

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

EFEITO DO GLICOLALDEÍDO SOBRE PARÂMETROS DE COAGULAÇÃO E
DANOS PROTEICOS

Doutorando: Michael Everton Andrades

Orientador: Dr. Felipe Dal-Pizzol

Co-orientador: José Cláudio Fonseca Moreira

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica, como requisito para obtenção do
grau de Doutor em Bioquímica.

Porto Alegre, 2010

Esse trabalho foi realizado no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradecimentos:

Aos professores José Cláudio Fonseca Moreira e Felipe Dal-Pizzol, que foram excelentes professores e orientadores;

Aos colegas e amigos do laboratório;

Aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica;

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica;

A minha família;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

PARTE 1	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Diabetes como uma condição pró-trombótica.....	5
1.2. O Sistema Hemostático.....	7
1.2.1. Via intrínseca e Via extrínseca.....	8
1.2.2. Trombina e fibrinogênio.....	10
1.2.3. Eliminação de coágulos – fibrinólise	13
1.2.4. Plaquetas	14
1.2.5. Endotélio.....	15
1.3. Glicação	15
1.3.1. Drogas anti-AGE.....	17
1.3.1.1. Quelantes de carbonil.....	17
1.3.1.2. AGE-breakers.....	18
1.3.1.3. Bloquadores de RAGE.....	18
1.3.2. Glicolaldeído.....	19
2. OBJETIVO.....	22
Objetivo específico 1.....	22
Objetivo específico 2.....	22
PARTE 2	23
ARTIGO 1	
GLYCOLALDEHYDE INDUCES FIBRINOGEN POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION, DELAY IN CLOTTING AND RESISTANCE TO ENZYMATIC DIGESTION.....	24
ARTIGO 2	
RATS TREATED WITH GLYCOLALDEHYDE DISPLAY PROTHROMBOTIC PROFILE AND FIBRINOGEN GLYCATION.....	32

PARTE 3	55
3. DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES.....	65
PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

PARTE 1

Resumo

Pacientes diabéticos tipo 2 apresentam risco de 3 à 5 vezes maior de sofrer infarto do miocárdio do que indivíduos não diabéticos, sendo que 75% desses pacientes morrem de complicações aterotrombóticas. Os mecanismos que levam o indivíduo a apresentar esse perfil pró-trombótico incluem danos ao endotélio, liberação de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo, ativação da cascata de coagulação e das plaquetas. As proteínas da cascata de coagulação e as plaquetas são os principais atores do controle do balanço anti/pró-coagulante. A cascata de coagulação pode ser ativada por dano ao endotélio ou por liberação de fatores, como o Fator Tecidual. Essa cascata culmina com a ativação da enzima trombina, que cliva o fibrinogênio e permite sua polimerização e deposição na forma de fibrina. A trombina também participa da ativação das plaquetas. Outros mecanismos têm sido propostos na tentativa de entender as causas do perfil pró-trombótico apresentado por indivíduos diabéticos. A geração Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês *Advanced Glycation End-Products – AGE*) nesses indivíduos tem sido frequentemente relatada como importante fator. Os AGE são modificações pós-traducionais encontradas em proteínas e têm origem em uma reação não-enzimática entre uma proteína e um açúcar redutor, ou com um aldeído reativo. Durante o diabetes a hiperglicemia é considerada a principal fonte de geração de AGE, mas a participação de outros aldeídos reativos, como o metilglioxal e o glicolaldeído (GA) também são de grande importância. O processo de glicação pode levar a duas situações no organismo: a) alteração na estrutura da proteína com consequente alteração da sua função; b) a geração de moléculas sinalizadoras (AGE) com potencial pró-inflamatório e pró-trombótico. Estudos recentes demonstraram que os AGE podem causar a ativação de plaquetas e promover a liberação de Fator Tecidual por monócitos e células endoteliais. Muitos estudos têm sido realizados com a intenção de entender o papel dos AGE sobre a coagulação, no entanto, faltam dados sobre os efeitos dos seus precursores (açúcares e aldeídos reativos) na modulação da hemostasia. Nesta tese, demonstramos que o GA é capaz de reagir com proteínas plasmáticas *in vitro*, levando a um aumento nos níveis de carbonil. Os coágulos formados a partir de plasma incubado com GA apresentaram-se resistentes à ação proteolítica. O GA teve os mesmos efeitos quando incubado com o fibrinogênio purificado, indicando que essa proteína é um alvo importante no desequilíbrio hemostático causado pelo aldeído. Para avaliar se o aumento dos níveis do GA é relevante *in vivo*, ratos Wistar adultos foram injetados com esse aldeído. Verificou-se aumento na oxidação de proteínas (carbonil e sulfidril) e um encurtamento no tempo necessário para a coagulação do plasma, indicando um perfil pró-trombótico. Após o isolamento do fibrinogênio desses ratos, foi identificada a formação de CML e um atraso no tempo necessário para a fibrina polimerizar. Os nossos resultados indicam que o GA pode danificar diretamente o fibrinogênio e contribuir para os efeitos pró-trombóticos vistos em algumas enfermidades. Ainda, os efeitos do GA *in vivo* não se restringem apenas às proteínas da cascata de coagulação sendo necessária a avaliação dos efeitos do GA sobre as células envolvidas com os processos de coagulação (plaquetas e células endoteliais).

Abstract

The risk of myocardial infarction is 3-5 folds higher in type 2 diabetic patients than in healthy subjects. Seventy five percent of these patients die with atherothrombotic complications. The mechanisms behind this prothrombotic profile include endothelial damage, cytokine release, oxidative stress, coagulation and platelet activation. The balance between anti/pro-coagulant is controlled mainly by proteins of coagulation cascade and platelets. Coagulation can be triggered by endothelial damage or by factors release, such as Tissue Factor. This cascade ends with thrombin activation, which act upon fibrinogen and allows its polymerization in the insoluble form fibrin. Moreover, thrombin also may activate platelets. Several mechanisms have been proposed in order to explain the underlying factor responsible for prothrombotic profile seen in diabetes. The generation of Advanced Glycation End-products (AGE) in these patients has been often described as an important factor. AGE are post-translational modifications found in proteins that have origin in a non-enzymatic reaction between a protein and a sugar (or reactive aldehydes). During the diabetes, the hyperglycaemia is believed to be the main agent of protein glycation. The role of reactive aldehydes, such as methylglyoxal and glycolaldehyde (GA) are important too. Glycation can lead to a two main events in organism: a) alteration in protein configuration, with change of function; b) generation of a class of signaling molecules (AGE), which may trigger the pro-inflammatory and pro-thrombotic events. Recent studies have revealed that AGE can cause platelet activation and induce Tissue Factor release from monocytes and endothelial cells. A lot of studies have been developed to understand the role of AGE in coagulation, although few have studied the glycation precursors on hemostasis. Here we show that GA is able in reacting with plasma proteins *in vitro* leading to generation of protein carbonyl. The clots generated from GA-incubated plasma were resistant to proteolysis. The incubation of purified fibrinogen in presence of GA revealed the same profile than we saw in whole plasma, suggesting the importance of this protein in the hemostatic dysfunction induced by GA. To evaluate if the increased levels of GA is relevant *in vivo*, Wistar rats were injected with the aldehyde and plasma was evaluated. Plasma proteins showed increase in oxidative damage (carbonyl and sulfhydryl) whereas the time necessary to plasma to clot shortened, suggesting a prothrombotic profile. The purification of fibrinogen from GA-injected rats revealed that there was an increase in generation of CML, evaluated by western blot. Moreover, there was a delay in the time necessary to fibrin polymerization in a system containing isolated fibrinogen. Our results suggest that GA can directly damage fibrinogen and thus, contribute to prothrombotic effects seen in some diseases. Moreover, the *in vivo* effects of GA are not only restricted to the coagulation cascade proteins. More studies are necessary to evaluate the effects of GA on cell that participate in coagulation regulation (e.g. platelets and endothelial cells).

Abreviaturas

AGE – Produtos Finais de Glicação Avançada (*Advanced Glycation End-Products*)

AMG – Aminoguanidina

CEL - N^{ϵ} -(carboxietil)lisina

CMA - N^{ω} (carboximetil)arginina

CMC – S-(carboximetil)cisteína

CML – N^{ϵ} -(carboximetil)lisina

GA – glicolaldeído

iNOS – Oxido Nítrico Sintase induzível

IL – interleucina

i.p. – intra peritoneal

i.v. – intra venoso

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócito 1

NOS – Oxido Nítrico Sintase

PAI-1 – Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1

RAGE – Receptor de AGE

t-PA – Ativador de Plasminogênio tecidual

VCAM-1 – Molécula de Adesão Celular Vascular – 1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes como uma condição pró-trombótica

O diabetes mellitus tipo 2 ocupa posição de epidemia mundial, atingindo cerca de 177 milhões de pessoas no mundo todo. O prognóstico, feito pela Organização Mundial da Saúde é que 300 milhões de pessoas sofram de diabetes até 2025 (KING *et al.*, 1998). No Brasil, o estudo Multicêntrico Sobre Prevalência de Diabetes Mellitus encontrou uma prevalência geral da doença de 7,6% em pessoas de 30 à 69 anos. Destas, metade não sabiam que possuíam a doença e, das já diagnosticadas, 22% não faziam tratamento (MALERBI e FRANCO, 1992).

Dentre as características compartilhadas pelos pacientes, está a hiperglicemia, a resistência à insulina, a dislipidemia, a presença de estresse oxidativo, o processo inflamatório e a glicação de proteínas. Coletivamente, essas características colaboram para o desenvolvimento de outra, a característica pró-coagulante do sangue desses pacientes (CARR, 2001; GRANT, 2007). O diabetes está associado ao aumento da mortalidade e ao desenvolvimento de doenças micro e macrovasculares, bem como de neuropatias. É a causa de cegueira, insuficiência renal e amputação de membros, causando expressivos gastos em saúde pública, além da diminuição na qualidade e expectativa de vida do paciente (ASSUNCAO *et al.*, 2001). O diabetes é um fator de risco reconhecido para o desenvolvimento de doenças ateroscleróticas, infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais (CARR, 2001). O risco de infarto do miocárdio é de 3 a 5 vezes maior em indivíduos

diabéticos tipo 2 do que em não diabéticos sendo que 75% dos pacientes diabéticos morrem com complicações cardiovasculares (CARR, 2001; GRANT, 2007). Em testes laboratoriais, o plasma de diabéticos também se mostra pró-coagulante, uma vez que os tempos necessários para o plasma coagular *in vitro* se apresentam encurtados (CARR, 2001).

Diversos fatores contribuem para esse perfil, como o aumento da concentração do fibrinogênio e do fator tecidual, diminuição de fatores anticoagulantes (proteína C, PAI-1), dano ao endotélio e aumento da reatividade plaquetária (CARR, 2001; GRANT, 2007). Em um estudo em humanos, onde se variou as concentrações plasmáticas de glicose e insulina de forma independente ou combinada, verificou-se que a hiperglicemia *per se* está implicada no aumento de fatores pró-coagulantes (complexo trombina:anti-trombina e fator tecidual), independente dos níveis de insulina. No mesmo estudo, verificou-se que a hiperinsulinemia *per se* está envolvida com a inibição da fibrinólise, através do aumento do PAI-1 e diminuição da atividade do plasminogênio, independente dos níveis de glicose (STEGENGA *et al.*, 2006).

O endotélio vascular desempenha importante papel no controle da hemostasia. Funciona como uma barreira física, medeia o tônus vascular e interage com proteínas e células para regular a adesão leucocitária e plaquetária (GRANT, 2007). O desenvolvimento da disfunção endotelial promove inflamação e trombose - eventos precoces na formação da doença aterosclerótica (GRANT, 2007). A hiperglicemia experimental se mostrou capaz de causar danos ao endotélio, levando à ativação da cascata de coagulação (NIEUWDORP *et al.*, 2006).

