

Dissertação de Mestrado

CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA E DE SEU RECEPTOR (RAGE) EM MODELO
ANIMAL DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Bianca de Moraes Fracasso

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES

CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA (AGES) E DE SEU RECEPTOR (RAGE) EM MODELO
ANIMAL DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO (IAM)

Autor: Bianca de Moraes Fracasso

Orientador: Dr. Michael Everton Andrades

*Dissertação submetida como requisito
para obtenção do grau de Mestre ao
Curso de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Área em Concentração:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares,
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul*

Porto Alegre

2016

Aos meus pais pela confiança e
por sempre apoiarem meus estudos,
independente das dificuldades diárias.

Agradecimentos

Aos meus pais, Janete e João Carlos, pelo amor, paciência e por acreditarem nas minhas decisões e por me ensinarem à importância da honestidade e da sabedoria. Ao meu irmão, Felipe, e aos demais familiares pela compreensão e carinho, por sempre estarem dispostos a me ajudar. Aos amigos que estão juntos nos momentos bons e ruins, obrigada pelo suporte e alegrias.

Aos professores do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular por todos os ensinamentos e pela oportunidade. Em destaque, agradeço a Prof^a. Gabriela Souza, pelo carinho, acolhimento e disponibilidade sempre.

Aos funcionários do Centro de pesquisa Experimental do HCPA e do PPG de Cardiologia da UFRGS, por toda a assistência e auxílio.

A todos os colegas do laboratório, pelo conhecimento compartilhado, discussões e contribuições. Um abraço especial para os nossos estagiários de iniciação científica que foram essenciais para muitas etapas desse trabalho. E com muita felicidade agradeço a amizade construída nesse período com as colegas e amigas: Daiane, Fernanda, Graziela, Mariana e Priscila, pelos conselhos e apoio.

A minha colega e amiga, Juliana, pela compreensão, pelas discussões de artigos, pelos dias e noites trabalhadas e também de comemorações, por estar sempre disponível a ajudar e escutar, e pelos momentos de alegrias.

Ao meu orientador, Prof. Michael Andrades, pelo apoio, competência e por ter acreditado no meu trabalho. Agradeço pelo incentivo, pelo ensino e por sempre estar presente, questionando e estimulando tanto o meu progresso como de outros alunos. Obrigada pela confiança e pela orientação.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	Infarto agudo do miocárdio (IAM)	11
2.1.1	Modelo experimental de IAM por etiologia isquêmica	12
2.2	Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).....	15
2.2.1	AGEs	15
2.2.2	Receptor para AGEs (RAGE).....	18
2.2.3	Metabolismo dos AGEs	21
2.2.4	Técnicas de detecção de AGEs.....	22
2.2.5	Doenças cardiovasculares (DCV) e AGEs.....	23
3	JUSTIFICATIVA.....	26
4	HIPÓTESE.....	26
5	OBJETIVO GERAL	27
5.1	Objetivos Específicos.....	27
6	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	28
7	ARTIGO ORIGINAL	36
8	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64

Lista de Abreviaturas

AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada (do Inglês *Advanced Glycation End-Products*)

CEL: N-ε-carboxietil-lisina

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CML: N-ε-carboximetil-lisina

cRAGE: Receptor solúvel clivado para AGE

DCV: Doença cardiovascular

DM: *Diabetes mellitus*

ECA: Enzima conversora da angiotensina

ELISA: Ensaio de imunoadsorção enzimática (do inglês *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*)

esRAGE: Receptor solúvel secretório endógeno para AGE

HMGB1: do inglês *High mobility group box 1*

IAM: Infarto agudo do miocárdio

IC: Insuficiência cardíaca

IL-6: Interleucina 6

JAK2: Proteína janus cinase 2

STAT3: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3

LAD: Descendente anterior esquerda (do inglês *left anterior descending*)

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MMP-9: Metaloproteinase de matriz 9

mRAGE: Receptor para AGE de membrana

mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

NF- κ B: Fator nuclear κ B

NT-proBNP: Peptídeo natriurético pró-B N-terminal

NYHA: do inglês *New York Heart Association*

PCR: Proteína C-reativa

PI3K: Fosfoinositídeo 3-cinase

PKB/Akt: Proteína cinase B

RAGE: Receptor para AGE

SUS: Sistema Único de Saúde

TGF- β 1: Fator transformador de crescimento β 1

TNF- α : Fator α de necrose tumoral

VCAM-1: Molécula de adesão celular-vascular-1

RESUMO

Uma vez que não está determinado o perfil de AGEs e RAGE em modelo animal de isquemia cardíaca, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a formação de AGEs e a produção de RAGE ao longo do processo de remodelamento cardíaco em ratos submetidos ao IAM. Para o estudo, ratos Wistar machos foram randomizados para receber cirurgia sham ou de indução do IAM. Os animais foram avaliados por ecocardiografia e realizadas coletas de sangue nos tempos: pré-cirurgia, 2, 30 e 120 dias pós-cirurgia. Ao final do seguimento, o coração foi coletado para avaliação de AGEs e RAGE. Não foram identificadas diferenças plasmáticas em AGEs fluorescentes, CML, CEL, aminas livres e níveis de proteínas carboniladas entre os grupos. Porém, foi identificada diminuição dos níveis de AGEs amarronzados no plasma e no miocárdio após 120 dias do infarto. Ainda, foi encontrada uma diminuição de CML e CEL no miocárdio ao final do seguimento. Entretanto, não foi identificada diferença nos níveis de RAGE. Assim, apesar de o IAM apresentar um componente inflamatório e oxidativo, os AGEs analisados não apresentaram o aumento esperado. Sugerimos que o modelo de IAM em ratos Wistar deve ser empregado com cautela em estudos que avaliem o eixo AGE-RAGE.

1 INTRODUÇÃO

Os Produtos finais de glicação avançada (AGE - do Inglês *Advanced Glycation End-Products*) são moléculas produzidas naturalmente no metabolismo humano. Entretanto, o seu excesso é prejudicial à saúde. O aumento dos AGEs é gerado devido aos maus hábitos de vida, idade e desenvolvimento de doenças. Poluição, tabagismo e o consumo excessivo de alimentos ricos em AGEs, como produtos processados, fritos e assados, são as principais fontes de AGEs exógenos (Vlassara 2002). Atualmente, já está claro que os AGEs se encontram em altos níveis no sangue e nos tecidos em muitas doenças crônicas, e que eles podem estar associados com piora de prognóstico na doença cardiovascular, renal e diabetes (Meerwaldt 2005, Vouillarmet 2013). No nosso organismo, os AGEs interferem na desestruturação de proteínas, podem causar alterações moleculares em biomoléculas, modificando a formação de colágeno, além de desencadearem cascatas pró-inflamatórias via receptor AGEs (RAGE) (Kislinger 1999, Zeng 2006, Andrades 2009).

As doenças cardiovasculares apresentam piora de prognóstico com a elevação dos níveis de AGEs e de RAGE (Zhang 2011, Ramasamy 2012, Raposeiras-Roubin 2012). Após 24h do processo isquêmico observou-se aumento de carboximetil lisina (CML), principal AGE estudado, em tecido cardíaco de pacientes infartados (Baidoshvili 2006). Além disso, já foi visto que independente dos níveis plasmáticos de AGEs, o sRAGE (forma solúvel do receptor) apresenta correlação positiva com NYHA e NT-pro BNP em pacientes com insuficiência cardíaca (IC) (Raposeiras-Roubin 2010). Contudo, ainda não é compreendido o envolvimento dessas moléculas na isquemia e no remodelamento cardíaco.

O eixo de sinalização AGE-RAGE-inflamação tem se mostrado importante no desenvolvimento e na progressão das doenças cardiovasculares. Porém, para aprofundar o conhecimento desse eixo, mais estudos mecanísticos em modelos pré-clínicos são necessários. O modelo da ligação permanente do ramo descendente da coronária esquerda para indução do IAM é empregado de forma disseminada na literatura científica, pois reproduz de forma semelhante às consequências do processo isquêmico (necrose, apoptose, remodelamento cardíaco, inflamação e estresse oxidativo) que ocorre no humano (Pfeffer 1979). Porém, há na literatura poucos trabalhos em animais que avaliam os AGEs nesse modelo de IAM (Cao 2014, Cao 2015).

Considerando que, até o momento, não há uma determinação do perfil de AGEs e RAGE em um modelo animal de isquemia cardíaca, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a formação de AGEs e a produção de RAGE ao longo do processo de remodelamento cardíaco em ratos submetidos ao IAM pelo modelo de ligação permanente do ramo descendente da coronária esquerda. Para isso foram avaliados os níveis de AGEs e da produção de RAGE em plasma e tecido cardíaco em modelo animal pós-IAM pelo período de 120 dias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infarto agudo do miocárdio (IAM)

Desde a década de 80 observa-se uma redução nas taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil, mas ainda assim elas representam uma das principais causas de internações no Sistema Único de Saúde (SUS) sendo o IAM a doença cardíaca com maior taxa de mortalidade (7%) em 2014 (Mansur 2001, DATASUS 2014). Em 2011-2012 ocorreram 84.855 internações pela doença no Brasil, com valor médio por internação estimado em R\$ 3.193,40, determinando um custo anual de R\$ 270 milhões (DATASUS 2012). Além dos custos diretamente relacionados com o evento isquêmico, há que se considerar o custo decorrente da perda de força de trabalho, do fornecimento da medicação, do tratamento das doenças decorrentes do IAM e, no pior dos cenários, do incalculável valor de vida perdida.

O IAM decorre da obstrução das artérias coronárias, diminuindo ou impedindo a chegada de nutrientes aos cardiomiócitos, desencadeando um desequilíbrio homeostático intracelular com maior produção de espécies reativas de oxigênio, prejudicando a função mitocondrial e dos sarcolemas, podendo levar à morte celular (McAlindon 2015). A perda de tecido viável leva à sobrecarga de trabalho do tecido sadio levando a reestruturação do arcabouço cardíaco, evento que envolve morte de cardiomiócitos, proliferação de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e dilatação ventricular. A esse processo é dado o nome de remodelamento ventricular e, apesar de ocorrer para suprir o débito cardíaco, ela está relacionada com o aumento nas taxas de mortalidade (Opie 2006, D'Elia 2015).

O remodelamento cardíaco pós-IAM é caracterizado pela expansão da cavidade ventricular na fase aguda, seguida da perda de tecido contrátil na fase de dilatação cavitária tardia (Hochman 1982). Nos primeiros dias, junto com apoptose e necrose de cardiomiócitos, ocorre uma desintegração do colágeno interfibrilar deixando o tecido mais propenso à dilatação e deformações, auxiliando na expansão (Whittaker 1991). Mais tardiamente, a ativação de vias humorais, como do sistema renina-angiotensina, contribui para essa reestruturação, aumentando a concentração de enzima conversora de angiotensina (ECA) e angiotensina na zona infartada. A liberação dessas proteínas interfere na sobrecarga de volume, levando ao crescimento da parede e, conseqüentemente, à hipertrofia do coração (Yamazaki 1999). Além disso, a presença de citocinas e o aumento da TGF- β 1 estimula a produção de fibroblastos e aumenta a síntese e deposição de colágeno no interstício e no espaço perivascular, contribuindo para o comprometimento da função cardíaca (Dean 2005). Essas modificações histopatológicas e inflamatórias no miocárdio induzem o coração a sua progressiva falência, podendo com o tempo levar o paciente a desenvolver a síndrome da insuficiência cardíaca (IC), via final da maioria das doenças cardiovasculares (Cohn 2000, Opie 2006).

2.1.1 Modelo experimental de IAM por etiologia isquêmica

A utilização de modelos experimentais tem fornecido informações importantes sobre a morfologia, bioquímica, eletrofisiologia e propriedades mecânicas do miocárdio infartado. Um modelo que tem sido empregado de forma bastante disseminada na literatura científica é o da ligação permanente do ramo descendente da coronária esquerda (LAD – do inglês *left anterior descending*)

(Fishbein 1978). Ele foi descrito pela primeira vez por Heimbürger em 1946 (Heimbürger 1946), e com o passar dos anos foi modificada por outros pesquisadores até a técnica atual (Johns 1954, Kaufman 1959, Tucci 2011). Essa metodologia gera uma área isquêmica no ventrículo esquerdo, que apresenta um processo inflamatório o qual vem a ser substituído por fibrose (Figura 1).

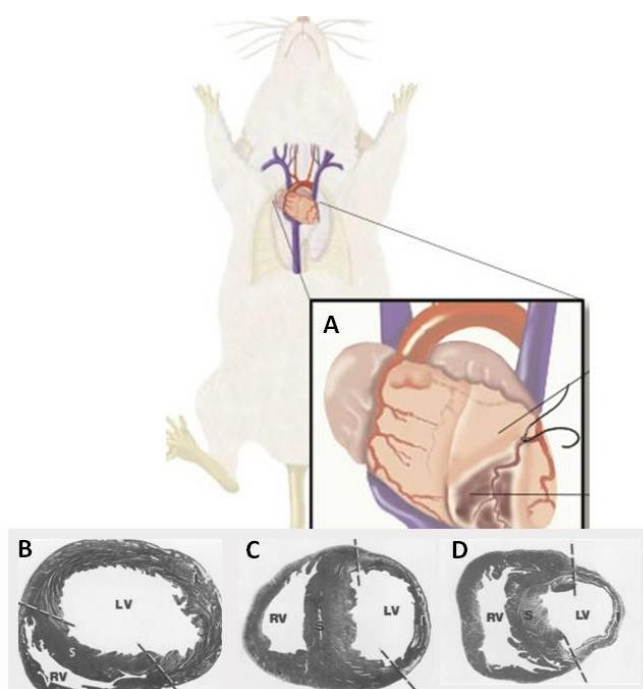


Figura 1 Modelo esquemático do IAM induzido por ligadura da coronária descendente anterior esquerda. A figura apresenta uma visão transtorácica do coração, que é acessado pelo afastamento da 2ª e 3ª costelas esquerdas. Em (A) é possível ver a ligadura com a área de infarto. Cortes transversais de coração de rato 1 dia (B), 4 dias (C) e 21 dias (D) após o IAM. Percebe-se o afinamento das paredes na região infartada, delimitada pelas linhas tracejadas. LV – ventrículo esquerdo. RV – ventrículo direito. Adaptado de (Fishbein 1978)

O método possui muitas vantagens, apesar de certas características que podem dificultar seu manuseio. Entre elas pode se dizer que é uma cirurgia rápida e que gera um modelo representativo que apresenta todas as etapas do infarto, como necrose, cicatrização e remodelamento do coração. As alterações morfológicas e funcionais, como o processo do remodelamento, as alterações

hemodinâmicas e as disfunções sistólica e diastólica, são bastante semelhantes ao processo que ocorre em humanos (Zornoff 2009).

