



# Avaliação do tratamento com Alagebrium (ALT 711) na disfunção miccional causada por metilglioxal em camundongos

**Palavras-Chave:** Diabetes Mellitus, AGEs, metilglioxal, bexiga urinária, alagebrium

Gabriel Alonso dos Santos- FCM Unicamp  
Prof. DR. Edson Antunes-FCM Unicamp  
Doutoranda Akila Lara de Oliveira- FCM Unicamp

## 1. INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica cuja principal característica é o aumento dos níveis de glicose no sangue, denominado hiperglicemia. Essa patologia leva a diversos sintomas e complicações<sup>1</sup>. Uma das complicações mais comuns associadas ao DM é a disfunção da bexiga diabética (DBD), que afeta mais de 50% dos pacientes diabéticos<sup>1</sup>. A fisiopatologia da DBD é multifatorial e pode incluir alterações no urotélio, músculo liso do detrusor, nervos autonômicos e vasos sanguíneos<sup>1</sup>. Na diabetes, um evento associado à hiperglicemia e que é relevante para a patogênese consiste na formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs são formados a partir de reações não enzimáticas entre compostos dicarbonílicos, como o metilglioxal (MGO), ou açúcares redutores com o grupamento amino das proteínas<sup>2</sup>. O MGO pode ser produzido por diferentes vias, predominantemente como subproduto da glicólise, e seus níveis aumentam em estados de hiperglicemia, como no caso do diabetes<sup>2</sup>. Em comparação com indivíduos saudáveis, níveis duas a quatro vezes maiores de MGO são encontrados no plasma e na urina de pacientes diabéticos<sup>2</sup>. Os AGEs podem provocar lesão tecidual por alteração na conformação e deposição de proteínas ou por ativação de vias de sinalização envolvendo seus receptores, como o receptor de produtos de glicação avançada (RAGE)<sup>2-3</sup>. O cloreto de 4,5-dimetil-3-fenaciltiazólio (ALT-711, cloreto de alagebrium) é um composto capaz de quebrar, de forma não enzimática, as ligações covalentes formadas em proteínas reticuladas (AGEs), o que permite a liberação da proteína e a manutenção de sua função<sup>3</sup>. Além disso, ele inibe diretamente a ação do MGO e a expressão do RAGE<sup>3</sup>. Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar se o composto ALT 711 reduz as concentrações sérica MGO e F-AGES, assim como a expressão de RAGE em modelo animal de DM tipo 2, evidenciando também, as alterações no comportamento miccional através da técnica de papel filtro.

## 2. METODOLOGIA

**2.1 Desenho experimental:** Camundongos C57BL/6 e B6.V-Lep ob/JUnib, fêmeas e machos, com seis semanas e meia de idade no início do tratamento, foram fornecidos pelo CEMIB. Os animais

foram alojados em condições padrões de biotério. Os procedimentos com animais e os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA-UNICAMP; Protocolo nº 5949-1/2022. Os animais foram inicialmente distribuídos aleatoriamente de acordo com seu peso corporal em (WT, magro), ob/ob and ob/ob+ALT- 711 ( $18,7 \pm 0,4$ ,  $33,4 \pm 1,6$  e  $33,7 \pm 1,5$  g, respectivamente). No grupo ob/ob+ALT-711, os camundongos receberam cloreto de alagebrium (1 mg/kg, Med Chem Express, Cat. No.: HY-106024B) diluído em água filtrada por oito semanas. Camundongos controle magro e ob/ob receberam apenas água filtrada.