A hiperfunção plaquetária também parece contribuir para a condição pró-trombótica observada no diabetes. Apesar de a contagem plaquetária não diferir de sujeitos saudáveis, pacientes diabéticos apresentam agregados plaquetários circulantes e altos níveis de marcadores de ativação plaquetária no plasma (CARR, 2001).

Características físicas e químicas do fibrinogênio e da fibrina em diabéticos têm sido relatadas como fatores importantes na determinação do aspecto pró-trombótico. Sabe-se que a fibrina formada a partir de fibrinogênio de diabéticos apresenta-se mais densa, menos porosa e mais resistente à ação da plasmina do que em indivíduos saudáveis (CARR, 2001; DUNN *et al.*, 2005). A consequência é a geração de trombos persistentes que podem embolizar microvasos, levando à isquemia de órgãos e contribuindo para o agravamento da doença. Os mecanismos envolvidos ainda não são bem esclarecidos, mas o aumento da compactação do coágulo com uma consequente redução na sua permeabilidade, o aumento da ligação de Inibidor de Plasmina e a diminuição da ligação de plasminogênio e t-PA na fibrina já foram descritos (DUNN *et al.*, 2006). Resíduos de lisina, que são fundamentais no processo de ligação do plasminogênio e do t-PA na fibrina, apresentam modificações - oxidação, glicação – o que acarreta em resistência à fibrinólise (BOBBINK *et al.*, 1997).

1.2. O Sistema Hemostático

O sistema hemostático é o responsável pela manutenção do sangue dentro dos vasos, evitando a sua perda quando existe um dano.

Simultaneamente à ativação do sistema hemostático, existe a ativação de um sistema para evitar a formação demasiada de trombos, bem como para limitar a sua formação à região da lesão. Esse equilíbrio é mantido pelo balanço entre um sistema pró-coagulante e um sistema anti-coagulante. O sistema pró-coagulante é constituído por: 1) constrição vascular; 2) agregação plaquetária; 3) coagulação sanguínea com a polimerização da fibrina e 4) recuperação do tecido lesado. Já o sistema anti-coagulante é constituído por proteínas e enzimas que contrapõe o primeiro sistema, agindo tanto no bloqueio da sinalização pró-coagulante quanto na remoção de coágulos formados.

As proteínas do sistema hemostático estão constantemente presente na corrente sanguínea na forma inativa, ou zimogênica. A ativação inicial da coagulação se deve a um estímulo, como uma lesão, e após sucessivas ativações acontece a formação do coágulo, responsável final por estancar sangramentos (GUYTON e HALL, 2005).

1.2.1. Via intrínseca e Via extrínseca

Em 1964 foi proposto o modelo de cascata para explicar a fisiologia da coagulação (DAVIE e RATNOFF, 1964; MACFARLANE, 1964). Nesse modelo, uma sucessão de ativações de zimogênios acontece até que o fibrinogênio possa ser convertido em fibrina. Esse esquema divide a coagulação em duas vias: a intrínseca e a extrínseca. Essas vias são apresentadas separadamente apenas por conveniência didática, uma vez que acontecem simultaneamente. A via intrínseca pode ser disparada por contato com o colágeno em regiões onde o endotélio foi removido. Já a via extrínseca pode ser ativada por presença de

Fator Tecidual, liberado por células endoteliais danificadas (GUYTON e HALL, 2005). As duas vias culminam com a ativação da enzima trombina, responsável por catalisar a polimerização da fibrina. Além de catalisar a polimerização da fibrina, a trombina também desempenha um papel de potencializador da coagulação, uma vez que cataliza a ativação do fator V (na via extrínseca), do fator XIII (na via intrínseca), a conversão de pro-trombina em trombina e a ativação plaquetária (GUYTON e HALL, 2005). Esse mecanismo de reforço positivo existe para que a coagulação atinja a hemostasia no menor tempo possível.

Um esquema didático da cascata da coagulação pode ser visto na figura 1.

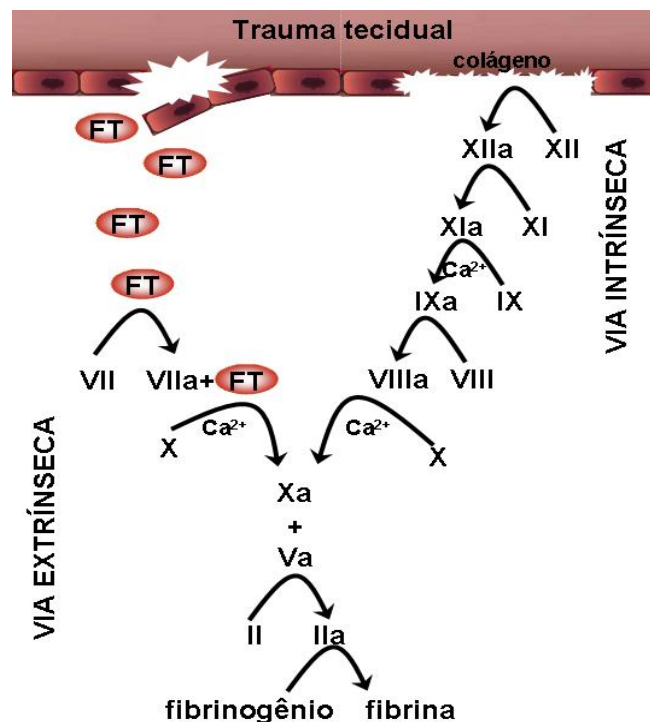


Figura 1: Ativação das vias extrínseca e intrínseca após lesão tecidual com remoção do endotélio. A liberação do fator tecidual (NIEUWDORP *et al.*) é responsável pela ativação da via extrínseca, enquanto que a exposição de colágeno na lâmina basal é responsável pela ativação da via intrínseca. As duas vias convergem para a ativação da trombina (fator IIa). A ação da trombina sobre o fibrinogênio leva a polimerização da fibrina. Adaptado de GUYTON e HALL, 2005.

1.2.2. Trombina e fibrinogênio

A trombina, também conhecida como fator IIa, circula no sangue como protrombina (fator II). Sua produção acontece no fígado, de forma contínua, uma vez que está sendo continuamente utilizada. Se a função hepática é deficiente, os níveis de pró-trombina diminuem e podem comprometer o sistema hemostático. Além do fibrinogênio, diversos outros fatores de coagulação são seus substratos, como os fatores V e VIII (GUYTON e HALL, 2005). Ainda, a trombina pode ativar plaquetas, endotélio e estimular o sistema inflamatório, através da ativação de receptores ativados por proteases (PAR, do inglês *Protease Activated Receptors*). A ativação desses receptores desencadeia o desenvolvimento de características pró-inflamatórias, como a secreção de interleucinas e a expressão de moléculas de adesão (SCHOUTEN *et al.*, 2008).

O fibrinogênio é uma proteína solúvel, abundante no plasma (valores de referência: de 1,5 à 3,7mg/mL), constituída de duas cadeias alfa, beta e gama, ligadas por pontes dissulfeto (MOSESSON, 2005). A união das cadeias forma um domínio E (central) com dois domínios D, externamente localizados (MOSESSON, 2005).

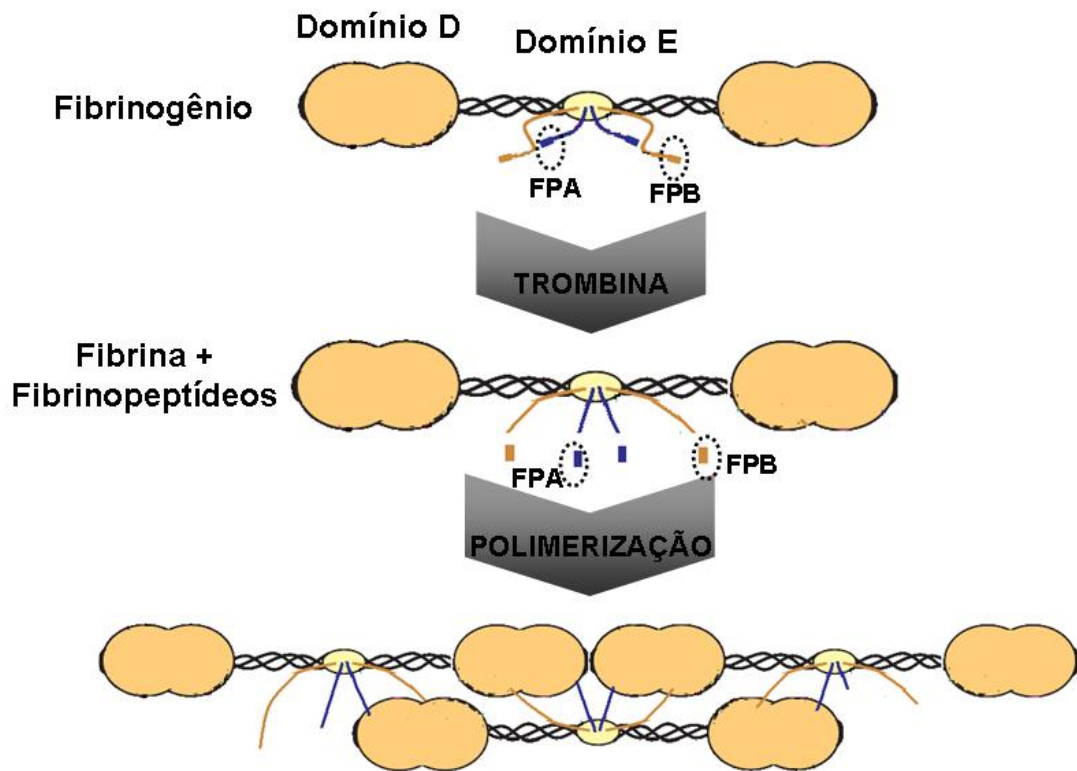


Figura 2: Estrutura do fibrinogênio (acima), composto por duas cadeias alfa, duas beta e duas gama, unidas por pontes dissulfeto. A ação da trombina sobre os fibrinopeptídeos A e B permite a sua liberação e a formação da fibrina. Figura adaptada de MOSESSON, 2005.

As cadeias alfa e beta contém um peptídeo na sua porção N-terminal, chamado de fibrinopeptídeo A e B, respectivamente. Esses peptídeos são clivados e liberados do fibrinogênio pela trombina, expondo sítios de polimerização que permitem o alinhamento de duas moléculas de fibrina. O sítio de clivagem do fibrinopeptídeo A e B pela trombina é após a arginina localizada na posição 16. Mutações nessa posição levam a um retardo na velocidade de polimerização e a uma mudança na arquitetura do coágulo com eventual resistência à fibrinólise (FLOOD *et al.*, 2006). De fato, a velocidade da clivagem dos fibrinopeptídeos já foi descrita como um fator importante na determinação da arquitetura da rede de fibrina (GABRIEL *et al.*, 1992;

MOSESSON, 2005).

Inicialmente, a polimerização da fibrina se dá pelo alinhamento antiparalelo de duas moléculas de fibrina, conforme demonstrado na figura 2. A continuidade desse processo permite o crescimento longitudinal de uma fibrila. A associação lateral de duas fibrilas permite o espessamento da fibra de fibrina e é chamado de junção bilateral (MOSESSON, 2005). A associação de três moléculas de fibrina cria pontos de ramificação, e é chamado de junção equilateral (MOSESSON, 2005). O processo de polimerização e ramificação pode ser visualizado na figura 3.

A estabilidade da fibrina é alcançada pela ação do fator XIIIa, uma transglutaminase capaz de fazer ligações covalentes entre as subunidades gama de duas moléculas de fibrinogênio alinhadas (MOSESSON, 2005).