A relevância deste modelo é evidenciada por trabalhos pré-clínicos que contribuíram para a caracterização de drogas como captopril e losartana no tratamento de pacientes pós-IAM (Fishbein 1978, Pfeffer 1979, Pfeffer 1985, Ahmed 2004). Isso mostra que ele é um modelo útil no estabelecimento de terapias experimentais antes que possam ser transpostas para humanos, e para conhecer novas vias de sinalização, auxiliando em um melhor entendimento do processo do infarto e de sua progressão.

Esta cirurgia, apesar de simples pode causar alguns efeitos colaterais, como pneumotórax, depressão respiratória, edema agudo de pulmão, taquicardia ventricular sustentada e fibrilação ventricular, que contribuem para a mortalidade do modelo (Pfeffer 1979, Zornoff 2009). Além disso, outro ponto a ser destacado é a alta variabilidade do tamanho da lesão gerada, que varia de 5 a 60% da circunferência do ventrículo esquerdo (Pfeffer 1985, Antonio 2009). Sabendo que o tamanho do infarto define outros desfechos, como mortalidade, fração de ejeção, resposta às terapias e processo inflamatório, essa é uma limitação importante desta técnica (Pfeffer 1979, Zornoff 2009). Essa variação ocorre devido à incapacidade de se ocluir a coronária no mesmo local em todos os animais, por variações anatômicas tanto do coração como de sua posição no tórax, assim como pela experiência do pesquisador (Zornoff 2009).

Os modelos animais são de extrema importância, tanto no desenvolvimento da pesquisa básica como para evolução da pesquisa clínica. Contudo, é essencial escolher um modelo apropriado para melhor compreensão da patologia em questão. O modelo da LAD está bem estabelecido quanto às

características básicas do IAM e de sua progressão, mas já foi observado que em certos estudos ele não é o modelo ideal. O uso de cães não é indicado nesse modelo, pois estes animais possuem uma vascularização colateral que supre a região em risco de infarto, diferente de suínos, ovelhas e ratos que apresentam uma vascularização similar à humana (Houser, 2012). Além da espécie utilizada, o método aplicado também influencia os resultados. Em modelo de isquemia pela LAD foi encontrado que o aumento da expressão de HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*) beneficiava a regeneração cardíaca e a angiogênese (Kitahara 2008). Porém, quando analisada a interferência da HMGB1 no processo isquêmico pelo modelo de isquemia-reperfusão (IR), foi visto que o uso de um antagonista da HMGB1 reduziu injúria pela IR e melhorou a função do ventrículo esquerdo, sendo verificado um efeito contrário do que observado no estudo anterior (Andrassy 2008). Isso mostra que apesar da semelhança do princípio, os mecanismos patológicos dos dois modelos são diferentes. Por isso, antes da escolha da técnica, o modelo precisa ser estudado para comparar o seus dados ao que se tem em humanos.

2.2 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)

2.2.1 AGEs

Produtos finais de glicação avançada (AGE - do Inglês *Advanced Glycation End-Products*) são continuamente gerados pelos organismos saudáveis, principalmente no metabolismo energético. Em condições pró-inflamatórias ou hiperglicêmicas a produção de AGEs é estimulada, aumentando a sua presença no plasma e tecidos (Anderson 1999, Lapolla 2003). Além das fontes endógenas, os AGEs podem ser adquiridos na dieta, em alimentos assados ou fritos

(Vlassara 2002). Os tipos de AGEs exógenos variam de acordo com o alimento e influenciam no tipo de molécula de AGE que estará presente no nosso metabolismo (Luevano-Contreras 2010).

Os primeiros AGEs foram identificados nos alimentos e por muitos anos estudou-se suas características e funções no processo de preparação dos mesmos. Descobriu-se que sua formação é decorrente de uma reação não-enzimática que foi denominada como Reação de Maillard, também conhecido como processo de “amarronzamento”, pois gera uma cor marrom-amarelada no final da reação (Hodge 1953).

A glicação inicia com a formação de uma base de Schiff num processo de condensação entre uma amina primária (presente nas proteínas) com grupamentos carbonil (Figura 2). Esses grupamentos carbonil podem ser aqueles encontrados na glicose ou em pequenos aldeídos reativos, derivados do estresse oxidativo sobre lipídeos ou da via glicolítica (p.ex metilglioxal) (Hartog 2007). Após rearranjos moleculares, há a formação de uma nova estrutura mais estável, chamada produto de Amadori, sendo favorecida em pH alcalino e na presença de íons fosfato. A partir dessa etapa o produto de Amadori pode seguir uma das duas vias principais de formação de AGEs. Na primeira, há a formação de rearranjos irreversíveis entre produtos de Amadori, que ocorre por vias oxidativas ou não. Na segunda, há a condensação entre resíduos de lisina, cisteína e arginina com dicarbonilas, que podem ser gerados por enolização dos produtos de Amadori já formados (Vistoli 2013).

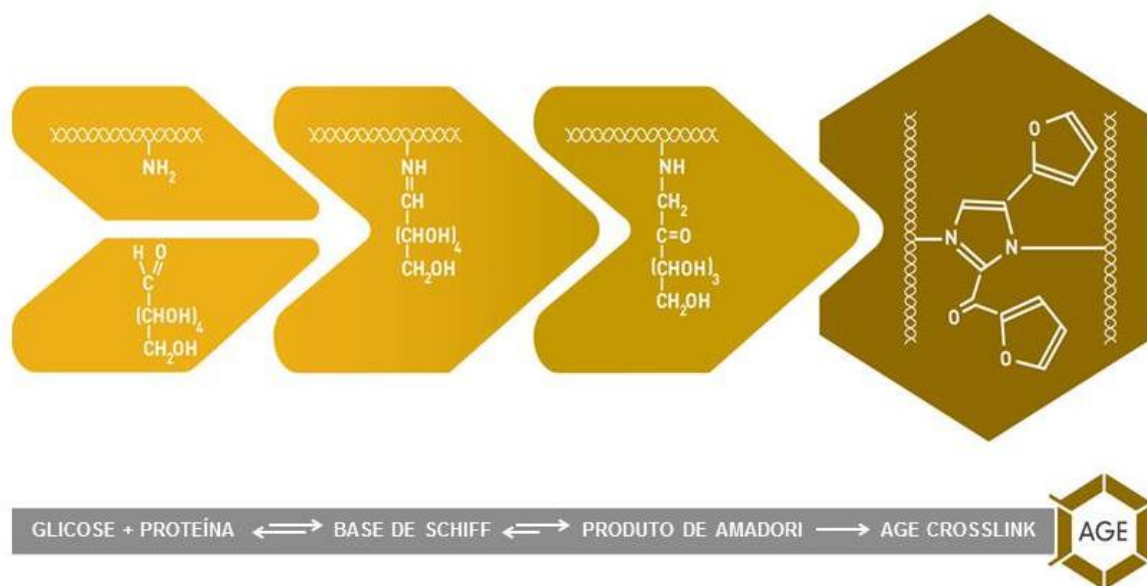


Figura 2 Mecanismo básico de formação de AGEs no organismo. A reação de aldeídos reativos (ex. glicose) com aminas primárias presentes em proteínas forma estruturas conhecidas como Base de Schiff, através de uma reação reversível. Arranjos intramoleculares conduzem a formação de compostos mais estáveis, conhecidos como Produtos de Amadori. Esses produtos podem sofrer a ação de radicais livres, formando os AGEs. Os AGEs tem capacidade sinalizadora, mas também são capazes de fazer ligações cruzadas entre proteínas. Adaptado de (Hartog 2007)

A sigla AGE não determina uma molécula específica e sim um grupo heterogêneo de moléculas que surgem pelos mecanismos descritos acima. Eles podem ser divididos em três grupos: 1) com ligação cruzada (*cross-linking*) e fluorescência; 2) com ligação cruzada sem fluorescência; e 3) sem ligação cruzada (Ashraf 2015). Dentre essas moléculas, algumas com importante função biológica já foram descritas, como a N-ε-carboximetil-lisina (CML) e a pentosidina (Nagai 2002). A CML e seus adutos estão entre os principais ligantes de receptor de AGEs (RAGE), promovendo no ambiente intracelular a ativação de vias de sinalização como NF-κB e aumento da expressão de VCAM-1 (Kislinger 1999), que é responsável pela adesão de leucócitos no endotélio vascular, tendo um papel importante na aterosclerose (Liu 2013). A CML é o AGE melhor caracterizado e o principal produto da clivagem oxidativa de produtos de Amadori *in vivo*. Por ser um dos principais produtos de modificação oxidativa de proteínas

glicadas, foi sugerido como marcador geral de danos a proteínas por glicação (Ahmed 2007).

O dano mediado pelos AGEs pode acontecer por dois mecanismos (Luevano-Contreras 2010): um independente de receptor, que decorre da modificação covalente das biomoléculas envolvidas, desestruturando proteínas, alterando meia-vida e função (Zeng 2006, Andrades 2009); outro dependente da ativação do RAGE, desencadeando vias de sinalizações pró-inflamatórias e oxidativas (Kislinger 1999). Sabe-se que mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6 e PCR, podem ser induzidos via receptor RAGE (Nedic 2013). Ao mesmo tempo, a formação de ligações cruzadas de AGE com o colágeno interfere no enrijecimento vascular e causa complicações circulatórias (Sell 2012). Além disso, já foi demonstrado que a ligação da albumina com AGE altera a afinidade da molécula original com hormônios, vitaminas, fármacos e íons, prejudicando no transporte e manejo desses compostos (Vetter 2011).

2.2.2 Receptor para AGEs (RAGE)

Alguns receptores para AGEs já foram identificados, mas o RAGE (do Inglês, *Receptor for Advanced Glycation End-Products*) é o melhor caracterizado. O RAGE pode apresentar-se em dois formatos principais: RAGE de membrana (mRAGE) e RAGE solúvel (sRAGE), sendo o SRAGE subdivido em isoforma clivada (cRAGE) e isoforma secretória (esRAGE). Enquanto que a primeira isoforma é capaz de disparar a sinalização intracelular, as duas últimas isoformas são solúveis e circulantes, e ao ligarem-se aos AGEs acabam impedindo que os mesmos se liguem no receptor de membrana (Yan 2010, Kierdorf 2013).

O mRAGE é constituído por 3 domínios extracelulares: V, C1 e C2, e um domínio C-terminal citosólico. O domínio do tipo-V é o principal local de ligação do ligante enquanto que o domínio intracelular é o responsável pela transdução de sinal. Para ajudar na interação com as moléculas ligantes, o mRAGE pode ter formas dímeras e multímeras (Neeper 1992). O cRAGE surge a partir da derivação do mRAGE por meio de mecanismos de clivagem da superfície celular que podem ser causados por metaloproteinasas de matriz (MMPs), e é composto pelos domínios V, C1 e C2 (Zhang 2008) (Figura 3).

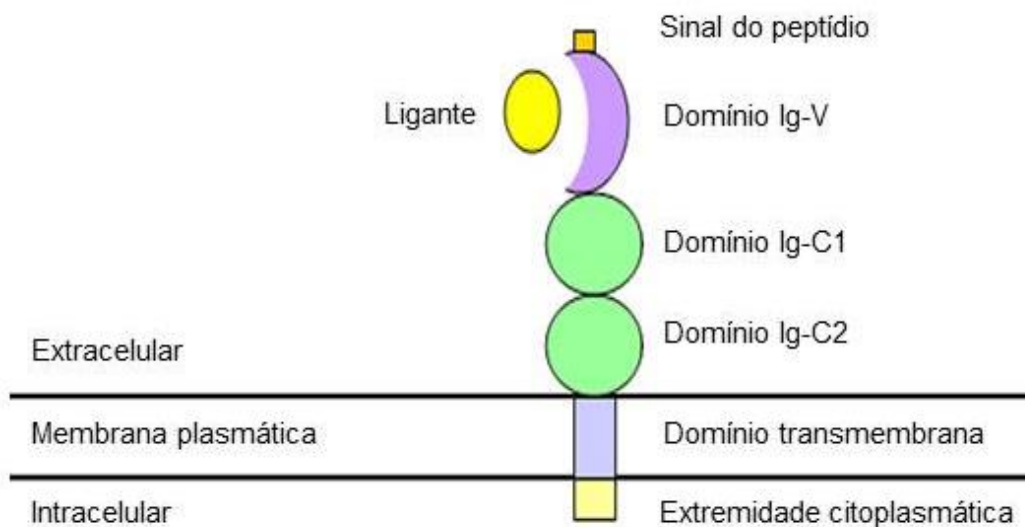


Figura 3 Modelo hipotético da estrutura do receptor de membrana RAGE. O primeiro domínio da porção extracelular, conhecido como V, é o principal local de interação com os ligantes, seguido dos domínios C1 e C2. A porção intracelular é composta apenas pelo domínio citoplasmático responsável pela transdução do sinal. Adaptado de Cohen, 2013.

