

POTENCIALIZAÇÃO DA LESÃO PULMONAR AGUDA PELO METILGLIOXAL EM CAMUNDONGOS: EFEITO PROTETOR DO ALAGEBRIUM (ALT-711)

Palavras-Chave: METILGLIOXAL (MGO), LESÃO PULMONAR AGUDA (LPA), ALAGEBRIUM (ALT-711)

Autores(as):

MELANIE DIEGUEZ DE MESQUITA, FCF – UNICAMP

Prof. Dr. EDSON ANTUNES (orientador), FCM - UNICAMP

Dr. MATHEUS LEITE DE MEDEIROS (coautor), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A lesão pulmonar aguda (LPA), também conhecida como síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), é uma insuficiência respiratória causada por sepse, pancreatite, pneumonia, entre outros, caracterizada principalmente por respiração rápida e falta de ar⁽¹⁾. O acúmulo de neutrófilos nas vias aéreas é um importante biomarcador para evidenciar este processo inflamatório⁽²⁾.

O metilglioxal (MGO) é uma dicarbonila, sintetizada, principalmente, a partir da via glicolítica⁽³⁾. É um composto extremamente reativo encontrado em altas concentrações no plasma de indivíduos pré-diabéticos, diabéticos e obesos⁽⁴⁾. Dessa forma, o MGO é atualmente reconhecido como um dos principais marcadores ligados às comorbidades do diabetes, como doenças cardiovasculares, nefropatia e hiperatividade da bexiga^(5,6,7). Cerca de 20% dos indivíduos internados em unidade de terapia intensiva (UTI) são obesos e aproximadamente 30% dos mesmos têm sobrepeso⁽⁸⁾. Modelos animais de LPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) mostram também que a hiperglicemia contribui para agravar a LPA/SDRA⁽⁹⁾. Dessa forma, acredita-se que o MGO possa ser considerado um importante marcador para LPA.

A ligação do MGO com grupamentos de amina livres de aminoácidos como lisina, arginina e cisteína, por meio de uma reação não enzimática denominada reação de Maillard, leva à formação de AGEs (advanced glycation end-products). Os principais AGEs derivados do MGO são o MG-H1 (hidroimidazolona derivada da arginina) e carboximetil lisina (CML), mas o MG-H1 é descrito como o principal AGE associado a diabetes e doença crônica renal⁽¹⁰⁾. Uma vez formados, AGEs se ligam ao receptor denominado RAGE, que pertence à superfamília de imunoglobulinas de superfície celular que reconhecem ligantes endógenos derivados de patógenos e hospedeiros para iniciar a lesão do tecido. O RAGE é altamente expresso nos pulmões, em células endoteliais e macrófagos⁽¹¹⁾. Um estudo prévio

do grupo demonstrou que a ingestão crônica de MGO em camundongos potencializa a LPA, aumentando os níveis de AGEs e a expressão de RAGE no tecido pulmonar destes animais⁽¹²⁾.

O cloreto de 4,5-dimetil-3-fenaciltiazólio (cloreto de alagebrium; ALT-711) 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 intacta e a manutenção de sua função. Ainda, o ALT-711 inibe diretamente a ação do MGO⁽¹³⁾. Estudos pré-clínicos mostraram também que o ALT-711 reduz a expressão da proteína RAGE⁽¹⁴⁾. Ainda, evidenciou-se que o tratamento de camundongos diabéticos e nocautes para a apolipoproteína E (apoE-KO) com ALT-711 reduz o acúmulo renal de AGEs, com redução de outros marcadores como albuminúria, dano estrutural, infiltração de macrófagos e expressão de TGF- β 1 e colágeno⁽¹⁵⁾. Portanto, verifica-se que o ALT-711 é um fármaco com potencial de mitigar os efeitos dos AGEs, embora ainda não haja estudos sobre seu efeito na LPA associada ao diabetes e obesidade.

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar se o composto ALT-711 é capaz de reduzir a LPA induzida por LPS em camundongos.

METODOLOGIA:

Neste estudo foram utilizados 40 camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6JUnib, com idade de 4 semanas, obtidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Todos os protocolos experimentais descritos no estudo passaram por aprovação prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNICAMP), com protocolo de nº 6197-1/2023.