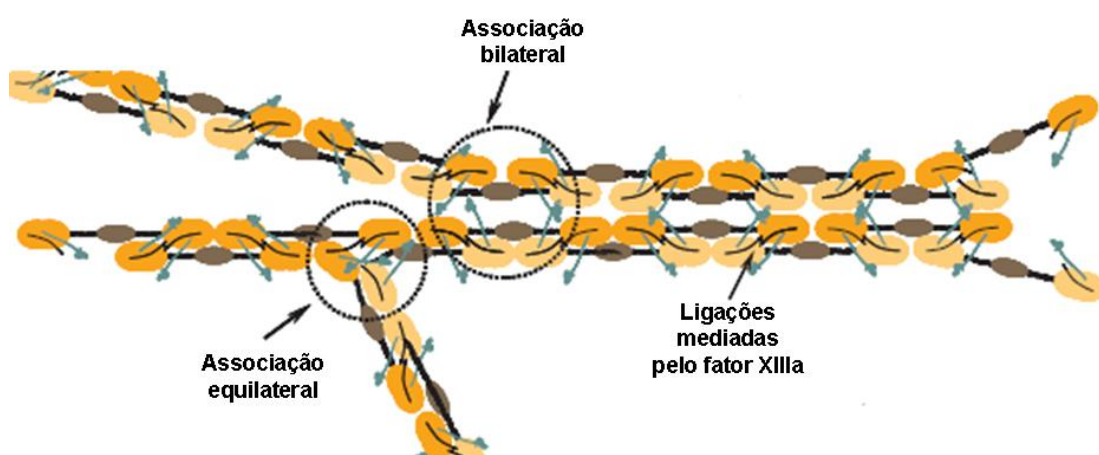


Figura 3: Processo de polimerização da fibrina. A associação entre quatro moléculas de fibrina é chamada de associação bilateral e é responsável pelo espessamento da fibra. A junção de três moléculas é chamada de associação equilateral e é responsável pelo surgimento de ramificações na rede de fibrina. Adaptado de MOSESSON, 2005.

Essas ligações intermoleculares acontecem entre o aminoácido lisina⁴⁰⁶ de uma molécula com e a glutamina³⁹⁸ ou ³⁹⁹ da fibrina adjacente (SIEBENLIST *et al.*, 1996). Além dessa ligação cruzada, outras, inespecíficas, já foram

descritas em fibrina incubado com fator XIIIa por longos períodos. Esse aumento de ligações cruzadas conferiu resistência à ação fibrinolítica da plasmina (SIEBENLIST *et al.*, 1996).

Além de ser abundante no plasma e ser chave no processo de coagulação, o fibrinogênio tem outra característica importante: a alta susceptibilidade ao ataque oxidativo e outras modificações pós-traducionais. Em um estudo que avaliou a susceptibilidade de diferentes proteínas ao estresse oxidativo, o fibrinogênio mostrou-se um alvo importante para agentes oxidantes (SHACTER *et al.*, 1994). A susceptibilidade a oxidantes não é homogênea, sendo a cadeia alfa a mais sensível aos danos oxidativos (NOWAK *et al.*, 2007). Testes feitos com plasma de pacientes diabéticos demonstraram que o fibrinogênio apresenta altos níveis de glicação quando o paciente não tem a sua glicemia sob controle (JALEEL *et al.*, 2005). Ainda, fibrinogênio de humanos submetidos à endotoxemia experimental sofrem nitração com conseqüente aceleração nos tempos de polimerização (HEFFRON *et al.*, 2009).

1.2.3. Eliminação de coágulos – fibrinólise

Tão importante quanto o sistema pró-coagulante é o sistema de remoção de coágulos, que entra em funcionamento concomitantemente com o primeiro. Sua função é, basicamente, restringir a cascata pró-coagulante ao sítio da lesão e, depois de resolvido o sangramento, eliminar fatores pró-coagulantes e coágulos que não são mais necessários. A enzima responsável por essa ação é a plasmina, que na circulação encontra-se na sua forma

inativa, o plasminogênio. O plasminogênio pode ser ativado pelo Ativador de Plasminogênio Tecidual (tPA) que é liberado pelo tecido lesado (GUYTON e HALL, 2005). Por outro lado, o plasminogênio pode ser inibido indiretamente pela ação do Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1 (PAI-1). O PAI-1 é sintetizado por hepatócitos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e plaquetas (GRANT, 2007).

1.2.4. Plaquetas

Plaquetas são pequenos fragmentos celulares (1-4 μm de diâmetro) derivados de megacariócitos da medula óssea. A concentração sanguínea normal é de 150 a 300 mil plaquetas por microlitro. Esses fragmentos celulares são anucleados, mas apesar disso apresentam metabolismo e respondem ativamente a estímulos externos (GUYTON e HALL, 2005).

Locais com lesão endotelial têm expostos diversos componentes da matriz extracelular. Dentre esses componentes, a exposição de colágeno e do fator de Von Willebrand é de extrema importância para a adesão plaquetária, que é mediada pelas glicoproteínas GP VI e GP IB, respectivamente. Após a ativação plaquetária, a exposição dos receptores GP IIb/IIIa (receptor de fibrinogênio) permite que outras plaquetas sejam recrutadas através de pontes de fibrinogênio (GAWAZ *et al.*, 2005).

As plaquetas também desempenham importante papel na condução da resposta inflamatória no microambiente da lesão. A secreção de interleucina IL-1 β pelas plaquetas ativadas faz com que o endotélio responda secretando outras interleucinas, como IL-6, IL-8, e quimiocinas (MCP-1) (KAPLANSKI *et*

al., 1994; GAWAZ *et al.*, 2005).

1.2.5. Endotélio

Além de proporcionar uma proteção física, evitando o contato do sangue com o espaço subendotelial e evitando a ativação da via intrínseca, o endotélio proporciona uma superfície onde a presença do glicocálix impede a ligação de fatores de coagulação. A expressão de uma proteína de membrana, a trombomodulina, capaz de capturar a trombina e ativar um processo anticoagulante, é de extrema importância nos mecanismos anti-coagulantes do endotélio (GUYTON e HALL, 2005). Porém, em situações como o diabetes, mudanças no endotélio contribuem para o desenvolvimento do perfil pró-trombótico e para o desenvolvimento de aterosclerose. A hiperglicemia tem sido descrita como fator causal de permeabilidade vascular, da expressão de moléculas de adesão e diminuição de glicocálix no endotélio, fatores ligados a ativação da coagulação (NIEUWDORP *et al.*, 2006). Outros compostos, como proteínas glicadas e aldeídos reativos já foram demonstrados como sendo mediadores do desenvolvimento de características pró-coagulantes do endotélio (MIN *et al.*, 1999; YAMAWAKI e HARA, 2008).

1.3. Glicação

A glicação não-enzimática inicia com a reação entre um açúcar redutor, ou um aldeído reativo, com um grupamento amina presente em um aminoácido, proteína, lipídeo ou ácido nucléico (figura 4). Inicialmente, uma Base de Schiff se forma e, após alguns rearranjos moleculares, moléculas

conhecidas como Produtos de Amadori surgem. Novamente, após alguns rearranjos que incluem fragmentações e oxidações, acontece a formação irreversível de produtos heterogêneos, mas chamados coletivamente de AGEs (do inglês *Advanced Glycation End-products*) (figura 4) (THORNALLEY *et al.*, 1999; VALENCIA *et al.*, 2004).

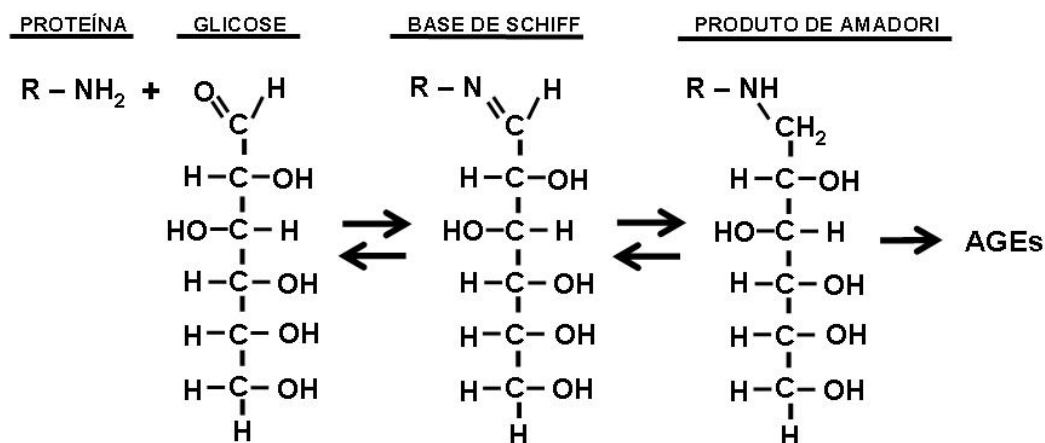


Figura 4: A reação entre uma amina presente em proteínas, lipídeos ou aminoácidos com um açúcar redutor leva a formação reversível de uma Base de Schiff. Após sucessivos rearranjos, surgem produtos estáveis, chamados de AGEs. Retirado de THORNALLEY, 1999.

Tratando-se de proteínas, esse tipo de reação ocorre preferencialmente em resíduos de arginina e de lisina (VALENCIA *et al.*, 2004). Mais recentemente, também foi demonstrada a formação de tiohemiacetal com resíduos de cisteína (ADROVER *et al.*, 2008).

A geração e acúmulo de AGEs ocorre de forma acentuada no diabetes e em uma série de doenças degenerativas. A hemoglobina glicosilada é um bom indicativo da glicemia média, e se encontra aumentada no diabetes (LAPOLLA *et al.*, 2003). Adicionalmente, duas formas de AGEs, a N^ε-(carboximetil)lisina e a pentosidina, dobram de valores em indivíduos diabéticos (LAPOLLA *et al.*,

2003; SHARP *et al.*, 2003).

Diversas formas de AGE são conhecidas, como *N*^ε-(carboximetil)lisina (CML), *N*^ε-(carboxietil)lisina (CEL), *N*^ω (carboximetil)arginina (CMA), S-(carboximetil)cisteína (CMC), argpirimidina e GA-piridina (NAGAI *et al.*, 2008). Algumas dessas estruturas possuem papel sinalizador, após a ligação em receptores de AGE (RAGE). A ativação desse receptor está relacionada à diversos eventos pró-inflamatórios e degenerativos, como no agravamento da sepse e desenvolvimento de aterosclerose (PARK *et al.*, 1998; LUTTERLOH *et al.*, 2007).

Além do aumento de AGEs, condições pró-inflamatória e hiperglicêmicas apresentam aumento em moléculas que levam a formação de AGEs, como o glioxal, metilglioxal, glicolaldeído e a 3-deoxi-glucosona (ANDERSON *et al.*, 1997; LAPOLLA *et al.*, 2003).

1.3.1. Drogas anti-AGE

A heterogeneidade na geração de AGE permite que uma vasta quantidade de drogas possa ter valor terapêutico. Os modos de ação diferem, dependendo do ponto em que a droga terá sua função. Dentre os principais mecanismos de ação, destacam-se:

1.3.1.1. Quelantes de carbonil

Agem reagindo com aldeídos, impedindo a formação de bases de Schiff com as proteínas. Dentre os mais estudados estão a aminoguanidina (AMG) e a piridoxamina (vitamina B6). Já foi demonstrada a eficiência da AMG *in vitro* e *in vivo*, mas seus efeitos não se restringem à capacidade de quelar carbonil

reativos. A AMG é capaz de inibir a iNOS (CORBETT *et al.*, 1992) e quelar metais, atuando como antioxidante (PRICE *et al.*, 2001). Esses efeitos secundários obviamente auxiliam na sua ação anti-AGE. Apesar de modelos animais atestarem sua eficiência, dois estudos clínicos utilizando a AMG não confirmam esse efeito (PEYROUX e STERNBERG, 2006).