O esRAGE ocorre por *splicing* alternativo do gene do RAGE de membrana e sua estrutura se caracteriza pela adição de 16 aminoácidos na região terminal C2 (Yonekura 2003). As isorformas solúveis tem o domínio extracelular, mas não apresenta os domínios transmembranares e citoplasmáticos, sendo incapazes de

produzir sinalização intracelular (Yonekura 2003, Zhang 2008, Kalea 2009). Esta característica é o que faz eles serem antagonistas do receptor de membrana, pois se ligam aos AGEs circulantes impedindo a sua interação com o mRAGE (Yonekura 2003).

O mRAGE é expresso em vários tecidos, como o renal, o hepático, o cardíaco, o pulmonar e o muscular (Neeper 1992, Brett 1993). A sua ativação, através da ligação de AGEs, induz estresse oxidativo e cascatas de inflamação, estando assim fortemente relacionado a processos inflamatórios e degenerativos (Wautier 2001, Harja 2008, Mahali 2011). Além dos AGEs, outras moléculas como S100, proteína precursora β -amilóide e HMGB1, também se ligam ao RAGE (Cohen 2013). A ativação do RAGE por seus agonistas influencia de forma complexa diversas vias de sinalização, incluindo vias que participam da viabilidade e da estrutura celular. O RAGE é capaz de ativar a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via PI3K-PKB, estímulos que acionam o complexo NF- κ B que participa do controle da tradução de genes ligados à resposta imune e inflamatória em diversos tipos celulares (Xie 2013). Em cultura celular, já foi observado que a ativação da autofagia pela inibição via PI3K/Akt/mTOR por meio do eixo AGE-RAGE aumenta a viabilidade celular em cardiomiócitos (Hou 2014). Contrariando esses achados, o eixo AGE-RAGE promoveu piora funcional e mudança morfológica em células cardíacas quando realizada co-cultura com células dendríticas, indicando que a maturação dessas células prejudicam os cardiomiócitos através da via RAGE (Cao 2014). Com isso é visto que o RAGE influencia muitas cascatas de sinalização, interferindo em diversos efeitos moleculares. Entretanto, devido à complexidade destas ações,

ainda não se tem um conhecimento claro de como ele desempenha suas funções e qual a magnitude destas interferências nas vias celulares.

2.2.3 Metabolismo dos AGEs

O metabolismo dos AGEs ainda não é bem compreendido. Poucos trabalhos exploram sua absorção, transporte e excreção no organismo vivo. Sabe-se que a metabolização varia conforme a estrutura da molécula e que este fator irá influenciar na excreção e no seu tempo de liberação do organismo (Luevano-Contreras 2010).

A pentosidina, quando injetada em ratos saudáveis, possui rápida eliminação por filtração glomerular, apresentando um pico de concentração no rim após 1h e sendo eliminada do tecido renal em 24h. Além disso, no mesmo trabalho foi sugerido que a pentosidina livre (e, possivelmente, outros AGEs) é filtrada pelo glomérulo renal e reabsorvida nos túbulos proximais onde será degradada ou modificada e, por fim, excretada na urina (Miyata 1998). Entretanto, diferente do estudo anterior, já se tem descrito que os AGEs endógenos são filtrados pelo glomérulo renal e apenas os AGEs na forma de peptídeos são reabsorvidos nos túbulos proximais, sendo os AGEs livres excretados (Gugliucci 1996, Nedic 2013, Gugliucci 2014).

O desenvolvimento de doença renal interfere no processo de excreção de AGEs, ocorrendo tanto o aumento dos AGEs plasmáticos, pelo processo inflamatório e oxidante da doença, como pela diminuição da depuração plasmática (Nedic 2013, Gugliucci 2014). Contudo, a metabolização e excreção de AGEs não se difere apenas pela presença de uma enfermidade. O tipo de dieta ingerida e a diferença na estrutura dos AGEs interferem na formação dos

mesmos e nas quantidades que serão excretadas no organismos sadio. Após iniciar uma dieta livre de AGEs, a excreção de pentosidina decai em 40%, enquanto que da pirralina e da fructoselisina (outros tipos de Ages) decaem 90%. Alguns tipos de AGEs são simplesmente adquiridos na dieta e excretados. Outros, como no caso da pentosidina, têm seus níveis influenciados pela dieta, mas também é observado seu aumento devido à formação endógena (Forster 2005). Portanto, espera-se que condições de saúde, idade e composição da dieta, interfiram na produção de AGEs e reflitam na sua presença no plasma, urina e rins (Forster 2005, Luevano-Contreras 2010, Nedic 2013).

2.2.4 Técnicas de detecção de AGEs

Variados tipos de técnicas são utilizadas para a detecção de AGEs e seus precursores. Entretanto, ainda não existe uma técnica padrão ouro de mensuração dessas estruturas. As principais técnicas utilizadas nos trabalhos estão relacionadas com procedimentos de imunoensaio e de espectroscopia (Ashraf 2015).

O imunoensaio é caracterizado pelo uso de anticorpos específicos na detecção e quantificação de moléculas. Com esses anticorpos podem ser realizadas as técnicas de imunohistoquímica, ELISA, western blot e dot blot. Essas metodologias já são utilizadas há anos (Ikeda 1996, Nagai 2008) e são frequentemente aplicadas tanto na pesquisa, para detecção de AGEs e do RAGE, como na rotina clínica na detecção de hemoglobina glicada, um precursor de AGEs (Diamanti-Kandarakis 2007, Ashraf 2015, Cao 2015, McDonough 2015). Contudo, com exceção de alguns testes clínicos que possuem seus anticorpos bem caracterizados, na pesquisa básica existem anticorpos gerados contra

diferentes epítomos e que são chamados genericamente de anti-AGEs. As características distintas desses anticorpos fazem com o que os dados gerados, muitas vezes, não sejam comparáveis, interferindo na validade desses resultados (Ashraf 2015).

Um segundo campo de técnicas explorado para detecção de AGEs é a espectroscopia. Com ela, é possível realizar técnicas simples como a quantificação de fluorescência de absorbância (Valencia 2004) e, de maneira mais refinada, pode ser associada à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ou não ao espectrômetro de massas (Scheijen 2009, Ashraf 2015).

A fluorescência e absorbância são frequentemente empregadas, mas tem como principal limitação a detecção apenas de AGEs fluorescentes e daqueles com cor amarelo-amarronzada, respectivamente (Monnier 1984, Zhang 2015). Além disso, outra desvantagem destas duas metodologias é a falta de especificidade das estruturas quantificadas (Ashraf 2015). As técnicas com CLAE detectam todos os AGEs e também seus precursores. Especula-se que a cromatografia líquida associada ao espectrofotômetro de massas seria a técnica padrão ouro para detecção dos AGEs (Rabbani 2009). Esse último é o método de detecção com maior acurácia, amplamente utilizado na mensuração de estruturas em sistemas complexos, mas tem a limitação de ser um equipamento caro e pouco acessível na pesquisa (Tsikas 2001).

2.2.5 Doenças cardiovasculares (DCV) e AGEs

Na maioria dos casos, as DCV estão associadas a outras doenças crônicas. A presença da doença renal ou da *diabetes mellitus* (DM) tem relação

com piora de prognóstico em pacientes cardiopatas, sendo também um fator de risco para o desenvolvimento de DCV (Lekawanvijit 2014). O mecanismo envolvido no desenvolvimento de DCV por DM engloba inflamação, produção de radicais livres e o aumento da produção de AGEs, decorrente da hiperglicemia crônica. Acredita-se que o aumento da ativação do eixo AGE-RAGE desencadeia vias de estresse oxidativo e inflamação que irão causar dano nos vasos e no miocárdio em pacientes diabéticos (Bodiga 2014).

Apesar da relação dos AGEs com as doenças renais e com o DM estar sedimentada (Meerwaldt 2005, Vouillarmet 2013), ainda se buscam informações que estabeleçam o papel dos AGEs no processo de desenvolvimento e evolução das doenças cardíacas. Sabe-se que os níveis sanguíneos e teciduais de AGEs estão aumentados após o IAM em humanos e a sua concentração é preditora independente de desenvolvimento de IC (Baidoshvili 2006, Raposeiras-Roubin 2012). Além disso, altas concentrações plasmáticas de CML e pentosidina foram associados a maior chance de hospitalização, sendo que apenas a CML teve associação com um maior risco de mortalidade em paciente com IC (Willemsen 2012).

Já se sabe que a glicação das proteínas pode contribuir no desenvolvimento da IC por modificar o colágeno, promovendo ligações cruzadas e diminuindo a elasticidade do tecido (Hartog 2007). Ainda, sabe-se que os AGEs estimulam a transcrição de MMP-9, colaborando com o processo de remodelamento ventricular (Zhang 2011), além de induzir à sinalização inflamatória (ativação de NF- κ B) e fibrótica (via TGF- α) na progressão da IC via RAGE (Hartog 2007). Neste sentido, níveis elevados de sRAGE em pacientes com doença coronariana aguda ou IC estão associados a piora de prognóstico

(Raposeiras-Roubin 2010, Raposeiras-Roubin 2011, Raposeiras-Roubin 2013). Sua concentração também já foi associada com os níveis de NT-pró BNP, sugerindo que o BNP poderia ter um papel na inflamação por meio da via AGE-RAGE (Boschetto 2013). Entretanto, já foi demonstrado que o sRAGE pode ser protetor após isquemia-reperfusão, diminuindo a área de infarto e preservando a função cardíaca, por meio da JAK2/STAT3, uma via de sobrevivência celular que atua na inibição da apoptose nos cardiomiócitos (Jiang 2015). Ainda, o uso de sRAGE e de um inibidor da expressão do RAGE foram investigados como potenciais protetores cardíacos pós-IAM em modelo animal, resultando na redução do tamanho da lesão cardíaca e da fibrose (Ku 2015). Contudo, apesar do amplo conhecimento sobre os efeitos dos AGEs e do RAGE sobre alguns desfechos cardíacos, pouco se entende o mecanismo pelo qual o eixo AGE-RAGE exerce a sua ação. Para aprimorar esse conhecimento é necessário realizar estudos com modelos animais que investiguem se o IAM pode interferir na formação de AGEs e de seu receptor ao longo do processo do remodelamento cardíaco, independente de fatores comportamentais e ambientais.

3 JUSTIFICATIVA

O IAM configura-se como a principal causa de morte entre as doenças cardiovasculares no Brasil. O eixo de sinalização AGE-RAGE-inflamação tem se mostrado importante no desenvolvimento e na progressão das doenças cardiovasculares. Entretanto, até o momento não há uma caracterização do perfil de formação de AGEs e de produção de RAGE em um modelo animal de isquemia cardíaca. A partir disso, deve-se ressaltar que a caracterização de um modelo animal pós-IAM é importante para que se possa empregá-lo com segurança em estudos de compreensão de mecanismos e de drogas anti-AGE no cenário das doenças isquêmicas do coração.

4 HIPÓTESE

O modelo experimental de IAM em ratos apresenta aumento de AGEs e RAGEs ao longo do tempo, sendo que essas concentrações são associadas ao processo de remodelamento cardíaco.

5 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a formação de AGEs e a produção de RAGE ao longo do processo de remodelamento cardíaco em ratos submetidos ao IAM pelo modelo de ligação permanente do ramo descendente da coronária esquerda.

5.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar níveis de diferentes tipos de AGEs (fluorescentes, amarronzados, CML e CEL) em plasma e no tecido cardíaco em modelo animal de IAM.
2. Avaliar níveis dos componentes da formação de AGEs (aminas livres reativas e proteínas carboniladas) em plasma e no tecido cardíaco em modelo animal de IAM.
3. Realizar uma avaliação temporal em 2, 30 e 120 dias pós-IAM dos níveis de diferentes tipos de AGEs e de seus componentes de formação.
4. Avaliar a produção de RAGE no plasma e no tecido cardíaco em modelo animal de IAM.

6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Ahmed, K. A., S. Muniandy and I. S. Ismail (2007). "Role of N-epsilon-(Carboxymethyl)Lysine in the development of ischemic heart disease in type 2 diabetes Mellitus." Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition **41**(2): 97-105.

Ahmed, M. S., E. Oie, L. E. Vinge, A. Yndestad, G. Oystein Andersen, Y. Andersson, T. Attramadal and H. Attramadal (2004). "Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats." J Mol Cell Cardiol **36**(3): 393-404.

Anderson, M. M., J. R. Requena, J. R. Crowley, S. R. Thorpe and J. W. Heinecke (1999). "The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation." J Clin Invest **104**(1): 103-113.

Andrades, M. E., R. Lorenzi, M. Berger, J. A. Guimaraes, J. C. Moreira and F. Dal-Pizzol (2009). "Glycolaldehyde induces fibrinogen post-translational modification, delay in clotting and resistance to enzymatic digestion." Chem Biol Interact **180**(3): 478-484.

Andrassy, M., H. C. Volz, J. C. Igwe, B. Funke, S. N. Eichberger, Z. Kaya, S. Buss, F. Autschbach, S. T. Pleger, I. K. Lukic, F. Bea, S. E. Hardt, P. M. Humpert, M. E. Bianchi, H. Mairbaurl, P. P. Nawroth, A. Remppis, H. A. Katus and A. Bierhaus (2008). "High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart." Circulation **117**(25): 3216-3226.

Antonio, E. L., A. A. Dos Santos, S. R. R. Araujo, D. S. Bocalini, L. Dos Santos, G. Fenelon, M. F. Franco and P. J. F. Tucci (2009). "Left Ventricle Radio-frequency Ablation in the Rat: A New Model of Heart Failure due to Myocardial Infarction Homogeneous in Size and Low in Mortality." Journal of Cardiac Failure **15**(6): 540-548.