Os camundongos receberam o ALT-711 na dose de 1 mg/kg/dia⁽¹⁶⁾, dissolvido em água filtrada. Inicialmente, realizou-se um tratamento por 4 semanas com 20 camundongos e em seguida repetiu-se o tratamento com outros 20 camundongos, estendendo-o por 8 semanas. Ao final do tratamento, os camundongos foram instilados intranasalmente com solução de lipopolissacarídeo (LPS) em dose 30 μ g/50 μ L, proveniente de *Escherichia coli*. Os animais controles foram instilados com solução salina (50 μ L). Seis horas após a instilação nasal, os animais foram eutanasiados utilizando-se uma caixa de vaporização com isoflurano 5% e em seguida foi feito o deslocamento cervical. Foram realizadas coletas do lavado broncoalveolar (LBA) e do tecido pulmonar por meio da laparotomia, a partir da qual a traqueia foi exposta e canulada com catéter para a realização de 5 lavagens broncoalveolares sucessivas com 300 μ L de PBS. Ao final das lavagens foram recuperados, aproximadamente, 1,5 mL de LBA por camundongo. O líquido foi centrifugado a 4 °C (500 g por 10 minutos) e o sobrenadante resultante foi coletado e ressuspenso em 200 μ L de PBS para a contagem total de células, por meio da câmara de Neubauer. A solução também foi utilizada para a produção de lâminas em citocentrífuga, a fim de realizar a contagem diferencial de leucócitos por microscopia. Essa contagem foi feita por contagem de 100 células por lâmina (em triplicata), diferenciando-se os tipos de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) por meio de características morfológicas. Para a estimativa do número total de leucócitos, o número proveniente da contagem foi multiplicado por 10 e dividido pelo

volume de LBA em questão. O LBA também foi utilizado para dosagem dos níveis de IFN- γ , IL-10 e TNF- α por meio de imunoenaios enzimáticos (DuoSet ELISA) disponíveis comercialmente. Os lobos pulmonares também foram coletados para análise histológica e quantificação de proteínas por meio de *Western Blotting* (em andamento).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de um n experimental. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações entre mais de dois grupos experimentais, seguido pelo pós-teste de *Tukey*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

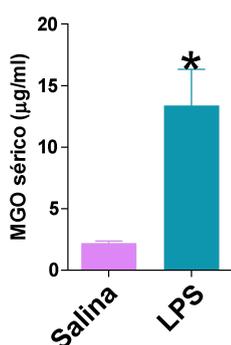


Figura 1- Níveis séricos de MGO em animais dos grupos controle (instilados com salina ou LPS por via intranasal). Após 6 horas da instilação de salina ou LPS, coletou-se o sangue de ambos os grupos. Os níveis de MGO foram medidos por ELISA. Os dados são apresentados com média \pm EPM (4-6 animais por grupo). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo salina (teste T de Student não pareado).

Camundongos instilados intranasalmente com LPS têm níveis séricos elevados de MGO em comparação ao grupo instilado com salina ($p < 0,05$; Figura 1).

Portanto, levantamos a hipótese de que a elevação do MGO sérico, como resultado do processo inflamatório, pode contribuir para a fisiopatologia da LPA. De fato, um estudo prévio demonstrou que o MGO ativa macrófagos⁽¹⁷⁾, podendo levar ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias. A partir disso, o ALT-711 foi testado, primeiramente, em camundongos normoglicêmicos, por 4 semanas de tratamento.

Os camundongos foram separados em quatro grupos: CT (animais controle, instilados com salina e não tratados); ALT-711 (animais instilados com salina e tratados com ALT-711); LPS (animais instilados com LPS e não tratados); e LPS + ALT-711 (animais instilados com LPS e tratados com ALT-711).

Notamos uma elevação significativa no número de células inflamatórias totais (Figura 2A) e de neutrófilos (Figura 2B) no grupo LPS ($p < 0,05$) em relação ao controle (CT). O número de células mononucleares não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Figura 2C). O tratamento com ALT-711 durante 4 semanas não modificou de modo significativo o número total de células inflamatórias e de células mononucleares, mas houve uma tendência de redução do número de neutrófilos (mas este não atingiu significância ao nível de $p < 0,05$).