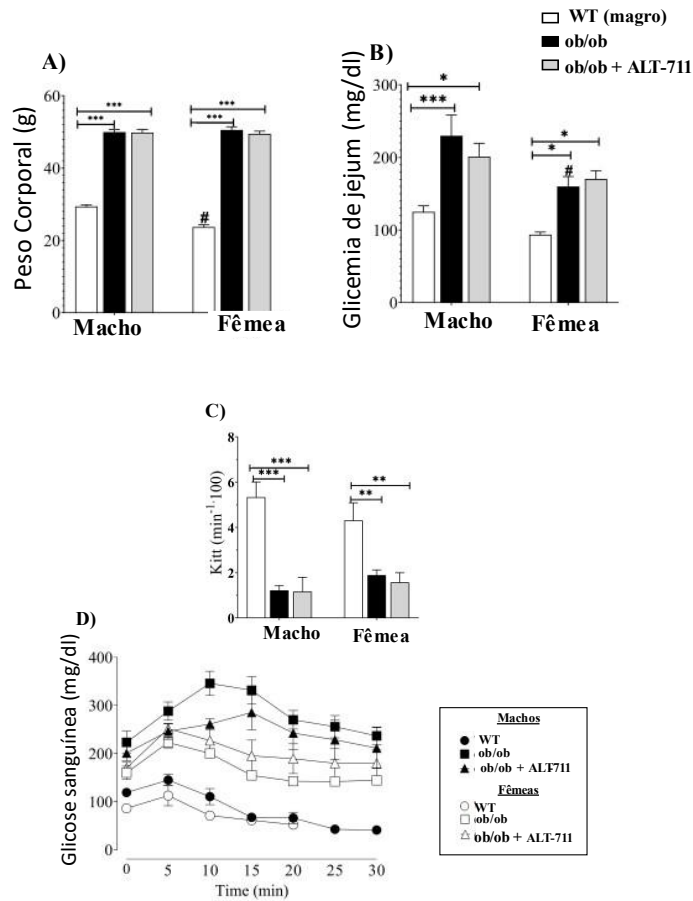
**2.2 Procedimentos experimentais:** Ao fim do tratamento, o comportamento miccional dos animais foi analisado utilizando a técnica de papel de filtro, os animais foram mantidos por 3 horas em deambulação livre sobre um papel de filtro. Ao fim do experimento o volume total, a média de volume por micção e número de micções foram contabilizadas. Para avaliação do controle glicêmico foi realizado o teste de tolerância à insulina. Posterior, foram feitas a coleta de sangue, e a coleta da bexiga para as análises morfométricas da bexiga, coloração histológica para hematoxilina e eosina, níveis de expressão proteica (ELISA) e gênica (RT-PCR) de RAGE, total de AGEs (ELISA) na bexiga e imunocoloração para MGO (Imuno-histoquímica).

### 3. RESULTADOS

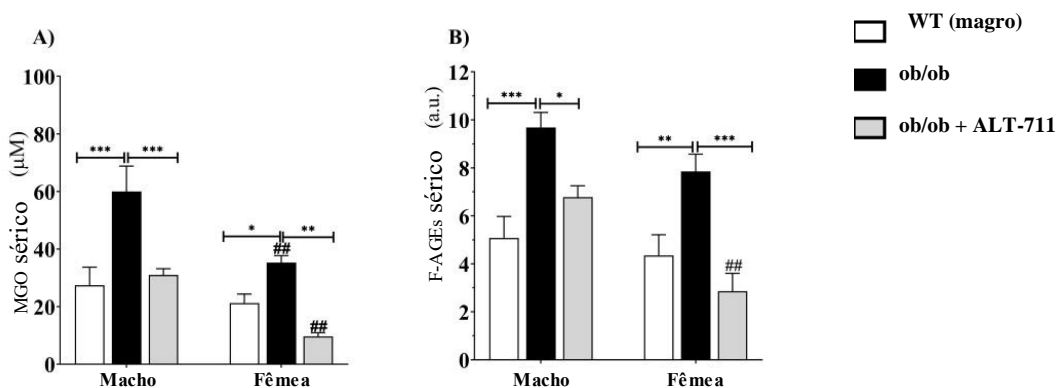
Ao final do tratamento, os animais obesos deficientes de leptina apresentaram aumento significativo do peso corporal e nos parâmetros glicêmicos em relação ao grupo controle (animais magros). O tratamento com ALT 711 não alterou o peso corporal e os parâmetros glicêmicos nos animais obesos diabéticos (Figura 1). Como também, animais obesos deficientes de leptina apresentaram aumento significativo níveis séricos de MGO e F-AGEs comparado aos animais do grupo WT (magros). O tratamento com ALT 711 reduziu significativamente ambos os parâmetros nos animais obesos deficientes de leptina (Figura 2).

Posterior, fomos investigar a expressão gênica e proteica do receptor dos AGEs, o RAGE. Ao fim do tratamento, os animais obesos deficientes de leptina apresentaram aumento significativo da expressão gênica e proteica de RAGE comparado aos animais do grupo WT (magros). O tratamento com ALT 711 reduziu significativamente ambos os parâmetros nos animais obesos deficientes de leptina (Figura 3).