Ashraf, J. M., S. Ahmad, I. Choi, N. Ahmad, M. Farhan, G. Tatyana and U. Shahab (2015). "Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches." lubmb Life **67**(12): 897-913.

Baidoshvili, A., P. A. Krijnen, K. Kupreishvili, C. Ciurana, W. Bleeker, R. Nijmeijer, C. A. Visser, F. C. Visser, C. J. Meijer, W. Stoker, L. Eijnsman, V. W. van Hinsbergh, C. E. Hack, H. W. Niessen and C. G. Schalkwijk (2006). "N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine depositions in intramyocardial blood vessels in human and rat acute myocardial infarction: a predictor or reflection of infarction?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(11): 2497-2503.

Bodiga, V. L., S. R. Eda and S. Bodiga (2014). "Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy." Heart Fail Rev **19**(1): 49-63.

Boschetto, P., I. Campo, M. Stendardo, E. Casimirri, C. Tinelli, M. Gorrini, C. Ceconi, A. Fucili, A. Potena, A. Papi, L. Ballerin, L. M. Fabbri and M. Luisetti (2013). "Plasma sRAGE and N-(carboxymethyl) lysine in patients with CHF and/or COPD." Eur J Clin Invest **43**(6): 562-569.

Brett, J., A. M. Schmidt, S. D. Yan, Y. S. Zou, E. Weidman, D. Pinsky, R. Nowygrod, M. Nepper, C. Przysiecki, A. Shaw and et al. (1993). "Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues." Am J Pathol **143**(6): 1699-1712.

Cao, W., J. Chen, Y. Chen, S. Chen, X. Chen, H. Huang and P. Liu (2015). "Advanced glycation end products induced immune maturation of dendritic cells controls heart failure through NF-kappaB signaling pathway." Arch Biochem Biophys **580**: 112-120.

Cao, W., J. Chen, Y. Chen, X. Chen and P. Liu (2014). "Advanced glycation end products promote heart failure through inducing the immune maturation of dendritic cells." Appl Biochem Biotechnol **172**(8): 4062-4077.

Cohen, M. M., Jr. (2013). "Perspectives on RAGE signaling and its role in cardiovascular disease." Am J Med Genet A **161A**(11): 2750-2755.

Cohn, J. N., R. Ferrari and N. Sharpe (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." J Am Coll Cardiol **35**(3): 569-582.

D'Elia, N., J. D'Hooge and T. H. Marwick (2015). "Association Between Myocardial Mechanics and Ischemic LV Remodeling." JACC Cardiovasc Imaging **8**(12): 1430-1443.

DATASUS. (2012). "Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade.", 2014.

DATASUS. (2014). "Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidade.", 2016, from <http://www.datasus.gov.br>.

Dean, R. G., L. C. Balding, R. Candido, W. C. Burns, Z. Cao, S. M. Twigg and L. M. Burrell (2005). "Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis after myocardial infarction." J Histochem Cytochem **53**(10): 1245-1256.

Diamanti-Kandarakis, E., C. Piperi, E. Patsouris, P. Korkolopoulou, D. Panidis, L. Pawelczyk, A. G. Papavassiliou and A. J. Duleba (2007). "Immunohistochemical localization of advanced glycation end-products (AGEs) and their receptor (RAGE) in polycystic and normal ovaries." Histochem Cell Biol **127**(6): 581-589.

Fishbein, M. C., D. Maclean and P. R. Maroko (1978). "Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution." Am J Pathol **90**(1): 57-70.

Forster, A., Y. Kuhne and T. Henle (2005). "Studies on absorption and elimination of dietary maillard reaction products." Ann N Y Acad Sci **1043**: 474-481.

Gugliucci, A. and M. Bendayan (1996). "Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells." Diabetologia **39**(2): 149-160.

Gugliucci, A. and T. Menini (2014). The Axis AGE-RAGE-Soluble RAGE and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. Oxidative Stress and Inflammation in Noncommunicable Diseases - Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics. J. Camps. Switzerland, Springer. **824**: 191-208.

Harja, E., D. X. Bu, B. I. Hudson, J. S. Chang, X. Shen, K. Hallam, A. Z. Kalea, Y. Lu, R. H. Rosario, S. Oruganti, Z. Nikolla, D. Belov, E. Lalla, R. Ramasamy, S. F. Yan and A. M. Schmidt (2008). "Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice." J Clin Invest **118**(1): 183-194.

Hartog, J. W., A. A. Voors, S. J. Bakker, A. J. Smit and D. J. van Veldhuisen (2007). "Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications." Eur J Heart Fail **9**(12): 1146-1155.

Heimburger, R. F. (1946). "Injection into Pericardial Sac and Ligation of Coronary Artery of the Rat." Archives of Surgery **52**(6): 677-689.

Hochman, J. S. and B. H. Bulkley (1982). "Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study." Circulation **65**(7): 1446-1450.

Hodge, J. E. (1953). "Dehydrated Foods - Chemistry of Browning Reactions in Model Systems." Journal of Agricultural and Food Chemistry **1**(15): 928-943.

Hou, X., Z. Hu, H. Xu, J. Xu, S. Zhang, Y. Zhong, X. He and N. Wang (2014). "Advanced glycation endproducts trigger autophagy in cardiomyocyte via RAGE/PI3K/AKT/mTOR pathway." Cardiovasc Diabetol **13**: 78.

Ikeda, K., T. Higashi, H. Sano, Y. Jinnouchi, M. Yoshida, T. Araki, S. Ueda and S. Horiuchi (1996). "N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction." Biochemistry **35**(24): 8075-8083.

Jiang, X., C. X. Guo, X. J. Zeng, H. H. Li, B. X. Chen and F. H. Du (2015). "A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion via the JAK2/STAT3 pathway." Apoptosis **20**(8): 1033-1047.

Johns, T. N. and B. J. Olson (1954). "Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals." Ann Surg **140**(5): 675-682.

Kalea, A. Z., A. M. Schmidt and B. I. Hudson (2009). "RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease." Clin Sci (Lond) **116**(8): 621-637.

Kaufman, N., T. L. Gavan and R. W. Hill (1959). "Experimental myocardial infarction in the rat." AMA Arch Pathol **67**(5): 482-488.

Kierdorf, K. and G. Fritz (2013). "RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond." J Leukoc Biol **94**(1).

Kislinger, T., C. Fu, B. Huber, W. Qu, A. Taguchi, S. Du Yan, M. Hofmann, S. F. Yan, M. Pischetsrieder, D. Stern and A. M. Schmidt (1999). "N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression." J Biol Chem **274**(44): 31740-31749.

Kitahara, T., Y. Takeishi, M. Harada, T. Niizeki, S. Suzuki, T. Sasaki, M. Ishino, O. Bilim, O. Nakajima and I. Kubota (2008). "High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice." Cardiovasc Res **80**(1): 40-46.

Ku, S. H., J. Hong, H. H. Moon, J. H. Jeong, H. Mok, S. Park, D. Choi and S. H. Kim (2015). "Deoxycholic acid-modified polyethylenimine based nanocarriers for RAGE siRNA therapy in acute myocardial infarction." Arch Pharm Res **38**(7): 1317-1324.

Lapolla, A., R. Flamini, A. Dalla Vedova, A. Senesi, R. Reitano, D. Fedele, E. Basso, R. Seraglia and P. Traldi (2003). "Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method." Clin Chem Lab Med **41**(9): 1166-1173.

Lekawanvijit, S. and H. Krum (2014). "Cardiorenal syndrome: acute kidney injury secondary to cardiovascular disease and role of protein-bound uraemic toxins." J Physiol **592**(Pt 18): 3969-3983.

Liu, M., Y. Yu, H. Jiang, L. Zhang, P. P. Zhang, P. Yu, J. G. Jia, R. Z. Chen, Y. Z. Zou and J. B. Ge (2013). "Simvastatin suppresses vascular inflammation and atherosclerosis in ApoE(-/-) mice by downregulating the HMGB1-RAGE axis." Acta Pharmacol Sin **34**(6): 830-836.

Luevano-Contreras, C. and K. Chapman-Novakofski (2010). "Dietary Advanced Glycation End Products and Aging." Nutrients **2**(12): 1247-1265.

Mahali, S., N. Raviprakash, P. B. Raghavendra and S. K. Manna (2011). "Advanced glycation end products (AGEs) induce apoptosis via a novel pathway: involvement of Ca²⁺ mediated by interleukin-8 protein." J Biol Chem **286**(40): 34903-34913.

Mansur, A. d. P., D. Favarato, M. d. F. M. d. Souza, S. D. Avakian, J. M. Aldrighi, L. A. M. César and J. A. F. Ramires (2001). "Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996." Arquivos Brasileiros de Cardiologia **76**: 504-510.

McAlindon, E., C. Bucciarelli-Ducci, M. S. Suleiman and A. Baumbach (2015). "Infarct size reduction in acute myocardial infarction." Heart **101**(2): 155-160.

McDonough, A. A., L. C. Veiras, J. N. Minas and D. L. Ralph (2015). "Considerations when quantitating protein abundance by immunoblot." Am J Physiol Cell Physiol **308**(6): C426-433.

Meerwaldt, R., J. W. Hartog, R. Graaff, R. J. Huisman, T. P. Links, N. C. den Hollander, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, G. Navis, R. O. Gans and A. J. Smit (2005). "Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients." J Am Soc Nephrol **16**(12): 3687-3693.

Miyata, T., Y. Ueda, K. Horie, M. Nangaku, S. Tanaka, C. van Ypersele de Strihou and K. Kurokawa (1998). "Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine." Kidney Int **53**(2): 416-422.

Monnier, V. M., R. R. Kohn and A. Cerami (1984). "Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(2): 583-587.

Nagai, R., Y. Fujiwara, K. Mera, K. Yamagata, N. Sakashita and M. Takeya (2008). "Immunochemical detection of Nepsilon-(carboxyethyl)lysine using a specific antibody." J Immunol Methods **332**(1-2): 112-120.

Nagai, R., C. M. Hayashi, L. Xia, M. Takeya and S. Horiuchi (2002). "Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins." J Biol Chem **277**(50): 48905-48912.

Nedic, O., S. I. Rattan, T. Grune and I. P. Trougakos (2013). "Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology." Free Radic Res **47 Suppl 1**: 28-38.

Neeper, M., A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern and A. Shaw (1992). "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins." J Biol Chem **267**(21): 14998-15004.

Opie, L. H., P. J. Commerford, B. J. Gersh and M. A. Pfeffer (2006). "Controversies in ventricular remodelling." Lancet **367**(9507): 356-367.

Pfeffer, J. M., M. A. Pfeffer and E. Braunwald (1985). "Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat." Circ Res **57**(1): 84-95.

Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, M. C. Fishbein, P. J. Fletcher, J. Spadaro, R. A. Kloner and E. Braunwald (1979). "Myocardial infarct size and ventricular function in rats." Circ Res **44**(4): 503-512.

Rabbani, N. and P. J. Thornalley (2009). "Quantitation of markers of protein damage by glycation, oxidation, and nitration in peritoneal dialysis." Perit Dial Int **29 Suppl 2**: S51-56.

Ramasamy, R. and A. M. Schmidt (2012). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and implications for the pathophysiology of heart failure." Curr Heart Fail Rep **9**(2): 107-116.

Raposeiras-Roubin, S., B. K. Rodino-Janeiro, L. Grigorian-Shamagian, M. Moure-Gonzalez, A. Seoane-Blanco, A. Varela-Roman, L. Almenar-Bonet, E. Alvarez and J. R. Gonzalez-Juanatey (2011). "Relation of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products to Predict Mortality in Patients With Chronic Heart Failure Independently of Seattle Heart Failure Score." American Journal of Cardiology **107**(6): 938-944.

Raposeiras-Roubin, S., B. K. Rodino-Janeiro, L. Grigorian-Shamagian, M. Moure-Gonzalez, A. Seoane-Blanco, A. Varela-Roman, E. Alvarez and J. R. Gonzalez-Juanatey (2010). "Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels: New Roles for Soluble RAGE." Eur J Heart Fail **12**(10): 1092-1100.

Raposeiras-Roubin, S., B. K. Rodino-Janeiro, B. Paradela-Dobarro, L. Grigorian-Shamagian, J. M. Garcia-Acuna, P. Aguiar-Souto, M. Jacquet-Hervet, M. V. Reino-Maceiras, E. Alvarez and J. R. Gonzalez-Juanatey (2012). "Predictive value of advanced glycation end products for the development of post-infarction heart failure: a preliminary report." Cardiovasc Diabetol **11**: 102.

Raposeiras-Roubin, S., B. K. Rodiño-Janeiro, B. Paradela-Dobarro, L. Grigorian-Shamagian, J. M. García-Acunã, P. Aguiar-Souto, M. Jacquet-Hervet, M. V. Reino-Maceiras, J. R. González-Juanatey and E. Álvarez (2013). "Fluorescent Advanced Glycation End Products and Their Soluble Receptor: The Birth of New Plasmatic Biomarkers for Risk Stratification of Acute Coronary Syndrome." PLoS One **8**(9): e74302.

Scheijen, J. L., M. P. van de Waarenburg, C. D. Stehouwer and C. G. Schalkwijk (2009). "Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **877**(7): 610-614.

Sell, D. R. and V. M. Monnier (2012). "Molecular basis of arterial stiffening: role of glycation - a mini-review." Gerontology **58**(3): 227-237.

Tsikak, D. (2001). "Affinity chromatography as a method for sample preparation in gas chromatography/mass spectrometry." J Biochem Biophys Methods **49**(1-3): 705-731.

Tucci, P. J. F. (2011). "Pathophysiological Characteristics of the Post-Myocardial Infarction Heart Failure Model in Rats." Arquivos Brasileiros De Cardiologia **96**(5): 420-424.