A piridoxamina é capaz de quelar carbonil e ainda impedir a formação de CML, ligando e impedindo a ação de íons metálicos (PEYROUX e STERNBERG, 2006). Modelos animais de diabetes do tipo 1 e 2 tratados com PM mostraram uma redução na acumulação de AGE (PEYROUX e STERNBERG, 2006).

1.3.1.2. AGE-breakers

Promovem a clivagem da ligação AGE:proteína, bem como desfazem ligações cruzadas entre duas proteínas pela ação da glicação. Apesar de esse efeito já ter sido demonstrado *in vitro*, os efeitos benéficos de AGE-breakers vistos em estudos com animais podem acontecer devido a um papel de antioxidante (PEYROUX e STERNBERG, 2006).

1.3.1.3. Bloquadores de RAGE

Podem agir impedindo a ligação de AGE nos receptores por interferência com o AGE ou com o próprio receptor. Podem ainda, impedir o sinal intracelular disparado após a ligação do AGE no seu receptor (PEYROUX e STERNBERG, 2006). A forma solúvel do receptor (sRAGE) tem sido utilizada com sucesso em modelos animais (PARK *et al.*, 1998; PEYROUX e STERNBERG, 2006). Sua função é ligar ao AGE de forma competitiva ao RAGE de membrana, impedindo que a sinalização ocorra. Ratos diabéticos

injetados com sRAGE apresentaram menor expressão de Fator Tecidual, VCAM-1 e colágeno tipo IV em aorta do que ratos diabéticos não tratados, indicando um efeito protetor contra o desenvolvimento de aterosclerose (PEYROUX e STERNBERG, 2006).

1.3.2. Glicolaldeído

O glicolaldeído (GA) é um aldeído de cadeia curta, altamente reativo e foco de estudo desta tese (figura 5). As suas fontes no organismo são: a) a partir da serina, após sofrer ataque do sistema mieloperoxidase- H_2O_2 -cloreto (ANDERSON *et al.*, 1997); b) a partir da degradação de produtos de Maillard (GLOMB e MONNIER, 1995); c) a partir de intermediários da via glicolítica (FENG *et al.*, 2009).

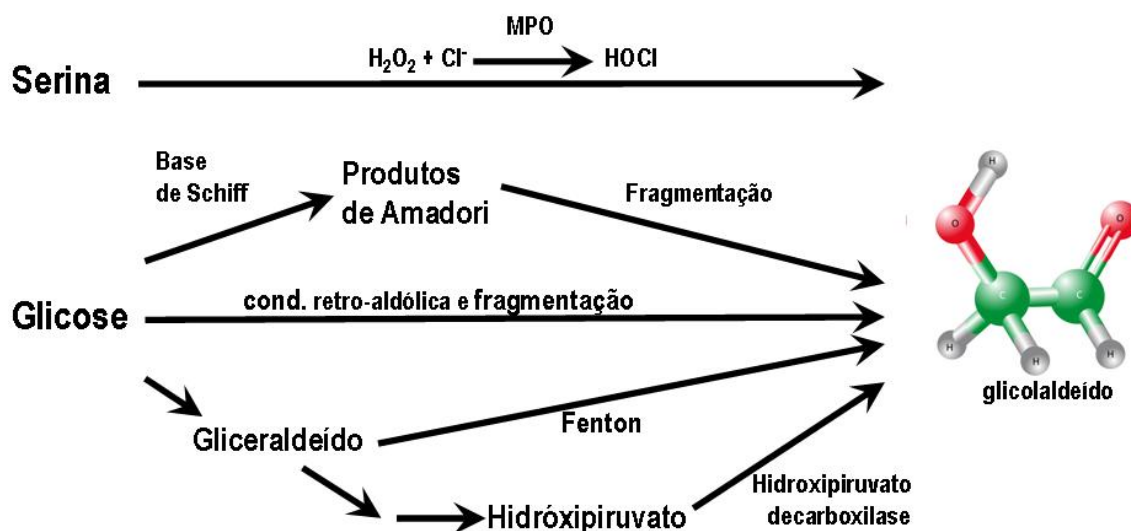


Figura 5: As diversas origens do GA no organismo. Estrutura do GA, a aldose mais simples que pode existir, representada em modelo espacial.

Apesar de os níveis de GA não terem sido determinados no organismo animal, é sugerido que até $200\mu M$ pode ser atingido pela ação da

mieloperoxidase sobre a serina circulante (ANDERSON *et al.*, 1997). Em estudos com cultura de células, é comum a utilização de concentrações que variam entre 100 μ M a 1mM (AL-ENEZI *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2009). Em estudos que usam o GA como um agente glicante, é comum a utilização de até 10mM (MERA *et al.*, 2009).

O destino do GA no organismo ainda não é totalmente conhecido. Entretanto, dois destinos são de extrema importância: a) a sua conversão em glioxal, após sofrer enolização e autooxidação (AL-ENEZI *et al.*, 2006) e b) a geração de AGEs (NAGAI *et al.*, 2002; ANDERSON e HEINECKE, 2003). Além disso, em um estudo *in vitro*, foi demonstrado que o GA pode servir de substrato para a enzima xantina oxidase, uma reação que promove a liberação do radical superóxido (ZANOTTO-FILHO *et al.*, 2008).

Apesar da sua importância como agente glicante, o GA tem efeitos biológicos *per se*. Já foi demonstrado sua capacidade de inibir o crescimento tumoral em linhagem MCF7 através da geração de radicais livres intracelulares (AL-ENEZI *et al.*, 2006). Ainda, foi demonstrado seu papel na modificação de proteínas da matriz extracelular *in vitro*, o que acarreta em dificuldade na interação célula:matriz, efeito em parte responsável pela nefropatia diabética (PEDCHENKO *et al.*, 2005).

Outros aldeídos reativos, relacionados ao GA, já foram descritos como tendo efeito sobre o sistema pró-coagulante/anti-coagulatne, contribuindo ao menos parcialmente para o desenvolvimento do caráter pró-trombótico visto no diabetes. O metilglioxal é capaz de reagir com o plasminogênio, impedindo a sua maturação em plasmina, causando prejuízo no mecanismo de fibrinólise

(LERANT *et al.*, 2000). Quando adicionado em cultura de células endoteliais, o metilglioxal é capaz de estimular a produção de radicais livres e a expressão de moléculas de adesão (VCAM) (WELTEN *et al.*, 2003; MIYAZAWA *et al.*, 2010). O glioxal, por sua vez, é capaz de causar mudanças morfológicas em cultura de células endoteliais, com a concomitante expressão da enzima ciclooxigenase-2 (YAMAWAKI e HARA, 2008). Como se pode ver, além do papel dos AGEs no desenvolvimento das complicações aterotrombóticas vistas no diabetes, seus precursores também ocupam papel de destaque. Apesar disso, poucos estudos investigando sua participação nessas complicações têm surgido. E, apesar de o GA ter sua origem em processos altamente ativos no diabetes, nenhum trabalho avaliou sua relação com o desenvolvimento de complicações vasculares.

Portanto, visto que o diabetes é uma condição pró-coagulante e que as rotas de produção do GA apresentam-se estimuladas nessa enfermidade, e que outros aldeídos reativos apresentam propriedades pró-coagulantes alterando função enzimática e função endotelial, nós sugerimos que GA também contribui para o desenvolvimento de problemas cardiovasculares vistos no diabetes.

2. OBJETIVO

O objetivo geral desse trabalho é ampliar o conhecimento sobre os efeitos diretos do GA sobre o sistema de coagulação e de fibrinólise e assim investigar a participação do GA sobre o desenvolvimento de características pró-coagulantes. Para tanto, dois objetivos específicos foram traçados.

Objetivo específico 1

Averiguar se o GA é capaz de causar alterações pós-traducionais em proteínas quando incubado com plasma humano e se causa alterações nos processos de coagulação e fibrinólise.

Objetivo específico 2

Investigar se ratos injetados com GA apresentam alterações pós-traducionais em proteínas plasmática nos mecanismos de coagulação e fibrinólise e ainda, se o GA causa alteração nos mecanismos de coagulação e fibrinólise.

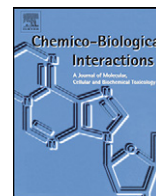
PARTE 2

Artigo 1

Glycolaldehyde induces fibrinogen post-translational modification, delay in clotting and resistance to enzymatic digestion

Michael Éverton Andrades, Rodrigo Lorenzi, Markus Berger, Jorge Almeida Guimarães, José Cláudio Fonseca Moreira, Felipe Dal-Pizzol

Chemico-Biological Interactions 180:478-484, 2009.



Glycolaldehyde induces fibrinogen post-translational modification, delay in clotting and resistance to enzymatic digestion

M.E. Andrades^{a,*}, R. Lorenzi^a, M. Berger^b, J.A. Guimarães^b, J.C.F. Moreira^a, F. Dal-Pizzol^{a,c}

^a Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Dpto. Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica Farmacológica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2008

Received in revised form 11 April 2009

Accepted 20 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Glycolaldehyde

Carbonyl

Fibrinogen

Fibrinolysis

Coagulation

ABSTRACT

Glycolaldehyde (GA) is a highly reactive aldehyde that can be generated during inflammation and hyperglycemia. It can react with arginine and lysine residues impairing protein function. As inflammation and diabetes present haemostatic dysfunction, we hypothesized that GA could participate in this process. The aim of this study was to investigate if plasma incubated in the presence of GA presents alteration in the coagulation process. We also aimed to evaluate the role of fibrinogen in GA-induced haemostatic dysfunction. For this purpose, plasma and fibrinogen were each incubated separately, either in the presence or absence of 1 mM GA for 8 and 4 h, respectively. After that, plasma coagulation and fibrin polymerization kinetics were recorded, as well as the kinetic of plasma clot digestion and fibrinolysis protein carbonylation was quantified. An SDS-PAGE was run to check the presence of cross-linking between fibrinogen chains. GA induced a delay in plasma coagulation and in fibrin polymerization. Maximum absorbance decreased after GA treatment, indicating the generation of thinner fibers. Fibrin generated after complete coagulation showed resistance to enzymatic digestion, which could be related to the generation of thinner fibers. Protein carbonylation also increased after GA treatment. All parameters could be reversed with AMG (a carbonyl trap) co-treatment. The data presented herein indicate that GA causes post-translational modification of lysine and arginine residues, which are central to many events involving fibrinogen to fibrin conversion, as well as to fibrinolysis. These modifications lead to the generation of persistent clots and may contribute to mortality seen in pathologies such diabetes and sepsis.

© 2009 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

The haemostatic system is composed of cellular (platelets and monocytes) and fluid (coagulation and fibrinolytic cascade) systems. Coagulation can be triggered by extrinsic (tissue factor-dependent) or intrinsic (sub-endothelial contact-dependent) pathways and both converge to thrombin activation and fibrin deposition, also known as common pathway. To avoid excessive fibrin deposition, the fibrinolytic cascade is concomitantly activated to counteract coagulation. The haemostatic system acts as a double-edged sword since it must be finely regulated to avoid bleeding without generating excessive and persistent thrombi. Once the control is lost, the haemostatic system may (a) favor coagula-

tion, such as seen in diabetes or inflammation, and contribute to disseminated intravascular coagulation (DIC) or atherothrombotic events, eventually leading to death [1,2]; or (b) favor bleeding, such as seen in some dysfibrinogenemias or even after a DIC episode with further bleeding, also called consumption coagulopathy [3].

The atherothrombotic disease is common in diabetic patients and contributes to high levels of cardiovascular complications, the major cause of mortality and morbidity in diabetes [1]. Some authors have postulated that the mechanisms of haemostatic loss in diabetes include increase in thrombin activity, increase in plasminogen activator inhibitor type I (PAI-I) [4] and dysfunctions in the cellular system (see [1] for review).