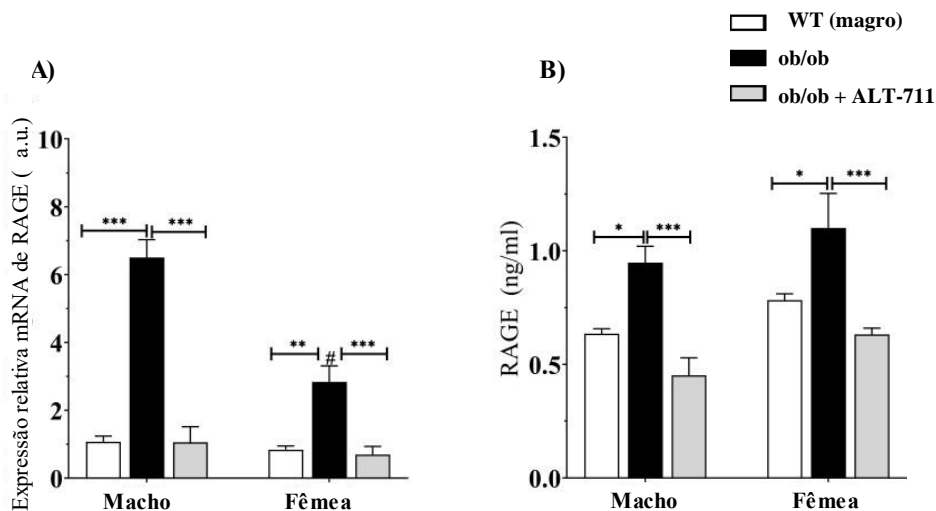
Animais obesos deficientes de leptina apresentaram aumento significativo nos níveis de AGEs totais na bexiga comparado aos animais do grupo WT (magros). A imunocoloração para MGO é aumentada no grupo ob/ob, com maior conteúdo marcado no urotélio da bexiga. O tratamento com ALT 711 reduz significativamente ambos os parâmetros nos animais obesos deficientes de leptina (Figura 4).



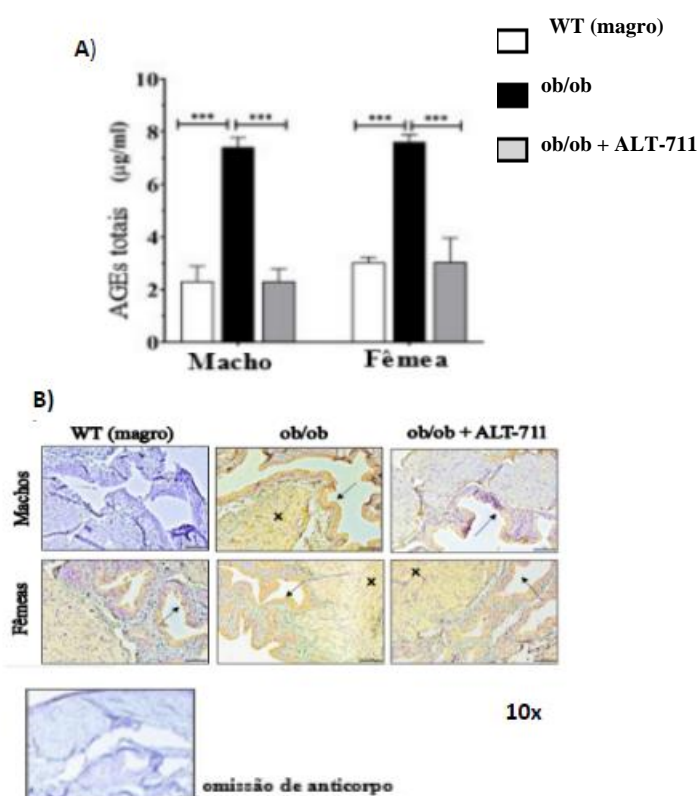
**Figura 1.** Peso corporal (A), glicemia de jejum (B), em machos e fêmeas do grupo WT (magro), ob/ob e ob/ob tratado ou não com alagebrum (ALT-711). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 13$  a  $18$  animais para peso corporal no painel A; e  $n = 5-7$  animais por grupo para parâmetros glicêmicos nos painéis B). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  entre os grupos (ANOVA two-way seguida de comparações múltiplas pelo teste post-hoc de Tukey); #  $P < 0,01$  em comparação com o respectivo grupo masculino (ANOVA two-way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni).