Valencia, J. V., S. C. Weldon, D. Quinn, G. H. Kiers, J. DeGroot, J. M. TeKoppele and T. E. Hughes (2004). "Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics." Anal Biochem **324**(1): 68-78.

Vetter, S. W. and V. S. Indurthi (2011). "Moderate glycation of serum albumin affects folding, stability, and ligand binding." Clin Chim Acta **412**(23-24): 2105-2116.

Vistoli, G., D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini and G. Aldini (2013). "Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation." Free Radic Res **47 Suppl 1**: 3-27.

Vlassara, H., W. Cai, J. Crandall, T. Goldberg, R. Oberstein, V. Dardaine, M. Peppia and E. J. Rayfield (2002). "Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15596-15601.

Vouillarmet, J., D. Maucourt-Boulch, P. Michon and C. Thivolet (2013). "Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration." Diabetes Technol Ther **15**(7): 601-605.

Wautier, M. P., O. Chappey, S. Corda, D. M. Stern, A. M. Schmidt and J. L. Wautier (2001). "Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(5): E685-694.

Whittaker, P., D. R. Boughner and R. A. Kloner (1991). "Role of collagen in acute myocardial infarct expansion." Circulation **84**(5): 2123-2134.

Willemsen, S., J. W. Hartog, D. J. van Veldhuisen, P. van der Meer, J. F. Roze, T. Jaarsma, C. Schalkwijk, I. C. van der Horst, H. L. Hillege and A. A. Voors (2012). "The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction." Am Heart J **164**(5): 742-749 e743.

Xie, J., J. D. Mendez, V. Mendez-Valenzuela and M. M. Aguilar-Hernandez (2013). "Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE)." Cell Signal **25**(11): 2185-2197.

Yamazaki, T., I. Komuro and Y. Yazaki (1999). "Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy." Am J Cardiol **83**(12A): 53H-57H.

Yan, S. F., R. Ramasamy and A. M. Schmidt (2010). "Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging." Biochem Pharmacol **79**(10): 1379-1386.

Yonekura, H., Y. Yamamoto, S. Sakurai, R. G. Petrova, M. J. Abedin, H. Li, K. Yasui, M. Takeuchi, Z. Makita, S. Takasawa, H. Okamoto, T. Watanabe and H. Yamamoto (2003). "Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury." Biochem J **370**(Pt 3): 1097-1109.

Zeng, J., R. A. Dunlop, K. J. Rodgers and M. J. Davies (2006). "Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols." Biochem J **398**(2): 197-206.

Zhang, F., G. Banker, X. Liu, P. A. Suwanabol, J. Lengfeld, D. Yamanouchi, K. C. Kent and B. Liu (2011). "The novel function of advanced glycation end products in regulation of MMP-9 production." J Surg Res **171**(2): 871-876.

Zhang, L., M. Bukulin, E. Kojro, A. Roth, V. V. Metz, F. Fahrenholz, P. P. Nawroth, A. Bierhaus and R. Postina (2008). "Receptor for advanced glycation end products is subjected to protein ectodomain shedding by metalloproteinases." J Biol Chem **283**(51): 35507-35516.

Zhang, X., N. Tao, X. Wang, F. Chen and M. Wang (2015). "The colorants, antioxidants, and toxicants from nonenzymatic browning reactions and the impacts of dietary polyphenols on their thermal formation." Food Funct **6**(2): 345-355.

Zornoff, L. A. M., S. A. R. Paiva, M. F. Minicucci and J. Spadaro (2009). "Experimental Myocardium Infarction in Rats: Analysis of the Model." Arq Bras Cardiol **93**(3): 434-440.

7 ARTIGO ORIGINAL

Manuscrito conforme a revista: Experimental Biology and Medicine

Characterization of advanced glycation end products and its receptor (RAGE) in a myocardial infarction animal model

Short title: AGE and RAGE in a MI animal model

Bianca de Moraes Fracasso^{1,2}, Juliana Oliveira Rangel^{1,2}, Fernanda Severo Curuja¹, Amanda Lopes¹, Virgílio Olsen¹, Amanda Phaelante^{1,2}, Andreia Biolo^{1,2}, Michael Andrades^{1,2}

1 - Cardiovascular Research Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

2 - Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Michael Andrades

Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350,

Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

E-mail: meandrades@hcpa.edu.br

Abstract

Despite the increasing importance of glycated molecules in the course of cardiac diseases, there is no characterization of the of advanced glycation end products (AGEs) and its receptor, RAGE in an animal model of myocardial infarction (MI). Then, the aim of this study was to characterize the AGEs formation and RAGE production in plasma and cardiac tissue during the cardiac remodeling process in rats with MI. Male Wistar rats were randomized in two groups, Sham (n = 15) and MI (n = 14) subjected to the left anterior descending coronary artery ligation. MI group was stratified in two groups based on its ejection fraction. Echocardiography and AGEs plasma levels, protein carbonyl and free amines were assessed in the pre-surgery, 2, 30, and 120 days post-surgery. At the end of follow-up, the heart was collected for AGEs and RAGE evaluation. At 2 days after surgery, considering ejection fraction (EF), both MI groups showed a large heart dysfunction ($MI^{highEF} = 56.5\%$ and $MI^{lowEF} = 44.1\%$) when compared with the sham group (92%), followed by heart hypertrophy (sham = 2.2 mg/g; $MI^{highEF} = 2.7$ mg/g; $MI^{lowEF} = 3.3$ mg/g) but not by pulmonary edema. No differences were observed in AGEs formation in plasma, except for a decrease in the absorbance in MI^{lowEF} at the end of follow-up. Also, there was an AGEs decrease in the absorbance in heart homogenates of MI, which was confirmed with the immunodetection for N- ϵ -carboxymethyl-lysine and N- ϵ -carboxyethyl-lysine. No statistical significant increase in heart homogenate RAGE levels could be detected, regardless of the EF. Thus, despite the inflammatory and oxidative profile existing in rat MI model, we showed that there is no increase in plasma and cardiac tissue AGE or RAGE during a follow up of 120 days.

Keywords: AGE, RAGE, heart dysfunction, MI model

Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) occurs by obstruction of the coronary arteries, reducing or preventing the arrival of nutrients in cardiomyocytes, leading to cell death and impaired cardiac function. The ischemic myocardial process triggers the inflammatory signaling, which is followed by immune cell attraction, reactive oxygen species production, and biomolecule damage ¹.

AGEs are naturally produced molecules in the human metabolism but may have their levels increased by exogenous sources, such as diet and pollution. Moreover, inflammatory process may also increase AGEs levels ^{2, 3}. It is already clear that blood and tissue levels of AGEs are associated with the chronic diseases outcomes ^{4, 5}. AGEs are harmful to health because they cause protein malfunctioning due to molecular changes and trigger pro-inflammatory cascades by activating AGE receptor (RAGE) ^{6, 7}.

Clinical trials and observational studies show that cardiovascular disease patients present worse prognosis with increased AGEs and RAGE ^{8, 9}, and that post-AMI patients with increased plasma fluorescent AGEs have higher risk of developing heart failure (HF) ¹⁰. Along the same line, independent of the AGE levels in plasma, soluble RAGE (sRAGE) showed a positive association with NYHA class and NT-proBNP plasma levels, known HF markers of severity ¹¹. Despite the increasing importance of glycated molecules in the course of cardiac diseases, there is no characterization of the generation of AGEs and its receptor in a representative animal model of myocardial infarction. Experimental models provide important information on the morphology, biochemistry, and electrophysiology in many areas. As far as we know, there is no study evaluating the AGEs generation an experimental model of permanent myocardial ischemia.

Then, our hypothesis is that the experimental model of MI in rats shows an increase in AGEs and RAGE, and the aim of the study was to characterize the AGEs formation and RAGE production in plasma and cardiac tissue throughout the cardiac remodeling process in rats with MI.

Materials and methods

Animal model and experimental design

Male Wistar rats (13 – 15 weeks of age) were randomized in two groups, sham (n = 15) and MI (n = 14), with WinPepi software. All animals were weighted one day prior to surgery and then at 2, 30, and 120 days. Before the surgery, the rats were anesthetized using Ketamine (100 mg/kg; i.p.) and Xylazine (10 mg/kg; i.p.), placed on mechanical ventilation set at 66 RPM, 2.46 mL (Harvard Model 683). Then, the rats underwent left lateral thoracotomy between the third and the fourth intercostal space. Prior to thoracotomy, bupivacaine was applied (1 mg/kg; i.m.) in the nervous branch (caudal ribs) infiltration, two ribs before and two after the incision site. After, the left atrium was pushed aside and the left coronary artery was ligated with 6.0 mononylon thread between the exit point of the pulmonary artery and left atrium. The muscle layers and skin incision were sutured with 5.0 mononylon thread sutures ¹². Sham operated animals underwent the same procedure, except that the arterial ligation was omitted. All animals receive post-operative analgesia with tramadol (5 mg/kg, i.p.), 1 dose every 12 hours for one day and a half. The rats were housed at constant room temperature (22 ± 2°C), humidity (40-60%), and light cycle (12:12 h light-dark), with free access to standard food and water, for 120 days. This study protocol was approved by the institutional Ethics Committee under the number 13-0445.

Plasma collection and processing

All animals had the blood collected 7 days before surgery and at 2, 30, and 120 days after surgery. Two milliliters were collected through retro-orbital plexus puncture in heparin (50 U). Heparinized blood was centrifuged (3,000 x g for 12 min) and plasma was stored in -80°C freezer.

Tissue collection and processing

After 120 days, the rats were killed by isoflurane overdose and the heart, liver, and lung were collected. The organs were quickly washed in a cooled 0.9% NaCl solution and were gently blotted against a clean paper. The heart was weighted and divided into 3 areas: infarcted, peri-infarct, and remote, that were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C freezer. The liver and lung were weighted and placed in oven at 60°C. After 10 days, they were weighted again for congestion evaluation.

Homogenates were prepared in two different ways, according to the technique. For ELISA assays, samples (100 mg) were homogenized in 1 mL of phosphate-buffered saline with 0.05% Tween 20 (pH 7.4) at 4°C, supplemented with protease inhibitor (SIGMAFAST™ Protease Inhibitor, #S8820, Sigma-Aldrich). For spectrophotometric and dot blot assays, samples (100 mg) were homogenized in 500 µL of phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 4°C. Homogenization was performed mechanically and homogenates were centrifuged (2,400 xg for 20 min at 4°C), and stored at -80°C.

Echocardiography

Left ventricular (LV) function and infarct size were evaluated by echocardiography (HD7 Philips Systems) at 2, 30, and 120 days after surgery with a 12-3 MHz linear transducer. Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (3%, 0.5 L of O₂/min), had their chests shaved and were maintained on a warm blanket. Echocardiography assessment was performed in a blinded way, being conducted by researcher who was not involved in the surgical procedure.

The infarct size (% MI), assessed by measuring the akinetic and/or hypokinetic portion (AHP) length of the ventricular walls and expressed as a percentage of the total perimeter of the endocardial contour (EP) in three transverse sections of LV (edges of the mitral valve, papillary muscles, and of apical region), using the formula: %MI = (AHP/EP) x 100 (Peron, Saraiva et al. 2006). Ejection fraction (EF) was calculated by the formula: $EF = \frac{LV \text{ End Diastolic Diameter}^3 - LV \text{ End Systolic Diameter}^3}{LV \text{ End Diastolic Diameter}^3} \times 100$, determined in the M-mode¹³.

To improve sample homogeneity, animals with small MI area (< 30%) and high ejection fraction (> 60%) at the second day after MI surgery were excluded from the study.

Reactive free amine content

Plasma and homogenates were diluted 200 and 100-fold, respectively, with 50 mM carbonate buffer (pH 10.5). After, 18 μ L of the diluted specimens were pipetted into 96 wells microplate and 182 μ L of o-phthalaldehyde (OPA) reagent were added in all wells. OPA reagent includes 5 mg of OPA (#P1378, Sigma-Aldrich), 100 μ L of pure ethanol, 5 μ L of β -2-mercaptoethanol and 10 mL of 50 mM carbonate buffer pH 10.5, and should be used within 2 h, protecting from light. Samples were read at 340 nm excitation and 455 nm emission wavelengths within 1.5 min of reaction in SpectraMax M3 Multi-mode Microplate Reader (Molecular Devices).

Protein carbonyl content

Protein carbonyl were determined through the sample proteins reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) reagent in 2 M HCl to form chromophoric dinitrophenylhydrazones. Briefly, a sample volume containing 0.6 mg of proteins was reacted with DNPH for 30 min. After, proteins were pelleted with a cold 10% trichloroacetic acid (final concentration). Pellets were washed three times with ethanol:ethyl acetate and centrifuged (11,000 xg , 3 min, 4°C), and dissolved in 1 mL of 6 M aminoguanidine hydrochloride. Absorbance values were recorded at 380 nm, and carbonyl concentration was determined using the DNPH molar extinction coefficient ($\epsilon = 22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁴.

AGE fluorescence and absorbance

Plasma was diluted 500-fold with phosphate-buffered saline, as previously described¹⁵. Homogenate were diluted 50-fold with distilled water. Wavelength for

AGEs absorption set at 340 nm¹⁶ and for fluorescence at 370 nm/445 nm (excitation/emission)¹⁵. Both were recorded in SpectraMax M3 Multi-mode Microplate Reader (Molecular Devices).

Dot blot analysis

For dot blot, 6D12 antibody (anti-N- ϵ -carboxymethyl-lysine (CML) and N- ϵ -carboxyethyl-lysine (CEL))¹⁷ and 2G11 antibody (anti-CML)¹⁸ were employed. The antibodies were kindly donated by Dr. Ryoji Nagai, from Tokai University.