Another source of haemostatic dysfunction is the inflammatory process [2]. Interleukin 6 and lipopolysaccharide (LPS) are able to increase tissue factor synthesis and release. Moreover, during the inflammatory process the major anticoagulant pathways (antithrombin, protein C, fibrinolysis) are disrupted [2]. The net result of haemostatic dysfunction is in favor of the procoagulant pathway, which contributes to DIC, organ ischemia and failure and, eventually, death. Critical illness and sepsis are good examples of

Abbreviations: GA, glycolaldehyde; AMG, aminoguanidine; DIC, disseminated intravascular coagulation; MPO, myeloperoxidase; AUC, area under the curve.

* Corresponding author at: Rua Ramiro Barcelos, 2600, ANEXO, Laboratório 32, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3308 5578; fax: +55 51 3308 5540.

E-mail address: andrades.m@yahoo.com.br (M.E. Andrades).

severe inflammatory process that, when associated with DIC, have poor outcome [5,6].

Besides the action of cytokines and tissue lesion, post-translational modifications of coagulation/fibrinolysis cascades may also promote a prothrombotic state. Peroxynitrite seems to contribute to the formation of persistent clots, since it increases the rate of thrombin-catalyzed clot formation in nitrated fibrinogen isolated from patients with coronary arterial disease [7] and decelerates the fibrinolytic pathway by inactivating the tissue plasminogen activator (tPA) [8]. Rabbits chronically injected with homocysteine presented an acquired dysfibrinogenemia, which resulted in prolonged clotting times, increased resistance to plasmin lysis and structural alterations in fibrin network [9]. Glucose-induced fibrinogen glycation also induced resistance to plasmin digestion and retention of glycated fibrinogen in the renal cortex [10]. In line with these *in vitro* studies, a few interventional studies that examine the effects of glycaemic control in diabetic patients on fibrin structure have arisen [11].

Glycolaldehyde (GA) is a short-chain aldehyde formed as by-product of protein glycation (Maillard reaction) [12] and during myeloperoxidase (MPO) activity upon amino acids [13]. GA is a highly reactive aldehyde that quickly reacts with amino groups forming a Schiff base, which rearranges to form stable Amadori products leading to Advanced Glycation End Products generation (AGE) [12]. One well characterized AGE derived from GA reaction with proteins is N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML), which can trigger a pro-inflammatory cascade through AGE receptors [14]. Moreover, GA-pyridine is the major immunological epitope in proteins modified with GA and was found in the cytoplasm of foam cells and extracellularly in the central atheroma of atherosclerotic core [15]. Methylglyoxal, another reactive aldehyde with increased levels in diabetes, has been shown to impair fibrinolysis by causing post-translational modifications of plasminogen [16]. Recently, GA and related aldehydes have been shown to react with cysteine residues and inhibit cysteine proteases by direct adduction of the aldehyde with the thiol group of the enzyme [17,18]. Despite GA levels having not been quantified in plasma, physiological concentration is estimated to be close to 1 mM and several works have employed this range in *in vitro* studies [18–20].

In this work, we attempt to investigate if GA in a near-physiological concentration (1 mM) is able to cause haemostatic alterations *in vitro*.

2. Materials and methods

Glycolaldehyde dimer (G6805), aminoguanidine (A7259), plasmin (P1867), and bovine fibrinogen (F8630) were purchased from Sigma–Aldrich Co. Human citrated plasma was kindly provided by the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, Brazil. Thrombin was purified from human plasma according to Ding and Xu [21]. All other reagents were of analytical grade.

2.1. Plasma and fibrinogen incubations

Plasma (990 μ L) was incubated in aseptic condition in the presence of 10 μ L of GA, aminoguanidine (AMG), GA+AMG or 20 mM HEPES, pH 7.4, for 8 h at 37 °C, rendering GA and AMG final concentrations of 1 and 10 mM, respectively. Commercial bovine fibrinogen (0.2 mg) was incubated in 20 mM HEPES, pH 7.4, for 4 h with the same treatments used in plasma incubation. Final concentration of GA and AMG were 1 and 2.5 mM, respectively. Assays with commercial fibrinogen were performed within 4 h to avoid loss of clottability, as detected in preliminary studies.

2.2. Plasma coagulation and clot digestion

After incubation, 160 μ L of plasma was added to a 96-well plate and clotting was triggered with the addition of 40 μ L CaCl₂ (final concentration 10 mM) and monitored spectrophotometrically (650 nm) at 37 °C [22]. After complete clot formation, 50 μ L trypsin (1.5 mg) was added on top of the clot and lysis was monitored at 405 nm [22]. Lag phase and area under the curve (AUC) were recorded. The lag phase represents the time required for fibrin fibers to grow sufficiently to allow lateral aggregation and it was measured at the point where optical density (O.D.) increased 0.015 from baseline. AUC was used for statistical comparison between treatments. To rule out direct effect of GA on the enzymes of the coagulation cascade or fibrinolysis, we performed two sets of experiments where (a) plasma was incubated as control but GA was added immediately before triggering coagulation; (b) plasma was incubated as control and clotted with CaCl₂. After that, 1 mM (final) GA was added and clot digestion was triggered with the addition of trypsin. In both cases, the parameters did not differ from control groups.

2.3. Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), and thrombin time

Commercial kits for aPTT and TT measurements were purchased from Human GmbH (Wiesbaden, Germany). Kit for PT measurement was purchased from Wiener (Rosario, Argentina). Measurements were made following technical advice from manufacturers. Briefly, 100 μ L of pre-warmed plasma is incubated in the presence of substitute platelet/ellagic acid (100 μ L) for 3 min before adding CaCl₂ (100 μ L, 7 mM final). The time needed for clotting is recorded as aPTT. Prothrombin time is the time needed for 100 μ L of plasma to clot after the addition of 100 μ L of pre-warmed thromboplastin and CaCl₂ (4 mM final). Thrombin time was determined after the addition of thrombin (100 μ L, 1 NIH Unit) to 200 μ L of pre-warmed plasma.

2.4. Fibrin polymerization and fibrinolysis

After incubation (described above), 10 μ L of thrombin (0.2 μ g) were added in wells containing fibrinogen and the treatments. Fibrin formation was monitored spectrophotometrically at 650 nm [23]. After complete polymerization, plasmin (10 mU) or trypsin (1.5 μ g) was added and lysis was followed at 650 nm [23]. To verify if GA interfered in the enzymatic activity of thrombin, fibrinogen was incubated as control and GA was added just before triggering fibrin polymerization. To verify if GA interfered in plasmin or trypsin activity, fibrinogen was incubated as control and fibrin was generated by adding thrombin. After that, GA was added just before plasmin or trypsin addition. In both cases, parameters did not differ from those of the control group.

2.5. Protein carbonylation

An aliquot containing 1 mg of protein was taken after incubation (described above) and dissolved in 2 M HCl (final volume of 500 μ L). 2,4-dinitrophenylhydrazine (500 μ L) was added and reaction was stopped after 30 min with the addition of TCA 10% and centrifugation (10,000 \times g, 10 min). Pellets were washed three times with ethanol:ethyl acetate (1:1) and dissolved in 8 M urea (pH 2.3) and centrifuged. The resulting supernatant was read at 380 nm. We ran a blank in parallel to each sample, which had 2,4-dinitrophenylhydrazine replaced by 2 M HCl [24].

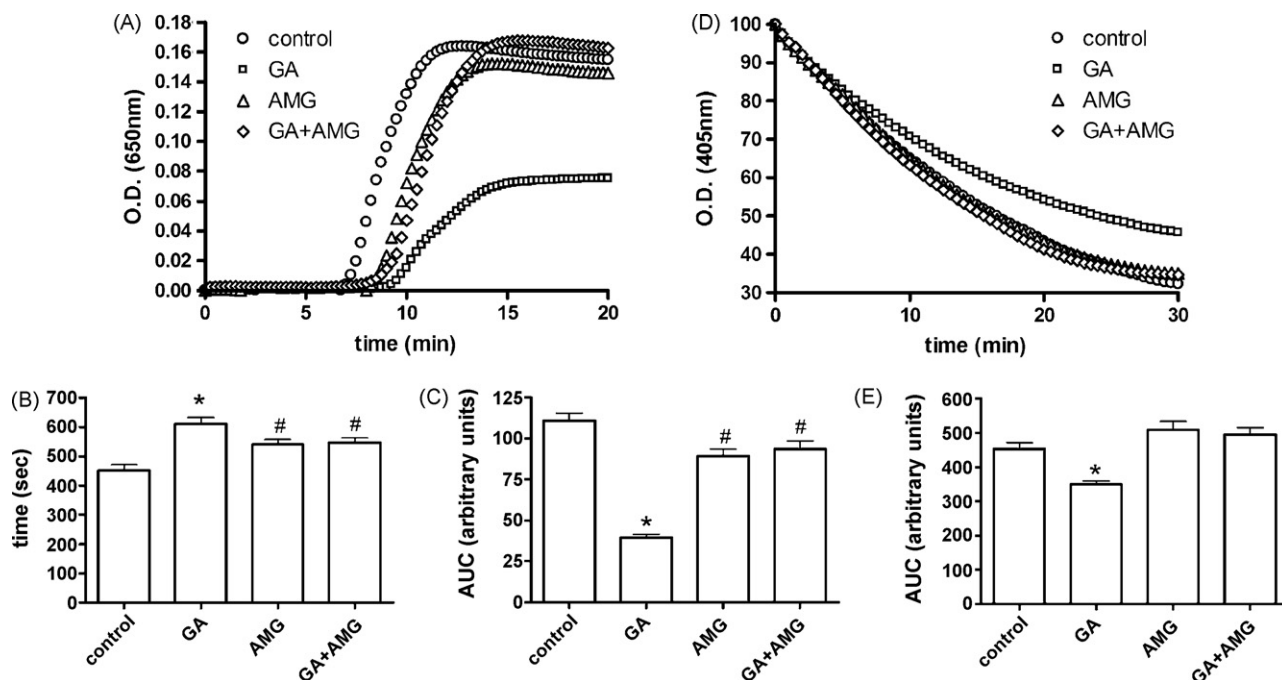


Fig. 1. Plasma incubated with GA shows impaired coagulation and fibrinolysis. Plasma was incubated in the presence or absence of GA (1 mM), AMG (10 mM) or both for 8 h at 37 °C. Clotting was triggered with 10 mM CaCl₂ and after complete clotting trypsin (1.5 mg) was added to the well. (A) Coagulation kinetics (representative curve of *n* = 6). (B) Lag phase (time for absorbance to reach 0.015 from baseline). (C) Area under curve of coagulation kinetics. (D) Kinetics of trypsin-mediated fibrinolysis. (E) Area under curve of fibrinolysis kinetics (representative curve of *n* = 6). Figures represent mean ± S.E.M. (*n* = 8). Statistical significance was determined using ANOVA followed by SNK test. (*) Difference from control (*P* < 0.05); (#) difference from control and GA (*P* < 0.05).

2.6. SDS-PAGE

After incubation, sample buffer (20% (v/v) glycerol, 120 mM Tris, 4% (w/v) SDS, 0.002% (w/v) bromophenol blue, 10% (v/v) beta-mercaptoethanol, pH 6.75) was mixed with equal volume of sample. Ten micrograms were loaded into each lane and a SDS-PAGE gel (10%) was run for 2 h [25]. Gel was stained with 0.1% Coomassie Blue and destained with methanol:acetic acid (50%:12%).