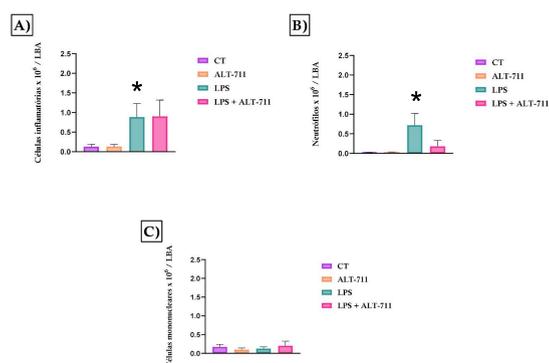


Figura 2 - Efeito do tratamento com ALT-711 por 4 semanas no número de células inflamatórias totais (A), neutrófilos (B) e células mononucleares (C) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos instilados por via intranasal com lipopolissacarídeo (LPS) ou salina. Os camundongos foram tratados ou não com ALT-711 (1mg/kg). Os dados são apresentados com média \pm EPM (5 animais por grupo). * $p < 0,05$ em comparação aos animais controles.

A partir desses dados, o período de tratamento com ALT-711 foi estendido para 8 semanas, a fim de avaliar se haveria mudança na resposta inflamatória.

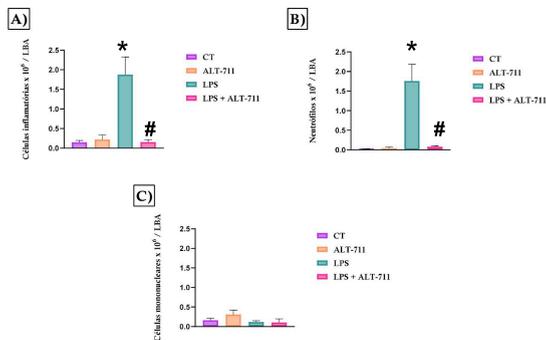


Figura 3- O tratamento com ALT-711 por 8 semanas reduz o número de células inflamatórias (A) e neutrófilos (B) no lavado broncoalveolar (LBA) de camundongos instilados por via intranasal com lipopolissacarídeo (LPS) ou salina. Os camundongos foram tratados ou não com ALT-711 (1mg/kg). O número de células mononucleares (C) não sofreu alterações estatisticamente significantes. Os dados são apresentados com média \pm EPM (5 animais por grupo). *p < 0,05 em comparação aos animais controles; #p < 0,05 em comparação ao grupo LPS.

Os dados mostraram que o tratamento com ALT-711 por 8 semanas reduziu de modo significativo o infiltrado celular em animais instilados com LPS. Visto que a instilação com LPS por si própria já eleva os níveis séricos de MGO, é possível propor que o efeito protetor do ALT-711 seja devido à sua capacidade de “quebrar” os AGEs formados no tecido pulmonar ou de diretamente inativar o MGO no sangue (ou ambos os fenômenos). Um dado interessante apresentado neste resumo é que o ALT-711 parece demandar um tempo de tratamento maior para interferir na resposta inflamatória, visto que somente o tratamento de 8 semanas foi capaz de reduzir significativamente o influxo inflamatório no LBA dos animais. É possível que essa diferença entre 4 e 8 semanas de tratamento com ALT-711 reflita a farmacocinética desta droga em camundongos, particularmente em relação à sua absorção sistêmica. É também possível que o mecanismo “anti-glicante” do ALT-711 no organismo seja muito lento, precisando de 8 semanas de tratamento para desfazer as ligações cruzadas das proteínas.

Também foram realizados três imunoenaios para a realização da dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , IL-10 e TNF- α) presentes na cascata de inflamação da lesão pulmonar aguda, a fim de verificar se há interferência do ALT-711 na concentração destas citocinas no LBA. Em relação ao grupo controle, a instilação com LPS elevou de modo significativo os níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar (protocolos de 4 e 8 semanas), mas o tratamento com ALT-711 não modificou esse parâmetro (Figuras 4C e F). Os níveis de IL-10 e IFN- γ não modificaram nem pela instilação com LPS nem pelo tratamento com ALT-711.