Two hundred microliters of plasma (3 μ g of protein) and homogenate (1 μ g of protein) were adsorbed in a nitrocellulose membrane using Bio-dot apparatus (Bio-Rad). The membranes were not blocked, but allowed to dry with methanol before the incubation with antibodies 6D12 or 2G11 at room temperature at a dilution of 1:5,000 in Tris Buffered Saline-supplemented with 0.1% Tween (TTBS) and 1% BSA for 10 min in SNAP i.d. 2.0 apparatus (Millipore Corporation). Then, membranes were washed 4 times with TTBS, incubated with secondary antibody-mouse (#A4416, Sigma-Aldrich) at 1:15,000 dilution for 5 min at room temperature in SNAP. Color was developed on the spots using the ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation). Bands were visualized in ImageQuant LAS500 (GE Healthcare Life Sciences), and quantified by optical densitometry using imageJ analysis software. Relative intensity of each spot was calculated by dividing the area intensity within a spot by normalizer area intensity.

ELISA

CML and RAGE were assayed using commercial ELISA kits, Oxiselect™ CML Competitive (Cell Biolabs, Inc.) and Rat RAGE/AGER (RAB0009, Sigma-Aldrich), respectively. The assays were performed as described in the manufacturer's protocol. For CML, plasma and heart (peri-infarct area) homogenate were used in concentrated form and for RAGE, plasma was concentrated too, but heart (peri-infarct area) was two-times diluted.

Estimation of total protein content

Protein contents of samples were determined by Bradford method (Bio-Rad Protein Assay, #500-0006, Bio-Rad) using bovine serum albumin (#A9647, Sigma-Aldrich) as the standard ¹⁹.

Sample size calculation

The sample size was calculated to 80% power and 5% significance level, to find a 20% difference between sham and MI group (fluorescence), considering 15% of standard deviation (preliminary data of our group). In order to compensate the surgical procedure intrinsic death and follow-up (around 50%), 14 animals were added in the MI group ²⁰.

Data analysis and statistics

Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics 21 for Windows (IBM Corporation). MI group was stratified in another 2 groups based on the median obtained for ejection fraction at 2 days after surgery ($EF_{\text{median}} = 53.7\%$), as follows: (MI ejection fraction above the median; $EF_{\text{mean}} = 56.5$, $n =$

7) and MI^{lowEF} (MI ejection fraction below the median; EF mean = 44.1, n = 7). Variables normality was assessed using Shapiro-Wilk test. To compare groups at the end of follow-up, were used ANOVA followed by Tukey's Post Hoc test for parametric data or Kruskal-Wallis followed by Dunn test, for non-parametric data. For non-homogenous or not normal variables, it was performed logarithmic transformation and geometric mean \pm 95% confidence interval (CI) was used. To compare groups over the time and each group variation during follow-up, GEE was used. Differences were considered significant if p value < 0.05.

Results

Body weight, cardiac hypertrophy, and cardiac function

There was no significant difference in body weight of the groups either before and after 120 days of surgery. MI group was stratified in two another groups according to EF median obtained at the second day after surgery. MI^{lowEF} presented 49% increase in heart hypertrophy whereas MI^{highEF} presented 20% of hypertrophy. Concerning the congestion, liver from MI^{lowEF} group showed larger amount of fluid than the sham group (p = 0.009), while lungs did not show difference (Table 1). MI groups presented worst EF than sham group, suggesting a systolic dysfunction (Figure 1).

Table 1 Body weight, organ weight, and infarct size at the end of the follow up.

	Sham (n = 15)	MI ^{highEF} (n = 7)	MI ^{lowEF} (n = 7)
Initial body weight (g)	414 ± 8	372 ± 29	394 ± 12
Final body weight (g)	510 ± 11	496 ± 21	503 ± 17
Infarct size (%)	-----	44 ± 6.1	47 ± 6.0
Heart weight/final weight (mg/g)	2.24 ± 0.04	2.68 ± 0.2*	3.34 ± 0.2**
Liver wet weight/dry weight ratio	0.68 ± 0.002	0.69 ± 0.004**	0.68 ± 0.004
Lung wet weight/dry weight ratio	0.80 ± 0.002	0.81 ± 0.007	0.80 ± 0.01

Kruskal-Wallis: median ± standard error (SE). *p < 0.05 or **p < 0.001 difference to sham. MI^{highEF}: group with EF > 53.7% and < 66.5%; MI^{lowEF}: group with EF < 53.7.

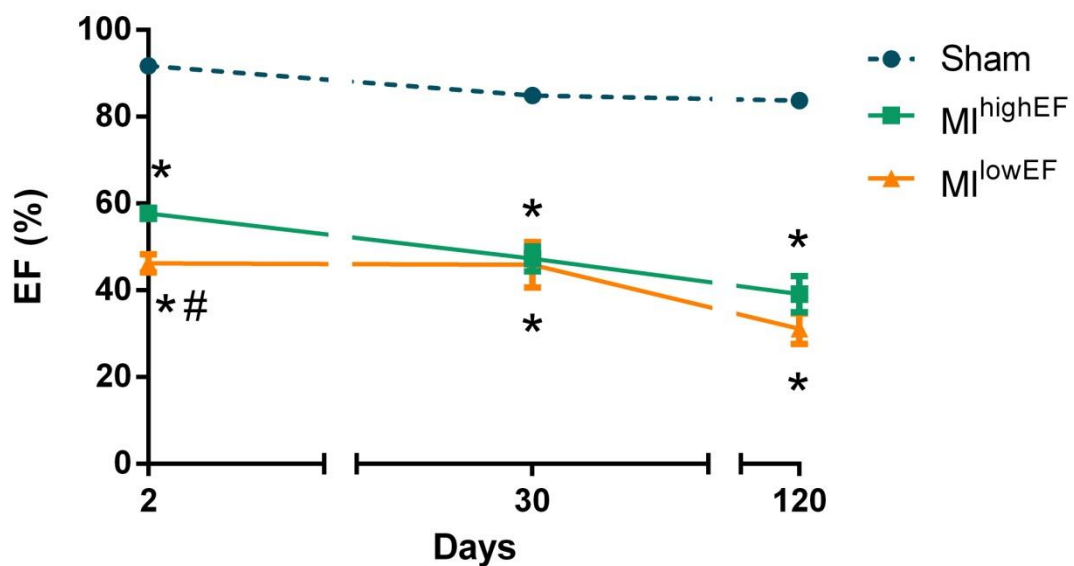


Figure 1 Ejection fraction (EF). Statistical analysis: GEE, data are expressed as mean ± SE. * difference to sham; # difference to MI^{highEF} (p < 0.05; sham group, n = 15; MI group, n = 7 per group). MI^{highEF}: group with EF > 53.7% and < 66.5%; MI^{lowEF}: group with EF < 53.7.

Measurement of compounds related to the formation of AGEs

As showed in Figure 2, it was not observed difference between groups in reactive free amine plasma amounts (Figure 2a) and in heart peri-infarct and remote area (Figure 2b). Cardiac tissue homogenates were also compared for protein carbonyl, which presented no statistically significant difference (Figure 2d). However, protein carbonyl plasma levels increased after 30 days in MI^{lowEF} compared with MI^{highEF} group. Nevertheless, at the end of the follow-up it was not detected difference (Figure 2c).

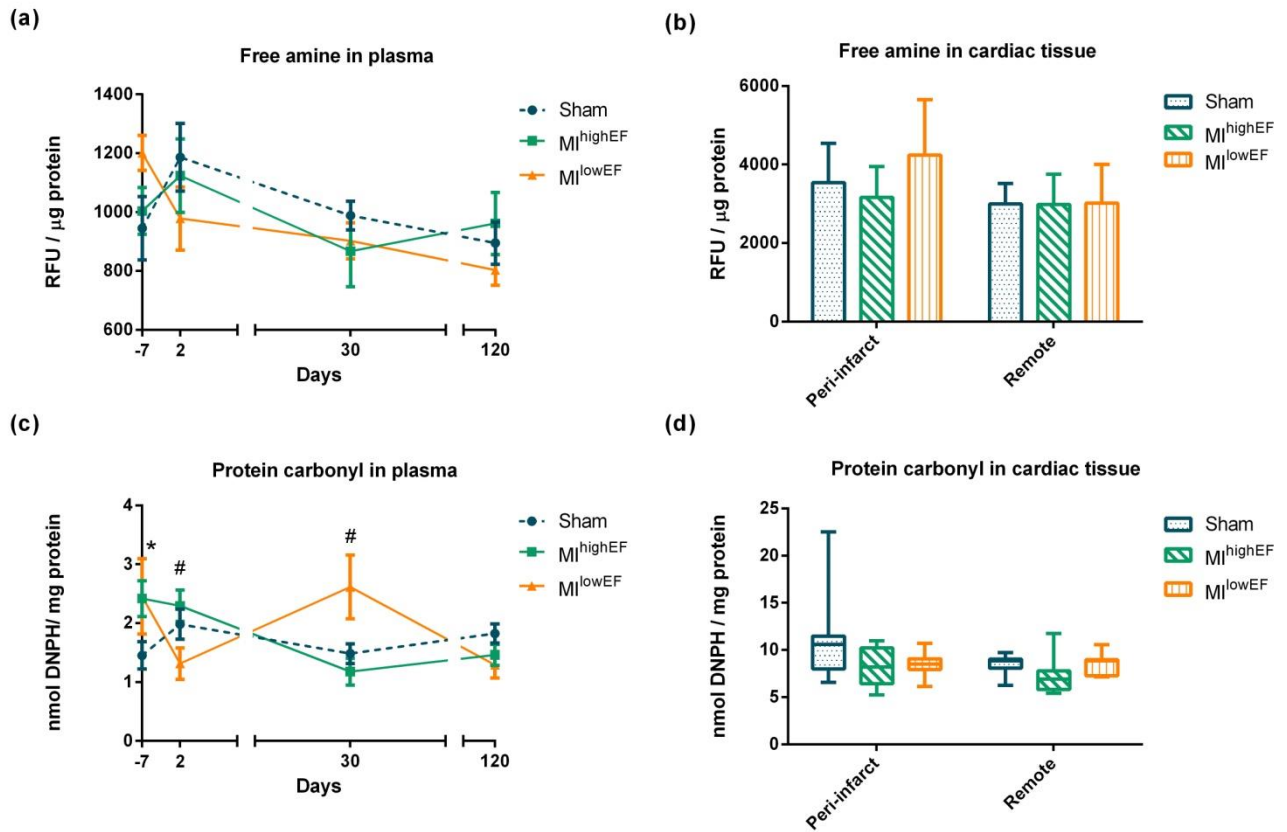


Figure 2 Reactive free amine amount and protein carbonyl. Reactive free amine in plasma (a) and in cardiac tissue (b). Protein carbonyl in plasma (c) and in cardiac tissue (d). Statistical analysis: GEE (a and c), data are expressed as mean \pm SE. ANOVA with Tukey's test (b), data are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Kruskal-Wallis with Dunn test (d), data are expressed as median \pm SE. * Difference to sham; # difference to MI^{lowEF} ($p < 0.05$; sham group, $n = 15$; MI group, $n = 7$ per group). RFU: relative fluorescence units; DNPH: 2,4-dinitrophenylhydrazine. MI^{highEF}: group with EF $> 53.7\%$ and $< 66.5\%$; MI^{lowEF}: group with EF $< 53.7\%$.

Fluorescent and yellowish-brown colored AGEs do not increase after MI

Plasma fluorescent AGE levels during follow-up did not differ between the groups (Figure 3a). Unexpectedly, yellowish-brown colored AGE plasma levels decrease in MI^{lowEF} group at 2 and 120 days after the surgery when compared with sham group (Figure 3b). In peri-infarct heart homogenate we detected a 29% decrease of yellowish-brown colored AGEs in MI^{highEF} group ($p = 0.003$) and 18% decrease in MI^{lowEF} group ($p=0.053$) compared with sham group. In remote area homogenate we detected a yellowish-brown colored AGEs decrease in MI^{lowEF} compared to MI^{highEF} group (Figure 3c). Fluorescence detection in tissue homogenates could not be performed due to lack of sensitivity of the assay to this type of sample.