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± S.E.M. in all figures. For the biochemical measures, the means for the different treatment groups were compared by Analysis of Variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls test. Statistical significance was assigned to *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Clotting time and trypsin digestion

Plasma was incubated with GA, AMG or both, and plasma coagulation and clot digestion kinetics are shown in Fig. 1. Plasma incubated with GA showed alterations in the coagulation kinetics when compared to control (Fig. 1A). GA induced a decrease in maximal absorbance (Fig. 1A and C) and an increase in lag phase (Fig. 1B), indicating the generation of thinner fibers and impairment in lateral fibrin association, respectively. AMG avoided these alterations, indicating that glycation of plasma proteins could contribute to impairment in coagulation process. After complete plasma coagulation, we analyzed clot susceptibility to trypsin digestion. Clot generated from plasma incubated with GA showed resistance to trypsin digestion (Fig. 1D and E) whereas AMG avoided GA-induced resistance.

3.2. Prothrombin time, thrombin time and aPTT

All parameters were delayed in plasma incubated in 1 mM GA. Co-treatment with AMG (10 mM) avoided delay in coagulation times (Fig. 2). Since all times were delayed, we suggest that the common pathway could be affected by GA treatment. As AMG may act as an antioxidant by chelating transitional metals, we decided to investigate if antioxidants could avoid the delay caused by GA. Trolox (1 mM), vitamin C (1 mM), reduced glutathione (2 mM) and deferoxamine (0.1 mM) were co-incubated in the presence or

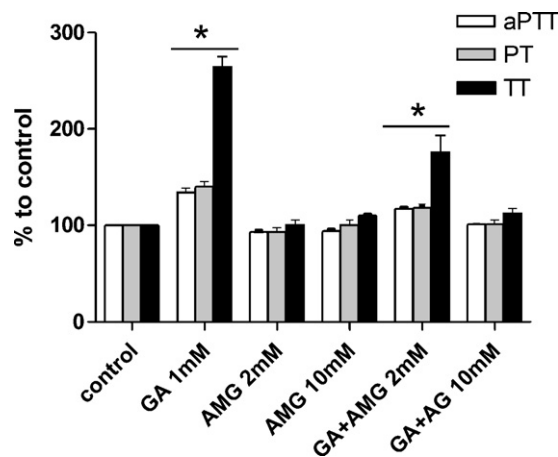


Fig. 2. Plasma incubated with GA shows impaired extrinsic and intrinsic coagulation pathways. Plasma was incubated in the presence or absence of compounds indicated in the plot. Activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), and thrombin time were measured as index of intrinsic, extrinsic, and common pathways. Data are expressed as mean ± S.E.M. and values are relative to its controls (*n* = 8). Statistical significance was determined using ANOVA followed by SNK test. (*) Difference from control (*P* < 0.05).

absence of 1 mM GA and were unable to avoid delay in coagulation times (data not shown). Thus, we can rule out the participation of free radicals in GA-induced coagulation impairment.

3.3. Fibrin polymerization and fibrinolysis

To confirm impairment of the common pathway, commercial fibrinogen was incubated for 4 h in the presence or absence of GA, and fibrin polymerization was triggered with addition of human thrombin and followed spectrophotometrically. Fibrinogen incubated with GA showed the same profile of fibrin assembly that GA-treated plasma did (Fig. 3A). In the same way, maximal absorbance is lower in GA-treated fibrinogen (Fig. 3A and C), indicating the formation of thinner fibers than in the control. Also, the time to increase O.D. in 0.015 above the baseline (lag phase) was increased after GA treatment (Fig. 3B). Incubation with AMG facilitated the thrombin-catalyzed fibrin formation, and co-incubation with GA was neither able to increase the lag phase nor to decrease maximal absorbance (Fig. 3B and C). To rule out direct effects of GA on thrombin activity, we tested a system containing thrombin and fibrinogen with and without GA and there was no difference between fibrin formation kinetics (data not shown).

After complete polymerization, plasmin or trypsin was added on top of the clot and fibrinolysis was followed spectrophotometrically.

As Fig. 3D and E shows, GA disturbed fibrinolysis kinetics differently when plasmin or trypsin was added. GA-incubated fibrinogen generated a fibrin slightly susceptible to initial steps of plasmin (up to 14 min) but strongly resistant to complete lysis (Fig. 3D and E). Trypsin was able to digest fibrin from GA-incubated fibrinogen to the same extent as in control fibrin, with slight difficulty up to 15 min (Fig. 3E).

3.4. Protein carbonyl

Plasma incubated in the presence of GA showed increased levels of carbonylation. Co-treatment with AMG (10 mM) was able to avoid carbonylation (Fig. 4A). GA did not induce modifications in sulfhydryl-containing amino acid residues (data not shown). As our results point to a central role of fibrinogen in coagulation dysfunction, we also determined carbonyl and free sulfhydryl in fibrinogen incubated in the presence of 1 mM GA for 4 h (Fig. 4B). In the same way that we showed in total plasma, GA induced carbonylation in fibrinogen, whereas AMG was able to avoid it. GA did not induce modification in sulfhydryl moieties present in fibrinogen. Antioxidant co-treatments (1 mM Trolox, 1 mM vitamin C, 2 mM reduced glutathione, and 0.1 mM deferoxamine) were unable to avoid protein carbonylation induced by GA (data not shown).

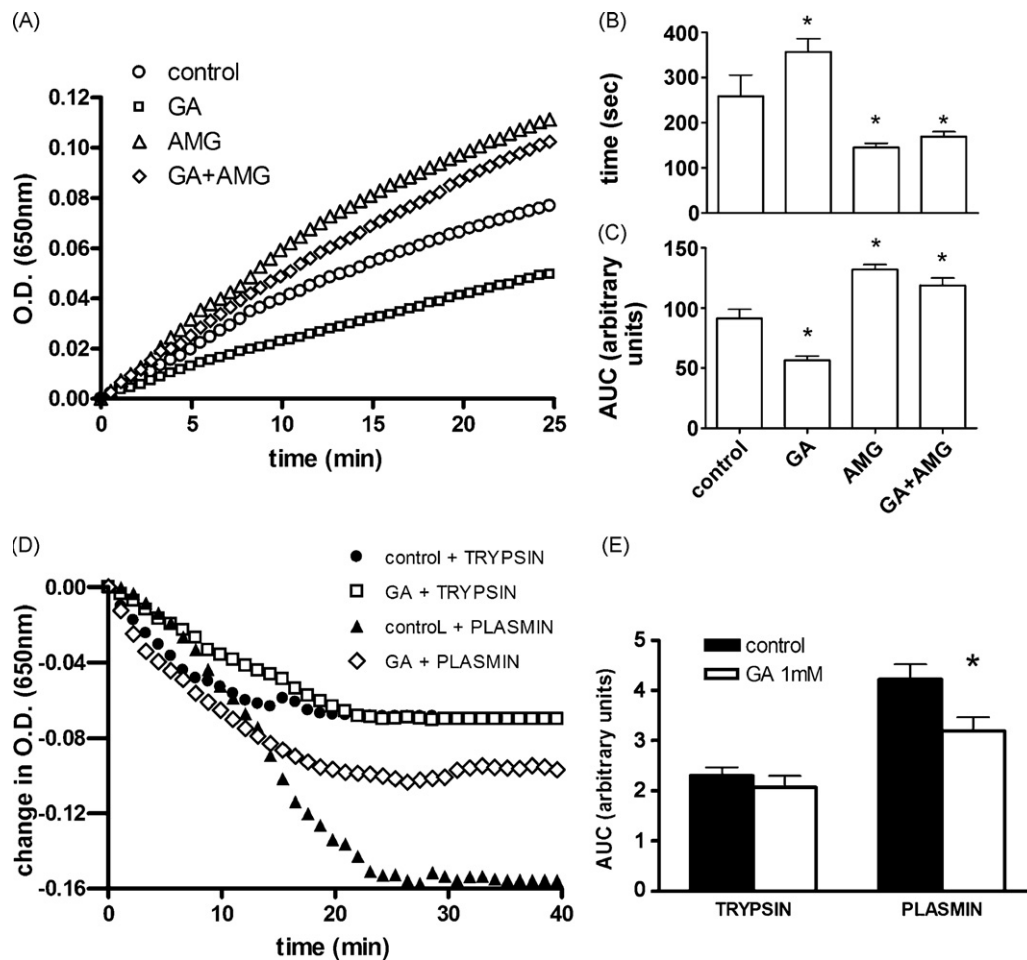


Fig. 3. Fibrinogen incubated with GA shows impaired coagulation and fibrinolysis. Fibrinogen was incubated in the presence or absence of GA (1 mM) for 4 h at 37 °C. Clotting was triggered with 0.2 μg thrombin and after complete clotting plasmin (10 mU) or trypsin (1.5 μg) was added to the well. (A) Fibrin formation kinetics (representative curve of $n = 4$). (B) Lag phase (time for absorbance to reach 0.015 from baseline). (C) Area under curve of coagulation kinetics. (D) Fibrinolysis kinetics (representative curve of $n = 4$). (E) Area under curve of fibrinolysis kinetics. Figures represent mean + S.E.M. ($n = 4$). Statistical significance was determined using ANOVA followed by SNK test. (*) Difference from control ($P < 0.05$).

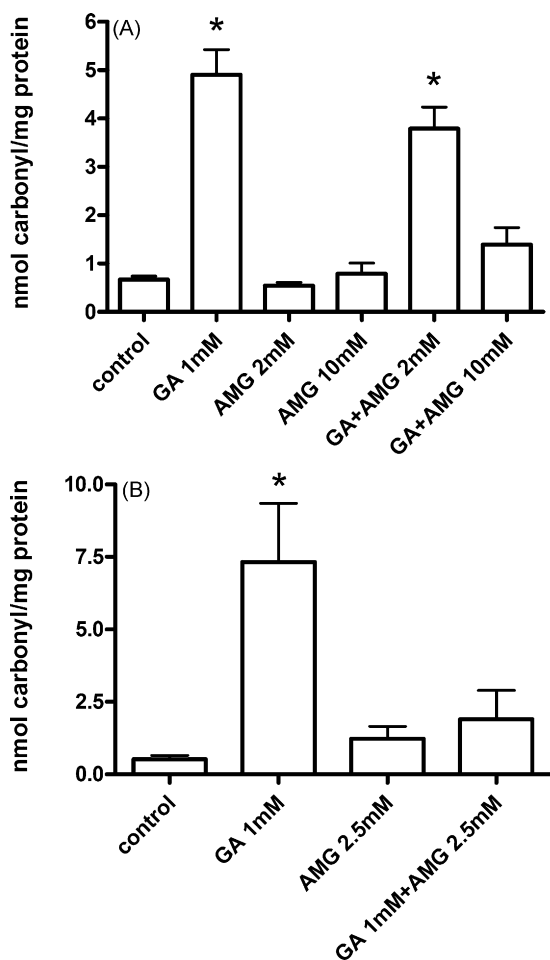


Fig. 4. GA induces carbonylation of plasma protein and isolated fibrinogen. Plasma was incubated as described in Fig. 1 and fibrinogen was incubated as described in Fig. 3. Bars represent mean + S.E.M. ($n=8$ and $n=5$ for plasma and fibrinogen, respectively). Statistical significance was determined using ANOVA followed by SNK test. (*) Difference from control ($P < 0.05$).