**Figura 2.** Níveis de metilglioxal (MGO; A) e produtos finais de glicação avançada fluorescentes (F-AGEs; B) no soro de machos e fêmeas do grupo WT, (magro), ob/ob e ob/ob tratados ou não com alagebrum (ALT-711). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 4-9$  animais em cada grupo). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida de comparações múltiplas pelo teste post-hoc de Tukey). ##  $P < 0,01$  em comparação com o respectivo grupo masculino (ANOVA two-way seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni). a.u., unidades arbitrárias.

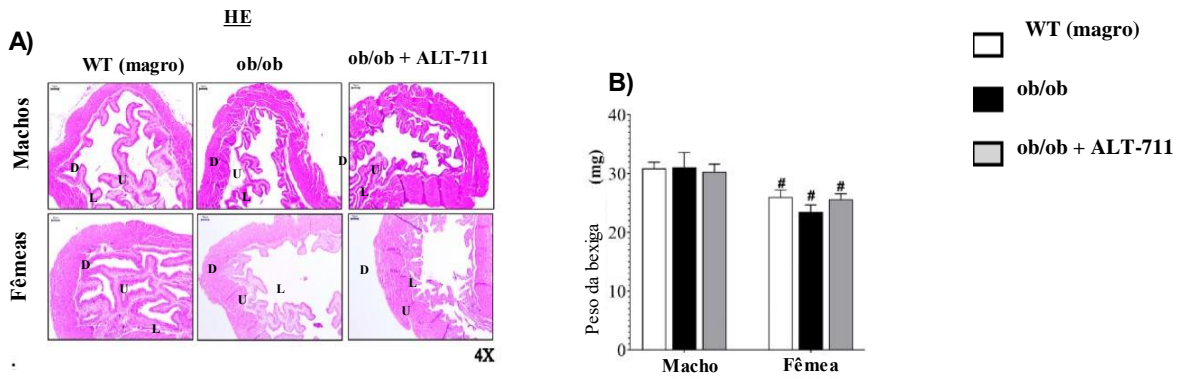


**Figura 3.** Expressão de mRNA (A) e níveis de proteína de RAGE em tecidos da bexiga de camundongos machos e fêmeas WT (magros), ob/ob e ob/ob tratados ou não com alagebrum (ALT-711). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 5-8$  animais em cada grupo). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  entre os grupos; # $P < 0,05$  em comparação com o respectivo grupo masculino (ANOVA two-way seguida de comparações múltiplas usando o teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