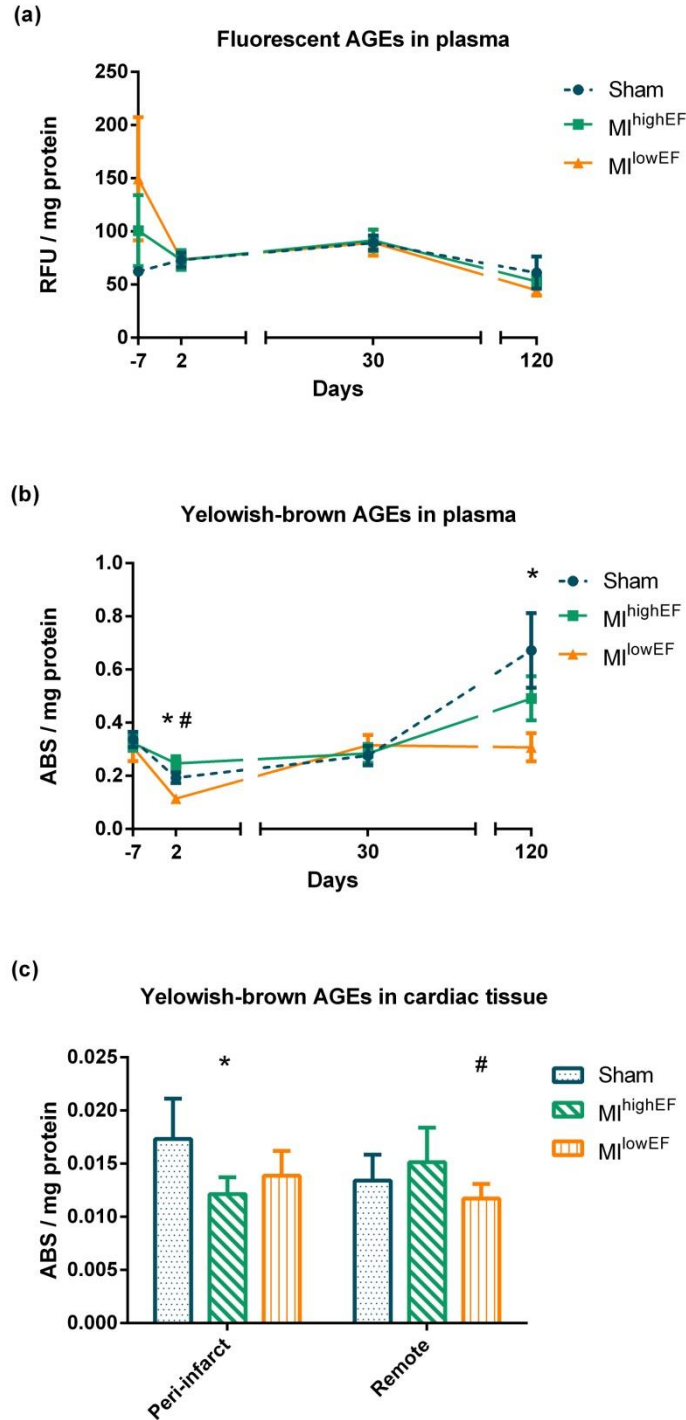


Figure 3 Levels measurement of fluorescent and yellowish-brown colored AGEs. Fluorescence in plasma (a). Absorbance in plasma (b) and in cardiac tissue - peri-infarct and remote (c). Statistical analysis: GEE (a and b), data are expressed as mean \pm SE. ANOVA with Tukey's test (c), data are expressed as mean \pm SD. * difference with sham; # difference with MI^{lowEF} ($p < 0.05$; sham group, $n = 15$; MI group, $n = 7$ per group). ABS: absorbance; RFU: relative fluorescence units. MI^{highEF}: group with EF $> 53.7\%$ and $< 66.5\%$; MI^{lowEF}: group with EF < 53.7 .

CML and CEL in plasma and tissue homogenates

No significant difference in CML or CEL plasma accumulation could be seen between the groups over the time (Figure 4a and b). In heart remote area, it was not observed difference between the groups in CML and CEL concentrations (Figure 4e and f). However, in peri-infarct, we could show a decrease in CML and CEL signals in the MI^{lowEF} group, when compared to sham group, using antibody 6D12 and 2G11 by dot blot (Figure 4c and d). CML levels in plasma and heart (peri-infarct area) detected by ELISA did not exhibited difference at the end of the follow-up, as showed in Figure 5a and b.

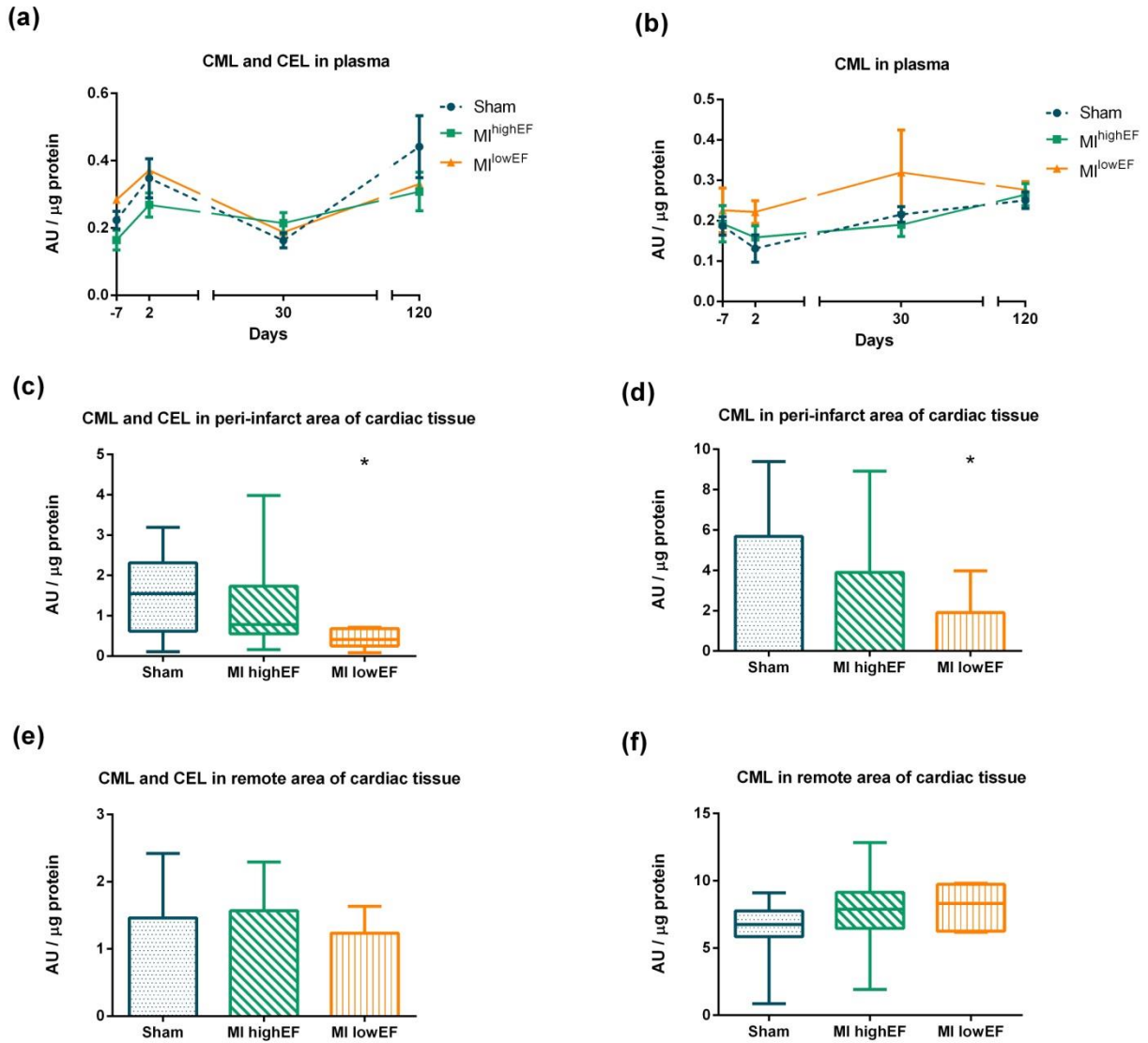


Figure 4 CML and CEL quantification by dot blot. Antibody anti-CML/CEL (6D12) was employed for AGEs immunodetection in plasma (a) and cardiac tissue - peri-infarct (c) and remote (e). Antibody anti-CML (2G11) was employed for AGEs immunodetection in plasma (b) and cardiac tissue - peri-infarct (d) and remote (f). Statistical analysis: GEE (a and b), data are expressed as mean \pm SE. Kruskal-Wallis with Dunn test (c and f), data are expressed as median \pm SE. ANOVA with Tukey's test (d and e), data are expressed as mean \pm SD (d) and geometric mean \pm 95 % CI (e). * Difference to sham ($p < 0.05$; sham group, $n = 15$; MI group, $n = 7$ per group). AU: arbitrary units. MI^{highEF}: group with EF $> 53.7\%$ and $< 66.5\%$; MI^{lowEF}: group with EF $< 53.7\%$.

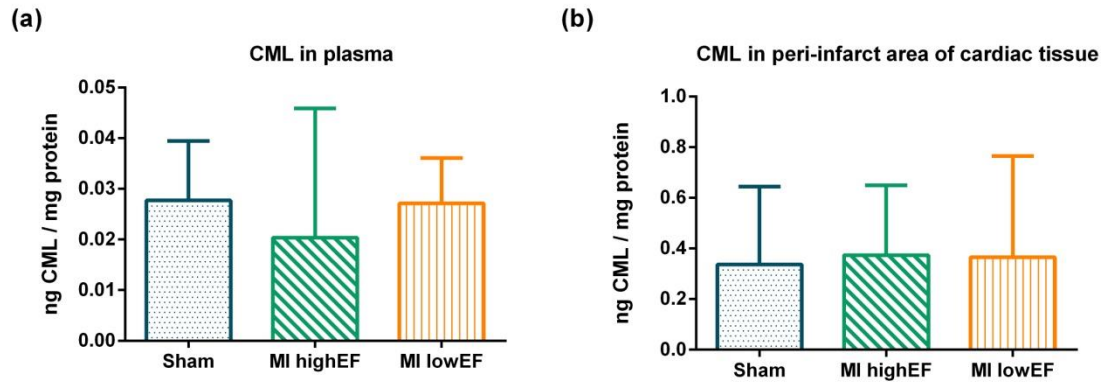


Figure 5 CML levels quantification by ELISA, 120 days post-surgery in plasma (a) and heart homogenates (b). Statistical analysis: ANOVA with Tukey's test, data are expressed as geometric mean \pm 95 % CI (a) and mean \pm SD (b) ($p < 0.05$; sham group, $n = 15$; MI group, $n = 7$ per group). MI^{highEF}: group with EF $> 53.7\%$ and $< 66.5\%$; MI^{lowEF}: group with EF $< 53.7\%$.

MI does not affect RAGE production in infarcted heart

Heart RAGE total levels did not present statistically significant difference when comparing MI groups with sham group, despite the increase of about 50% in RAGE levels for both groups (Figure 6). It was not possible to detect the RAGE presence in plasma.

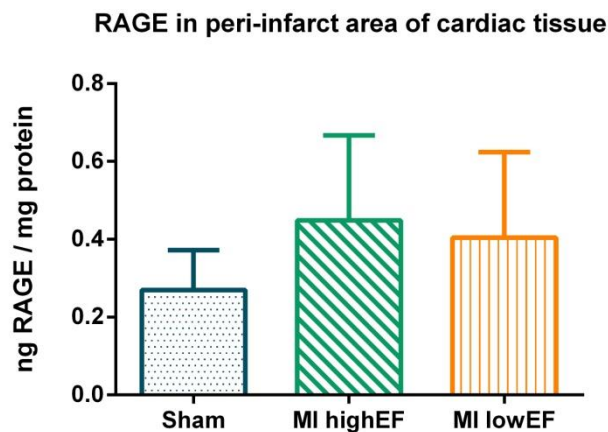


Figure 6 RAGE amount in heart homogenates by ELISA. Statistical analysis: ANOVA with Tukey's test, data are expressed as geometric mean \pm 95 % CI ($p < 0.05$; sham group, $n = 15$; MI group, $n = 7$ per group). MI^{highEF}: group with EF $> 53.7\%$ and $< 66.5\%$; MI^{lowEF}: group with EF $< 53.7\%$.

Discussion

AGEs increased levels post-infarct may predict the development of HF¹⁰. These findings indicate that anti-AGE drugs, such as pyridoxamine and aminoguanidine derivatives could be associated to HF as standard therapy^{21, 22}. However, before starting clinical studies, new therapies must undergo preclinical tests in reliable animal models. Despite the relevance of rat model of MI in preclinical studies, we have demonstrated that it does not present increased levels in plasma and heart of AGEs or RAGE with 12-week follow-up.

AGEs formation depends on the chemical reaction between a free primary amine of a protein with a reactive carbonyl sugar. Primary free amines constitute a target site for oxidative modifications (e.g. carbonyl) and glycation reaction, according to the Amadori rearrangements²³. Thus, reactive free amines decreasing and protein carbonyl increasing in biological samples can represent AGEs formation²⁴. Patients post-infarct exhibit increased levels of plasma protein carbonyl right after hospital admission, decreasing after 48 hours^{25, 26}. Using reactive free amine and carbonyl content as an index for protein damage, it was not possible to find an increase at the end of the follow-up. We also evaluated amine and carbonyl in heart homogenates and we demonstrated that a widely used MI animal model showed no increase in carbonyl levels and no decrease in reactive free amine in heart tissue, irrespective of ejection fraction and heart area.

In the same way, we could not demonstrate protein glycation in plasma by fluorescence emission, which was already demonstrated to be increased in post-MI patients and associated with the development of HF¹⁰, despite not being increased in HF patients¹¹. AGEs fluorescent detection is widely employed in biological fluids^{15, 16, 27}. AGEs can also be detected by yellowish-brown colored

compounds measurement at 340 nm absorbance recording. We have showed a signal decreasing in plasma and tissue homogenates from MI rats with higher myocardial dysfunction (MI^{lowEF}). Unfortunately, there is no data from MI patients to compare with ours.

CML is the best characterized AGE and one of the most important binding of AGEs receptor (RAGE). Furthermore, it is the main product of oxidative cleavage *in vivo* of Amadori products and has been employed as a general marker of protein glycation²⁸. In the other hand, there is less knowledge about CEL biological function. It is known that methylglyoxal is its main precursor and is often used in induction of AGEs formation²⁹. While the CML and CEL chemical structures are quite similar, their production and meaning in the HF context are distinct³⁰. Here, we have shown no increase in CEL or CML plasma levels from MI rats during the follow-up, which agrees with the previous work with ischemic heart disease patients²⁸. Also, we have not found any increase in CML and CEL in remote area of heart. Curiously, we found a decrease in CML and CEL amounts in peri-infarct area in rats with higher degree of heart dysfunction. Some studies employing immunohistochemistry and western blot have demonstrated an AGEs increase in cardiac tissue from rats subjected to MI³¹⁻³³. However, it is important to note that Amadori products might potentially convert into AGE as artifacts by high-temperature treatment of those histological sections, leading to false labeling of the samples³⁴.