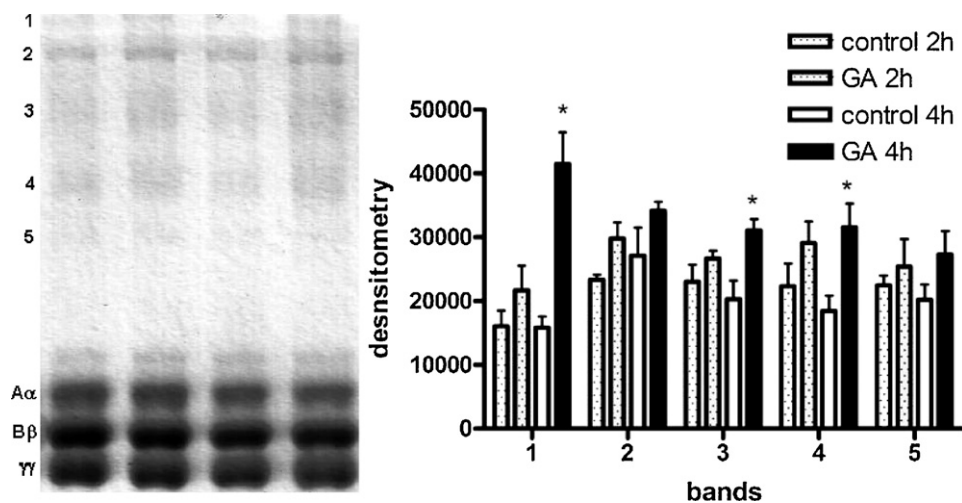


Fig. 5. Presence of fibrinogen cross-linking induced by GA incubation. Fibrinogen was incubated as described in Fig. 3 and an aliquot was recovered after 2 and after 4 h of incubation and was mixed with same volume of sample buffer. Samples were loaded (10 μg) in a 10% SDS-PAGE gel and run at 20 mA, 40 min (stacking gel) and 30 mA, 2 h (resolution gel). Afterwards, gel was stained with Coomassie Blue and digitalized. Lane 1: control (2 h); Lane 2: GA (2 h); Lane 3: control (4 h); Lane 4: GA (4 h). Gel representative of three experiments. Densitometry was performed in band indicated by the arrow. (*) Difference from control ($P < 0.05$).

3.5. SDS-PAGE

To verify if GA induces cross-linkage between fibrinogen chains, we ran a 10% SDS-PAGE in reducing condition and assessed the integrity of each chain (A α , B β and $\gamma\gamma$). In Fig. 5, we can see that GA induced the formation of high molecular weight bands after 4 h of incubation. These data suggest the formation of cross-link between residues different from cysteine.

4. Discussion

In this study, we attempted to show that GA causes post-translational modification of fibrinogen which leads to altered clot formation and resistance to fibrinolysis.

GA is a highly reactive aldehyde that can be generated in plasma during the action of MPO upon amino acids [13] as well as in intracellular environment, from reaction of glucose with proteins (Maillard reaction) [12]. GA is involved in lysine and arginine modification [26] and reaction with cysteine residue has recently been described [17]. Despite its biological importance, plasma concentration of GA has not been quantified yet. Physiological concentration is estimated to range from 0.1 to 1 mM [18–20]. In pathological conditions, however, where an increase in glycemia and MPO activity could occur, GA concentration could increase, justifying the use of higher concentrations. The importance of circulating aldehydes is reinforced by data showing that glyoxalase polymorphisms is associated with increased prothrombotic markers in healthy humans [27]. The glyoxalase system is composed of two enzymes that are able to remove reactive aldehydes from the body, avoiding AGE generation. Thus, decreasing expression of glyoxalase could lead to increase in circulating AGEs and eventually to a prothrombotic condition [28].

Based on the present knowledge, we decided to investigate if a near-physiological concentration of GA (1 mM) is able to cause haemostatic alterations similar to those present in diabetes and in inflammatory disorders. GA indeed interfered in plasma coagulation, causing a decrease in maximal absorbance (Fig. 1A), increasing lag phase (Fig. 1C) and delaying clotting times (Fig. 2). It may seem contradictory, since diabetes and inflammation are both procoagulant conditions and our data point to an apparently anticoagulant effect. It is noteworthy that most of fibrinogen modifications cause impaired fibrin polymerization but often it is accompanied by a prothrombotic state, not hemorrhage. A mutation in fibrinopep-

tide A (FPA) ($\text{A}\alpha$ R16C) leads to defective clot formation *in vitro*, with diminished fibrin polymerization and delayed clot formation. *In vivo*, 15% of the patients with $\text{A}\alpha$ R16C mutation show thrombosis [29]. Indeed, fibrinogen with $\text{A}\alpha$ R16C was resistant to fibrinolysis induced by both plasminogen and trypsin [22] which may contribute to the thrombosis *in vivo*. Thus, the balance between coagulation and fibrinolysis should be looked rather than only coagulation parameters. Moreover, diabetes and inflammation are diseases where pathways of GA generation are increased and both diseases are hypercoagulable states [1,3].

The dysfunctional fibrin polymerization forms a clot with an abnormal structure that is resistant to lysis by plasmin. Decreased maximal absorbance seen in Fig. 1A characterizes this abnormal structure, constituted mainly by thinner and branched fibers [30]. Since thinner and branched fibers are poorly removed by treatment with plasmin [30], we decided to investigate if GA-treated plasma also is resistant to enzymatic degradation. To do this, we submitted plasma clots to trypsin digestion. Trypsin is a serine proteinase that has cleavage sites similar to plasmin (after lys and arg towards c-terminal position) and is a useful tool to investigate if there is any GA-modified amino acid residue in the cleavage sites of fibrin. As illustrated in Fig. 1D, GA-treated plasma showed resistance to trypsin digestion. As GA glycation is not specific to fibrinogen present in plasma, we tested if GA could impair plasma thrombin or the exogenously added trypsin. First, we tested if unreacted GA present in plasma after the incubation could impair plasma thrombin or exogenous trypsin. Second, we tested if incubation of 1 mM GA with thrombin could impair enzymatic activity. GA did not have inhibitory effect in both cases (data not shown). In another set of experiments, we analyzed the participation of intrinsic and extrinsic pathways. GA induced a delay in both the intrinsic and extrinsic pathways (Fig. 2). These findings suggest impairment in the common pathway. It was confirmed by assessing thrombin time, which also presented a delay in coagulation time (Fig. 2). Since thrombin time is assessed after adding exogenous thrombin to an aliquot of citrated plasma we could suggest that GA causes fibrinogen modifications which leads to a delay in coagulation but promotes the generation of clots resistant to enzymatic digestion.

In fact, fibrinogen was already described as highly susceptible to metal-catalyzed carbonylation when compared with other abundant plasma proteins [31]. This data led us to investigate the role of GA in isolated bovine fibrinogen. Similar to total plasma, fibrin network generated from GA-incubated fibrinogen showed decreased maximum absorbance and increased lag phase (Fig. 3A and B) and AMG co-incubation was partially able to avoid it. Glycated fibrin also became resistant to enzymatic digestion (Fig. 3D and E), mainly against plasmin. Trypsin was effective only during initial steps (up to 13 min) but the whole process did not differ from control group, as indicated by AUC (Fig. 3E). We can rule out a direct inhibitory effect of GA on trypsin or plasmin because experiments were also performed in presence of GA (without the 4 h of incubation) and did not differ from control. Thus, the delay in fibrinolysis could be attributed to protein modification by GA instead to a direct effect on enzymatic activity. In line with this, Jaleel et al. [32] showed that fibrin and fibrinogen subunits from plasma of diabetic patients are modified with Amadori products, an intermediate in the formation of Advanced Glycation End Products. It means that fibrinogen glycation *in vivo* leads to a prothrombotic state. As the fibrinogen modifications in our work are of the same nature (glycation) we suggest that, despite delaying lag phase, the generation of resistant fibers could also contribute to the prothrombotic scenario seen *in vivo*.

It is important to mention that in experiments with total plasma other proteins could be target of carbonylation and thus highlight effects. In experiments with fibrinogen, only thrombin was added to trigger coagulation and there were no cross-linking between fib-

rinogen monomers, since our system lacks the factor XIIIa. Thus, in this model, trypsin and plasmin may digest the clot easier, since it was not stabilized by alpha and gamma cross-linking.

Surprisingly, AMG caused an increase in plasmin and trypsin fibrinolytic activity (data not shown). Others have shown that plasmin incubated in the presence of urea in concentrations above 3 M have an unusual stability to autolysis [33] and that urea, freeze/drying and other kinds of fibrinogen denaturation have a stimulatory effect on plasminogen activation [34]. Maybe AMG causes exposition of cleavage sites in fibrin or increases enzymatic activity of trypsin and plasmin, making it impossible to analyze the data. Further studies must consider the use of other anti-carbonyl agents.

AMG is able to trap reactive carbonyl and, in concentrations above 1 mM, may act as antioxidant [35]. In the present study, co-treatments with antioxidants were unable to avoid the delay in coagulation times and protein carbonylation caused by GA (data not shown). We suggest that post-translational modification and impairment in coagulation/fibrinolysis are caused by direct reaction between GA and residues of lysine and arginine, through Schiff base formation, without any major participation of free radicals. Despite the reported toxicity of AMG [36], we used 2.5 mM and 10 mM in experiments with isolated fibrinogen and total plasma, respectively. *In vivo*, these doses would have other side effects because AMG is a potent inhibitor of iNOS ($\text{IC}_{50} = 31 \mu\text{M}$) and inhibits pyruvate metabolism with a deduced IC_{50} of 7 mM. Taken together, these data suggest that the beneficial effects of carbonyl scavengers seen in diabetes trials could be related, at least in part, to the preservation of haemostasis by avoiding fibrinogen carbonylation.

In fibrinogen, lysine and arginine are central to many events, such as in the release of fibrinopeptide A during thrombin-catalyzed coagulation and as binding sites to start fibrinolysis mediated by plasmin [22]. GA has already been demonstrated to be able to react with lysine residues present in RNase and cause cross-linking [37]. The data presented in Fig. 5 suggest that GA promotes cross-linking between fibrinogen chains. At least three high molecular bands were detected after 4 h of incubation (Fig. 5) and it may contribute to increased stability of the fibrin network and resistance to enzymatic digestion. Unfortunately, we were not able to answer with which residues GA reacts to decrease clotting rates and fibrinolysis and further studies are necessary to investigate this issue. One possible site of carbonylation is in the N-terminus of the alpha chain. This region contains the fibrinopeptide A, which must be released by thrombin to start fibrin assembly by exposing the polymerization site termed E_A [38]. Carbonylation in this region would decrease FPA release or impair the E_A region. In both cases, we would see a decreased rate of lateral association. Moreover, the decreased rate of FPA release causes the fibrin network to be more branched and less porous [39,40]. Another site of carbonylation could be arginine and lysine residues, which compound the cleavage site of trypsin and plasmin.

Summarizing, our data show that GA is an important agent in post-translational modifications of plasma proteins, mainly fibrinogen, and that these modifications induce the formation of persistent clots, although delaying clotting time. We suggest that clot stability may be induced by the decreased rate of fibrin formation and by cross-linkage between fibrinogen chains.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgment

We are grateful to CNPq for their financial support.