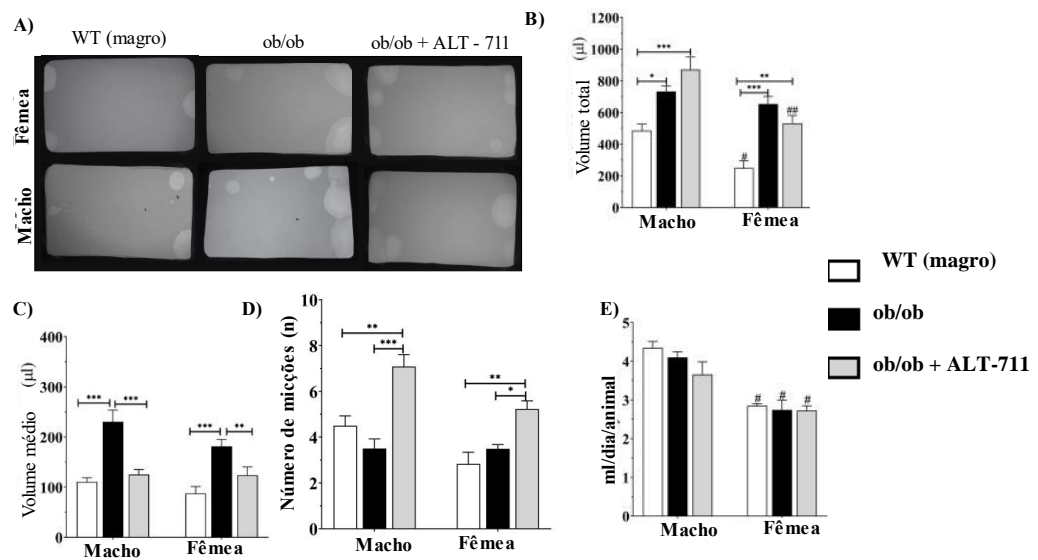


**Figura 4.** Níveis de AGEs totais (A), B) imunocoloração de MG-H1 em tecidos da bexiga de machos e fêmeas selvagens (WT, magros), ob/ob (obeso) e ob/ob tratados ou não com alagebrum (ALT-711). Em (A), níveis de AGEs totais consistindo em N-épsilon-(carboximetil)lisina (CML), dímero de lisina derivado de glicoxal (GOLD), N-épsilon-(1-carboxietil)lisina (CEL), lisina derivada de metilglicoxal dímero (MOLD), dímero de lisina derivado de 3-desoxiglicose (DOLD) e 3-desoxiglicose (3-DG) foram medidos usando um ensaio colorimétrico. Em (B), a imuno-histoquímica de MG-H1 mostra imagens representativas de cada grupo; observe aqui que a coloração de MG-H1 foi observada no urotélio (indicado por setas pretas) e no músculo liso detrusor (indicado por x) em todos os grupos, exceto no grupo masculino WT que não apresentou coloração de MG-H1). A coloração MG-H1 foi claramente aumentada nos grupos ob/ob macho e fêmeas em comparação com os outros grupos. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 5-7$  animais em cada grupo). \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  entre os grupos (ANOVA de duas vias seguida de comparações múltiplas pelo teste post-hoc de Tukey).

Não houve diferença no peso da bexiga nos animais deficientes de leptina comparado aos animais controles, o tratamento com ALT 711 não alterou este parâmetro (Figura 5). Quanto ao comportamento miccional, os animais obesos deficientes de leptina apresentam aumento significativo do volume total de micção, e do volume médio de micção sem alteração de número de micções em relação aos animais do grupo WT (magros). O tratamento com ALT 711 reduziu significativamente o volume médio de micção e aumentou o número de micções nos animais obesos deficientes de leptina. Não houve diferença de consumo de água entre os grupos (Figura 6).



**Figura 5-** Avaliações histológicas em cortes transversais de bexigas de camundongos machos e fêmeas WT, (magros), ob/ob e ob/ob tratados ou não com alagebrium (ALT-711) usando hematoxilina e eosina (H&E) coloração (A). O peso da bexiga em miligramas (mg) é apresentado em (B). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 9 - 17$  animais por grupo para peso da bexiga). #  $P < 0,05$  em relação ao respectivo grupo masculino (ANOVA two-way seguida de comparações múltiplas usando o teste de comparações múltiplas de Bonferroni). D, músculo liso detrusor; U, urotélio; e L, lúmen



**Figura 6.** Análise do comportamento de micção em machos e fêmeas de grupo WT (magros), ob/ob e ob/ob tratados ou não com alagebrium (ALT-711). O painel A mostra as imagens representativas do ensaio de papel de filtro. Os painéis B a D mostra o volume total de micção, o volume médio de micção, o número de micções, painel E mostra o consumo médio de água nos três grupos. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 7-10$  animais por grupo). \*  $P < 0,05$ , \*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  entre os grupos (ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey) #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  (painel B) em comparação com o respectivo sexo (ANOVA two-way seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

## CONCLUSÕES:

Camundongos ob/ob diabéticos exibem altos níveis de MGO, AGEs totais, RAGE no soro ou nos tecidos da bexiga e alterações do comportamento miccional, como aumento do volume total de micções, volume por micção e número de micções. O tratamento com ALT-711 reduz os níveis de MGO, AGEs, RAGE em camundongos ob/ob e modifica o padrão de micção normalizando o volume por micção e aumentando o número de micções.

## BIBLIOGRAFIA

- GOMEZ, C. S.; KANAGARAJAH, P.; GOUSSE, A. E. **Bladder Dysfunction in Patients with Diabetes.** *Current Urology Reports*, v. 12, n. 6, p. 419–426, 2011.
- THORNALLEY, P. J. **Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy.** v. 27, n. 4, p. 565–573, 1996.
- CANDIDO, R. et al. **A Breaker of Advanced Glycation End Products Attenuates Diabetes-Induced Myocardial Structural Changes.** *Circulation Research*, v. 92, n. 7, p. 785–792, 2003.