RAGE plays a role in several cardiovascular diseases triggering inflammation and oxidative pathways, as biomarker and decoys to modulate RAGE-ligand, when in the form of sRAGE^{35, 36}. It has been shown that sRAGE plasma level could be a marker of severity disease in chronic ischemic HF

patients¹¹. According to one study, HF patients also have a slight increase of 14% in sRAGE plasma levels, compared to control group³⁷. In this context, we could not identify sRAGE in plasma samples, but it was found an increase of about 50% in heart homogenate RAGE levels 120 days after MI, despite not significant. Contrarily, one study with LAD ligation model in rats showed, by western blot analysis, an increased production of RAGE in the heart after 4th week up to 12th week³². We emphasize that western blot is a semi-quantitative approach and comparisons with our study must be performed with some caution.

Few studies in both humans and animals have investigated AGEs and RAGE after MI and the existing studies were not design to describe AGE and RAGE in a time course manner. Here, we present for the first time, a descriptive study of the AGEs and RAGE formation acutely and chronically after MI. Studies in humans are often concerned with the prognostic value of AGEs and RAGE for MI patients and do not provide a case-control analysis^{10, 38}. A more difficult approach is to assess AGEs and RAGE in cardiac tissue from human patients. Baidoshvili³³ et. al. described an increase of CML in hearts obtained up to 1 day after postmortem the MI event when compared with healthy hearts obtained from postmortem patients. It suggests that the presence of AGE in the cardiac tissue is a pre-existing condition and might be a cause of MI rather than a consequence. Our data reinforce this assumption since we employed an animal model free of comorbidities, environmental or behavioral factors such as atherosclerosis, diabetes, Western diet, and pollution, which are exogenous sources of AGEs.

Some technical limitation in the present study must be addressed. First, high performance liquid chromatography associated with mass spectrophotometer is considered the most accurate approach to detect AGEs, such as CML, CEL,

and pentosidine. However, having access to such equipment is still limited for some laboratories. Despite this limitation, we tried to strengthen this study employing a commercially available ELISA kit and two antibodies purified against CML and CEL. We recognize that other glycation intermediates and stable modifications should have been assessed to better characterize this animal model, however we choose to focus in the most important ones. Second, cardiac tissue should have been collected over the time to assess and characterize the AGE formation and RAGE production in myocardium during cardiac remodeling. Although RAGE levels in tissue homogenate have not increased at the end of follow-up, it would be interesting to assess whether there was some variation throughout the study, mainly in the first days after MI.

In this study we characterized the formation of AGEs and the production of RAGE over cardiac remodeling in plasma and the end of follow-up on the myocardium post-MI in Wistar rats free of comorbidities, environmental or behavioral factors. We showed that there was no increase of either 120 days monitoring. Instead, we found a decrease in the yellow- brownish AGEs, CML and CEL after MI, regardless of the degree of ventricular systolic dysfunction. Thus, we suggest that the rat MI model should be employed with caution when studying AGE-RAGE signaling axis or anti-AGE drugs.

Author contributions:

BMF and MA participated in the design of the manuscript, experiments conduction, interpretation of the studies, analysis of the data, and manuscript writing. JOR conducted experiments, interpretation of the studies and review of the manuscript. FSC, AL, VO, AP conducted experiments. AB contributed to discussion.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

None declared

References

1. McAlindon E, Bucciarelli-Ducci C, Suleiman MS, Baumbach A. Infarct size reduction in acute myocardial infarction. *Heart*. 2015;101(2):155-60.
2. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest*. 1999;104(1):103-13.
3. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15596-601.
4. Vouillarmet J, Maucort-Boulch D, Michon P, Thivolet C. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. *Diabetes Technol Ther*. 2013;15(7):601-5.
5. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2005;16(12):3687-93.
6. Andrades ME, Lorenzi R, Berger M, Guimaraes JA, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Glycolaldehyde induces fibrinogen post-translational modification, delay in clotting and resistance to enzymatic digestion. *Chem Biol Interact*. 2009;180(3):478-84.
7. Zeng J, Dunlop RA, Rodgers KJ, Davies MJ. Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols. *The Biochemical journal*. 2006;398(2):197-206.
8. Zhang F, Banker G, Liu X, Suwanabol PA, Lengfeld J, Yamanouchi D, et al. The novel function of advanced glycation end products in regulation of MMP-9 production. *J Surg Res*. 2011;171(2):871-6.
9. Ramasamy R, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and implications for the pathophysiology of heart failure. *Current heart failure reports*. 2012;9(2):107-16.

10. Raposeiras-Roubin S, Rodino-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Grigorian-Shamagian L, Garcia-Acuna JM, Aguiar-Souto P, et al. Predictive value of advanced glycation end products for the development of post-infarction heart failure: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol*. 2012;11:102.
11. Raposeiras-Roubin S, Rodino-Janeiro BK, Grigorian-Shamagian L, Moure-Gonzalez M, Seoane-Blanco A, Varela-Roman A, et al. Soluble receptor of advanced glycation end products levels are related to ischaemic aetiology and extent of coronary disease in chronic heart failure patients, independent of advanced glycation end products levels: New Roles for Soluble RAGE. *Eur J Heart Fail*. 2010;12(10):1092-100.
12. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*. 1978;90(1):57-70.
13. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ. Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:105-12.
14. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 1990;186:464-78.
15. Munch G, Keis R, Wessels A, Riederer P, Bahner U, Heidland A, et al. Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur J Clin Chem Clin*. 1997;35(9):669-77.
16. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, et al. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem*. 2004;324(1):68-78.
17. Koito W, Araki T, Horiuchi S, Nagai R. Conventional antibody against Nepsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) shows cross-reaction to Nepsilon-(carboxyethyl)lysine (CEL): immunochemical quantification of CML with a specific antibody. *Journal of biochemistry*. 2004;136(6):831-7.
18. Mera K, Nagai M, Brock JWC, Fujiwara Y, Murata T, Maruyama T, et al. Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products. *Journal of immunological methods*. 2008;334(1-2):82-90.

19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
20. Tucci PJF. Pathophysiological Characteristics of the Post-Myocardial Infarction Heart Failure Model in Rats. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*. 2011;96(5):420-4.
21. Chang KC, Hsu KL, Chou TF, Lo HM, Tseng YZ. Aminoguanidine prevents age-related deterioration in left ventricular-arterial coupling in Fisher 344 rats. *Br J Pharmacol*. 2004;142(7):1099-104.
22. Almeida F, Santos-Silva D, Rodrigues T, Matafome P, Crisostomo J, Sena C, et al. Pyridoxamine reverts methylglyoxal-induced impairment of survival pathways during heart ischemia. *Cardiovascular therapeutics*. 2013;31(6):e79-85.
23. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(12):1146-55.
24. Cebe T, Yanar K, Atukeren P, Ozan T, Kuruc AI, Kunbaz A, et al. A comprehensive study of myocardial redox homeostasis in naturally and mimetically aged rats. *Age*. 2014;36(6):9728.
25. Vidart J, Wajner SM, Leite RS, Manica A, Schaan BD, Larsen PR, et al. N-acetylcysteine administration prevents nonthyroidal illness syndrome in patients with acute myocardial infarction: a randomized clinical trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(12):4537-45.
26. Maneewong K, Mekrungruangwong T, Luangaram S, Thongsri T, Kumphune S. Combinatorial Determination of Ischemia Modified Albumin and Protein Carbonyl in the Diagnosis of NonST-Elevation Myocardial Infarction. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2011;26(4):389-95.
27. Ashraf JM, Ahmad S, Choi I, Ahmad N, Farhan M, Tatyana G, et al. Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *Iubmb Life*. 2015;67(12):897-913.

28. Ahmed KA, Muniandy S, Ismail IS. Role of N-epsilon-(Carboxymethyl)Lysine in the development of ischemic heart disease in type 2 diabetes Mellitus. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;41(2):97-105.
29. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research.* 2013;47 Suppl 1:3-27.
30. Hartog JW, Voors AA, Schalkwijk CG, Scheijen J, Smilde TD, Damman K, et al. Clinical and prognostic value of advanced glycation end-products in chronic heart failure. *European heart journal.* 2007;28(23):2879-85.
31. Cao W, Chen J, Chen Y, Chen S, Chen X, Huang H, et al. Advanced glycation end products induced immune maturation of dendritic cells controls heart failure through NF-kappaB signaling pathway. *Arch Biochem Biophys.* 2015;580:112-20.
32. Cao W, Chen J, Chen Y, Chen X, Liu P. Advanced glycation end products promote heart failure through inducing the immune maturation of dendritic cells. *Applied biochemistry and biotechnology.* 2014;172(8):4062-77.
33. Baidoshvili A, Krijnen PA, Kupreishvili K, Ciurana C, Bleeker W, Nijmeijer R, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine depositions in intramyocardial blood vessels in human and rat acute myocardial infarction: a predictor or reflection of infarction? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2006;26(11):2497-503.
34. Hayashi CM, Nagai R, Miyazaki K, Hayase F, Araki T, Ono T, et al. Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N-epsilon-(carboxymethyl) lysine by short-term heating: Possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab Invest.* 2002;82(6):795-807.
35. Cohen MM, Jr. Perspectives on RAGE signaling and its role in cardiovascular disease. *American journal of medical genetics Part A.* 2013;161A(11):2750-5.
36. Aleshin A, Ananthkrishnan R, Li Q, Rosario R, Lu Y, Qu W, et al. RAGE modulates myocardial injury consequent to LAD infarction via impact on JNK and STAT signaling in a murine model. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2008;294(4):H1823-32.

37. Boschetto P, Campo I, Stendardo M, Casimirri E, Tinelli C, Gorrini M, et al. Plasma sRAGE and N-(carboxymethyl) lysine in patients with CHF and/or COPD. *Eur J Clin Invest.* 2013;43(6):562-9.
38. Raposeiras-Roubín, S., B. K. Rodiño-Janeiro, B. Paradela-Dobarro, L. Grigorian-Shamagian, J. M. García-Acunã, P. Aguiar-Souto, M. Jacquet-Hervet, M. V. Reino-Maceiras, J. R. González-Juanatey and E. Álvarez (2013). "Fluorescent Advanced Glycation End Products and Their Soluble Receptor: The Birth of New Plasmatic Biomarkers for Risk Stratification of Acute Coronary Syndrome." *PLoS One* **8**(9): e74302.

8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de formação de AGEs e produção de RAGE tem demonstrado associação com desenvolvimento e evolução das doenças cardiovasculares. Dessa forma, apresenta-se como um alvo terapêutico para intervir na progressão destas doenças. Para entender melhor a cinética de formação dos AGEs e do seu receptor RAGE na cardiologia, este trabalho buscou explorar, por meio da pesquisa experimental com animais, se o modelo de ligação da LAD pode ser representativo para o estudo dos AGEs na isquemia e no remodelamento cardíaco.

A avaliação de níveis de AGEs neste estudo foi realizada por técnicas de espectrofotometria, espectrofluorimetria e imunodeteção e, apesar do modelo apresentar disfunção sistólica ventricular, não foi observado aumento dos níveis de AGEs em plasma e tecido cardíaco de animais 120 dias após o infarto. Mais especificamente, não foi encontrada elevação da concentração de CML, carboxietil lisina, AGEs fluorescentes e AGEs amarelo-amarronzados. Além disso, não foi identificado aumento da produção de RAGE no tecido cardíaco e no plasma após remodelamento do miocárdio. Ao contrário do esperado, em plasma e em homogenato do coração foi observado uma diminuição dos níveis de AGEs amarronzados pós-IAM. De acordo com esse achado, pela técnica de dot blot, os níveis de CML e N- ϵ -carboxietil-lisina (CEL) também estavam diminuídos no homogenato.

Desta forma, neste estudo foi possível caracterizar a formação de AGEs e a produção de RAGE ao longo do remodelamento cardíaca em plasma e no miocárdio, mostrando que não houve aumento dos mesmos até 120 dias de acompanhamento, e sim diminuição de AGEs amarronzados, CML e CEL pós-IAM, independente do grau de disfunção sistólica ventricular.

Esses resultados se diferem de pacientes pós-IAM na formação de AGEs e na produção de RAGE, provavelmente, por não apresentar exposição a fatores ambientais e comportamentais como poluição, fumo, dieta inadequada e doenças crônicas. O modelo animal não foi exposto a esses fatores que sabidamente promovem aumento de AGEs. Desta forma, sugerimos que o evento cardíaco isquêmico por si não é capaz de promover aumento de AGE e que o infarto é dependente de fontes exógenas na produção de AGEs e RAGE. Infelizmente não há estudos caso-controle imediatamente pós-IAM avaliando AGEs e RAGE para compararmos com o nosso trabalho. Entretanto, um estudo medindo AGE e RAGE em pacientes ambulatoriais com IC e sem a doença, pode ser comparado ao nosso trabalho no tempo de 120 dias. Neste estudo foi observado um aumento de CML e sRAGE em plasma nos pacientes com IC, o que não foi encontrado no nosso trabalho nos animais com IAM após 120 dias de seguimento. Estes dados corroboram com os achados anteriores e ajudam na confirmação da nossa teoria de que este aumento é decorrente de fontes exógenas e não do evento cardíaco do paciente.

Com isso, concluímos que, com o que foi avaliado neste estudo, o modelo de ligação da LAD não parece representar a formação de AGEs e RAGE após um evento isquêmico do coração que ocorre em pacientes cardiopatas por IAM. Por isso, sugerimos cautela ao utilizar esse modelo animal de IAM na avaliação do eixo de sinalização AGE-RAGE e no estudo de novas terapias anti-AGE.

Como perspectiva futura, sugerimos que a avaliação de AGEs e RAGE deva ser complementada com a análise da formação dessas estruturas no tecido cardíaco ao longo do tempo, e não apenas no final do seguimento como foi realizado nesse trabalho.