 2002;402(1):110-9.
- 33- Williams ME, Bolton WK, Khalifah RG, Degenhardt TP, Schotzinger RJ, McGill JB. Effects of pyridoxamine in combined phase 2 studies of patients with type 1 and type 2 diabetes and overt nephropathy. *Am J Nephrol.* 2007;27(6):605-14.
- 34- Alderson NL, Chachich ME, Youssef NN, Beattie RJ, Nachtigal M, Thorpe SR, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* 2003;63(6):2123-33.
- 35- Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD, Beattie RJ, Basgen JM, Steffes MW, et al. Pyridoxamine inhibits early renal disease and dyslipidemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Kidney Int.* 2002;61(3):939-50.
- 36- McCarty MF. Adjuvant strategies for prevention of glomerulosclerosis. *Med Hypotheses.* 2006;67(6):1277-96.
- 37- Ziyadeh FN, Sharma K. Overview: combating diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(5):1355-7.
- 38- Kim J, Sohn E, Kim CS, Kim JS. Renal podocyte apoptosis in Zucker diabetic fatty rats: involvement of methylglyoxal-induced oxidative DNA damage. *J Comp Pathol.* 2011;144(1):41-7.

- 39- Liu BF, Miyata S, Hirota Y, Higo S, Miyazaki H, Fukunaga M, et al. Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney Int.* 2003;63(3):947-57.
- 40- de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(5):993-1000.
- 41- Berg TJ, Bangstad HJ, Torjesen PA, Osterby R, Bucala R, Hanssen KF. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* 1997;46(6):661-5.
- 42- Nakamura S, Li H, Adijiang A, Pischetsrieder M, Niwa T. Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(8):2165-74.