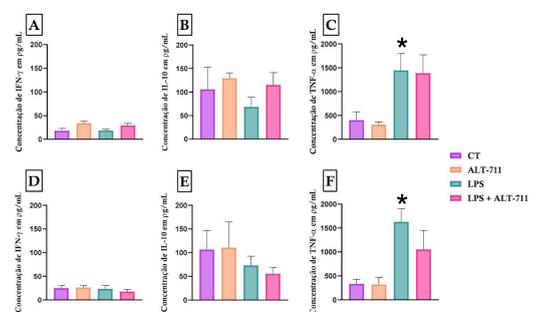


Figura 4 - Níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ (A e D), IL-10 (B e E) e TNF- α (C e F) no lavado broncoalveolar (LBA) 6 horas após a exposição ao LPS (ou instilação com solução salina) de animais tratados com ALT-711 por 4 semanas (A, B e C) ou 8 semanas (D, E e F). Os dados estão apresentados com média \pm EPM (5 animais por grupo). *p < 0,05 em comparação aos animais controles.

CONCLUSÕES:

Nossos resultados indicam que o ALT-711 tem potencial terapêutico na LPA, uma vez que reduz de modo significativo o influxo neutrofílico pulmonar e a produção de TNF- α , quando a droga foi empregada por 8 semanas. Acreditamos que o efeito protetor pulmonar do ALT-711 esteja ligado à redução dos níveis de MGO, AGEs e RAGE no tecido pulmonar dos animais, o que poderá ser comprovado na próxima etapa do projeto.

BIBLIOGRAFIA

1. BELLANI, G., et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. **JAMA**, v. 315, p. 788–800, 2016.
2. LEE, L., et al. Neutrophil activation and acute lung injury. **Curr Opin Crit Care**, Ontario, v. 7, p. 1-7, 2001.
3. MASTERJOHN, C., et al. Dietary fructose feeding increases adipose methylglyoxal accumulation in rats in association with low expression and activity of glyoxalase-2. **Nutrients**, Storrs, v. 5, p. 3311-28, 2013.
4. OGAWA, S., et al. Methylglyoxal is a predictor in type 2 diabetic patients of intima-media thickening and elevation of blood pressure. **Hypertension**, Sendai, v. 56, p. 471–6, 2010.
5. HANSSEN, N.M.J, et al. Higher plasma methylglyoxal levels are associated with incident cardiovascular disease and mortality in individuals with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, Maastricht, v. 41, p.1689–95, 2018.
6. LEE, J.H., et al. Effect of Cysteine on Methylglyoxal-Induced Renal Damage in Mesangial Cells. **Cells**, Incheon, v. 9, p. 234, 2020.
7. OLIVEIRA, M.G., et al. Methylglyoxal, a Reactive Glucose Metabolite, Induces Bladder Overactivity in Addition to Inflammation in Mice. **Front Physiol**, Campinas, p. 111-11, 2020.
8. HAN, S., et al. The acute respiratory distress syndrome: From mechanism to translation. **J Immunol**, v.194, p. 855–860, 2015.
9. DENG, J., et al. An increase in alveolar fluid clearance induced by hyperinsulinemia in obese rats with LPS-induced acute lung injury. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 279, 2020.
10. RABBANI, N., et al. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. **Kidney Int**, v. 93, p. 803-13, 2018.
11. HOLLENBACH, M. The role of glyoxalase-I (Glo-I), advanced glycation end products (AGEs), and their receptor (RAGE) in chronic liver disease and hepato cellular carcinoma (HCC). **Int J Mol Sci**, v. 18, p. 246-6, 2017.
12. MEDEIROS, M.L., et al. Methylglyoxal Exacerbates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury via RAGE-Induced ROS Generation: Protective Effects of Metformin. **J Inflamm Res**, v. 2, p. 6477-89, 2021.
13. KIM, T., et al. The unique reactivity of N-phenacyl-derived thiazolium salts toward α -dicarbonyl compounds. **Rejuvenation Res**, v. 16, p. 43-50, 2013.
14. CANDIDO, R., et al. A breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. **Circ Res**, v. 18, p. 785-92, 2003.
15. LASSILA, M., et al. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-knockout mouse: role of advanced glycation end products. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, p. 2125-38, 2004.
16. OLIVEIRA A.L., et al. Evidence that methylglyoxal and receptor for advanced glycation end products are implicated in bladder dysfunction of obese diabetic ob/ob mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 325, 2023.
17. PRATNER, D., et al. Classically activated mouse macrophages produce methylglyoxal that induces a TLR4- and RAGE-independent proinflammatory response. **J Leukoc Biol**, v. 109, p. 605–19, 2021.