References

- [1] M.E. Carr, Diabetes mellitus: a hypercoagulable state, *J. Diabetes Complications* 15 (2001) 44–54.
- [2] M. Levi, T. van der Poll, Two-way interactions between inflammation and coagulation, *Trends Cardiovasc. Med.* 15 (2005) 254–259.
- [3] C.E. Dempfle, Coagulopathy of sepsis, *Thromb. Haemost.* 91 (2004) 213–224.
- [4] M.E. Stegenga, S.N. van der Crabben, M. Levi, A.F. de Vos, M.W. Tanck, H.P. Sauerwein, P.T. van der, Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans, *Diabetes* 55 (2006) 1807–1812.
- [5] S. Gando, A. Sawamura, M. Hayakawa, H. Hoshino, N. Kubota, J. Nishihira, High macrophage migration inhibitory factor levels in disseminated intravascular coagulation patients with systemic inflammation, *Inflammation* 30 (2007) 118–124.
- [6] D. Salvemini, S. Cuzzocrea, Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 1173–1185.
- [7] C. Vadseth, J.M. Souza, L. Thomson, A. Seagraves, C. Nagaswami, T. Scheiner, J. Torbet, G. Vilare, J.S. Bennett, J.C. Murciano, V. Muzykantov, M.S. Penn, S.L. Hazen, J.W. Weisel, H. Ischiropoulos, Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8820–8826.
- [8] V.G. Nielsen, J.P. Crow, F. Zhou, D.A. Parks, Peroxynitrite inactivates tissue plasminogen activator, *Anesth. Analg.* 98 (2004) 1312–1317, table.
- [9] D.L. Sauls, A.S. Wolberg, M. Hoffman, Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 300–306.
- [10] T. Murakami, H. Egawa, Y. Komiyama, M. Masuda, K. Murata, Increased accumulation of nonenzymatically glycosylated fibrinogen in the renal cortex in rats, *Thromb. Res.* 58 (1990) 23–33.
- [11] M. Pieters, N. Covic, F.H. van der Westhuizen, C. Nagaswami, Y. Baras, L.D. Toit, J.C. Jerling, D. Elgar, K.S. Edmondson, D.G. van Zyl, P. Rheeder, J.W. Weisel, Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes—a purified fibrinogen model, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 691–700.
- [12] M.A. Glomb, V.M. Monnier, Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 10017–10026.
- [13] M.M. Anderson, S.L. Hazen, F.F. Hsu, J.W. Heinecke, Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 424–432.
- [14] M.M. Anderson, J.W. Heinecke, Production of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase: a role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation, *Diabetes* 52 (2003) 2137–2143.
- [15] R. Nagai, C.M. Hayashi, L. Xia, M. Takeya, S. Horiuchi, Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 48905–48912.
- [16] I. Lerant, K. Kolev, J. Gombas, R. Machovich, Modulation of plasminogen activation and plasmin activity by methylglyoxal modification of the zymogen, *Biochim. Biophys. Acta* 1480 (2000) 311–320.
- [17] J. Zeng, R.A. Dunlop, K.J. Rodgers, M.J. Davies, Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols, *Biochem. J.* 398 (2006) 197–206.
- [18] P.E. Morgan, R.T. Dean, M.J. Davies, Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products, *Arch. Biochem. Biophys.* 403 (2002) 259–269.
- [19] B.E. Brown, R.T. Dean, M.J. Davies, Glycation of low-density lipoproteins by methylglyoxal and glycolaldehyde gives rise to the *in vitro* formation of lipid-laden cells, *Diabetologia* 48 (2005) 361–369.
- [20] H. Ukeda, Y. Hasegawa, T. Ishi, M. Sawamura, Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (1997) 2039–2042.
- [21] Z. Ding, Y. Xu, A rapid simplified purification of bovine thrombin, *Prep. Biochem.* 25 (1995) 21–28.
- [22] V.H. Flood, H.A. Al-Mondhry, D.H. Farrell, The fibrinogen Aalpha R16C mutation results in fibrinolytic resistance, *Br. J. Haematol.* 134 (2006) 220–226.
- [23] A.B. Veiga, A.F. Pinto, J.A. Guimaraes, Fibrinogenolytic and procoagulant activities in the hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia obliqua* caterpillars, *Thromb. Res.* 111 (2003) 95–101.
- [24] R.L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter, Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 346–357.
- [25] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [26] S.R. Thorpe, J.W. Baynes, Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives, *Amino Acids* 25 (2003) 275–281.
- [27] C.P. Gale, T.S. Futers, L.K. Summers, Common polymorphisms in the glyoxalase-1 gene and their association with pro-thrombotic factors, *Diab. Vasc. Dis. Res.* 1 (2004) 34–39.
- [28] A.M. Schmidt, S.D. Yan, J.L. Wautier, D. Stern, Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis, *Circ. Res.* 84 (1999) 489–497.
- [29] V.H. Flood, C. Nagaswami, I.N. Chernysh, H.A. Al-Mondhry, J.W. Weisel, D.H. Farrell, Incorporation of fibrin molecules containing fibrinopeptide A alters clot ultrastructure and decreases permeability, *Br. J. Haematol.* 138 (2007) 117–124.
- [30] T.H. Mondoro, C.D. Wall, M.M. White, L.K. Jennings, Selective induction of a glycoprotein IIIa ligand-induced binding site by fibrinogen and von Willebrand factor, *Blood* 88 (1996) 3824–3830.
- [31] E. Shacter, J.A. Williams, M. Lim, R.L. Levine, Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay, *Free Radic. Biol. Med.* 17 (1994) 429–437.
- [32] A. Jaleel, P. Halvatsiotis, B. Williamson, P. Juhasz, S. Martin, K.S. Nair, Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment, *Diabetes Care* 28 (2005) 645–652.
- [33] N.S. Choi, J.H. Hahm, P.J. Maeng, S.H. Kim, Comparative study of enzyme activity and stability of bovine and human plasmins in electrophoretic reagents, beta-mercaptoethanol, DTT, SDS, Triton X-100, and urea, *J. Biochem. Mol. Biol.* 38 (2005) 177–181.
- [34] U. Haddeland, A. Bennick, F. Brosstad, Stimulating effect on tissue-type plasminogen activator—a new and sensitive indicator of denatured fibrinogen, *Thromb. Res.* 77 (1995) 329–336.
- [35] P.J. Thornalley, Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products, *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (2003) 31–40.
- [36] T. Taguchi, M. Sugiura, Y. Hamada, I. Miwa, *In vivo* formation of a Schiff base of aminoguanidine with pyridoxal phosphate, *Biochem. Pharmacol.* 55 (1998) 1667–1671.
- [37] A.S. Acharya, J.M. Manning, Reaction of glycolaldehyde with proteins: latent crosslinking potential of alpha-hydroxyaldehydes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 3590–3594.
- [38] M.W. Mosesson, Fibrinogen and fibrin structure and functions, *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 1894–1904.
- [39] M.W. Mosesson, J.P. DiOrio, M.F. Muller, J.R. Shainoff, K.R. Siebenlist, D.L. Amrani, G.A. Homandberg, J. Soria, C. Soria, M. Samama, Studies on the ultrastructure of fibrin lacking fibrinopeptide B (beta-fibrin), *Blood* 69 (1987) 1073–1081.
- [40] B. Blomback, K. Carlsson, K. Fatah, B. Hessel, R. Procyk, Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation, *Thromb. Res.* 75 (1994) 521–538.

Artigo 2

Rats Treated With Glycolaldehyde Display Prothrombotic Profile and Fibrinogen Glycation

Michael Éverton Andrades, Rodrigo Lorenzi, Rafael Calixto Bortolin, Ryioji Nagai, José Cláudio Fonseca Moreira, Felipe Dal-Pizzol

Manuscrito a ser submetido.

Rats Treated With Glycolaldehyde Display Prothrombotic Profile and Fibrinogen Glycation

Michael Éverton Andrades^{a,1}, Rodrigo Lorenzi^a, Rafael Calixto Bortolin^a, Ryoji Nagai^c, José Cláudio Fonseca Moreira^a, Felipe Dal-Pizzol^{a,b}

^a Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Depto. Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^b Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma – SC, Brazil

^c Department of Food and Nutrition, Laboratory of Biochemistry & Nutritional Science, Japan Women's University, Tokyo - Japan

¹ Corresponding author:

Michael Everton Andrades

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – ANEXO – laboratório 32

Porto Alegre, RS – Brazil - CEP: 90035-003

Phone: 55 51 3308 5578

Fax: 55 51 3308 5540

e-mail: andrades_m@yahoo.com.br

Abstract

The increased level of circulating reactive aldehydes is a common feature in diabetic patients. They can arise from oxidative attack on lipids and amino acids, as by-products of glycolysis or inflammatory process. Among these aldehydes, glycolaldehyde has been described as important in the generation of Advanced Glycation End-products (AGEs). Another feature seen in diabetes is a prothrombotic profile which increases the risk of atherothrombotic events. Fibrinogen is a key protein during the coagulation process, and its susceptibility to oxidative damage and glycation suggests that it plays a central role in coagulopathies in diabetic patients. In this study, we aimed to evaluate if increased levels of GA in rats, induced by a single i.v. administration, was capable of mimicking the prothrombotic profile seen in diabetes. Plasma from GA-injected rats display increased levels of protein oxidation, as evidenced by carbonyl generation and sulfhydryl oxidation. GA-injected rats also displayed prothrombotic profile, since there is a decrease in time necessary to plasma to clot. To isolate any possible confounding factors, we isolated the fibrinogen from rat plasma. There was an increase in N^{ϵ} -(carboxymethyl)lysine formation in fibrinogen from rats injected with GA, when compared with control group. Also, the conversion of fibrinogen isolated from GA-injected rats in fibrin presented a delay, when compared with control group. These data suggest the effect of GA upon fibrinogen, which promotes a delay in polymerization times. Also, GA has other effects on vascular system that promote the acceleration of plasma clotting.

Introduction

Hyperglycemia and atherothrombotic events are common features of diabetes. Myocardial infarction incidence is 3 to 5 times more frequent in type II diabetic patients than in non-diabetic [1, 2]. This is partly attributed to the procoagulant state of diabetic patient. Tissue factor release, decreased plasminogen and anticoagulant protein C levels [3] and fibrinogen modifications [4] are considered the main causes of this elevated incidence.

Fibrinogen has been described as a protein target to oxidative attack in presence of metal [5] and glycating agents [6]. Cardiovascular diseases also show increased fibrinogen carbonylation and nitration, which is accompanied by an increase in its coagulability [7, 8]. Diabetes, which constitutes a risk factor for cardiovascular diseases, also presents increased fibrinogen glycation, which can be decreased after insulin treatment [9, 10].

Fibrinogen post translational modifications cause alterations in the kinetics of fibrin generation, as well as in the architecture of the fibrin network. In type 2 diabetes, fibrin network is denser and less porous, which contributes to the generation of plasmin resistance [11]. This resistance could result in the enhanced level of circulating thrombus in the vascular tree, promoting the occurrence of atherothrombotic events.

Besides the effects of glucose as a glycating agent, there are another compounds present in the metabolic milieu associated with diabetes. Reactive aldehydes, generated in the glycolysis metabolism, lipid oxidation or amino acid oxidation, also contribute to the generation of glycating agents. Thus, the most studied reactive aldehydes are glycolaldehyde (GA) [6, 12, 13] and

methylglyoxal (MG) [13, 14]. Macrophages that were incubated in presence of glycated LDL (with GA or MG) resulted in foam cells [13]. Moreover, it was already indentified the presence of GA-modified proteins in atherosclerotic lesion and in the foam cells cytoplasm [12]. Our group have recently demonstrated in vitro that GA is able to induce fibrin carbonylation that is followed by decreased rate of fibrin polymerization and resistance to enzymatic lysis [6]. This finding raises the question of whether increased levels of GA in vivo could cause haemostatic alterations similar to that seen in vitro and if fibrinogen is involved.

Materials and methods

In vivo studies were performed in accordance with the National Institutes of Health guidelines and with the approval of the local ethics committee.

Glycolaldehyde dimer (G6805), bovine fibrinogen (F8630) and bovine thrombin (T4648) were purchased from Sigma-Aldrich Co. Protease inhibitor cocktail (14150700) was purchased from Roche Diagnostics, Germany. All other reagents were of analytical grade.

GA administration

Male Wistar rats (3 m.o.) were anesthetized with a mix of ketamine (100mg/kg) and xylazine (10mg/kg) before dorsal penis vein injection of 100 μ L of NaCl 0.9% (control) or GA (10, 50 or 100mg/Kg). Rats were returned to its cages and maintained for 6, 12 or 24 hours.

Blood collection, plasma coagulation and clot digestion

Rats were anesthetized, as described above, and blood was collected in citrate tubes through cardiac puncture. Plasma was isolated by centrifugation (1200xg, 15 min). Plasma (160 μ L) was added to a 96-well plate and clotting was triggered with the addition of 40 μ L CaCl₂ (final concentration 10mM) and monitored spectrophotometrically (650 nm) at 37 °C [15]. After complete clot formation, 50 μ L trypsin (1.5 mg) was added on top of the clot and lysis was monitored at 405nm [15]. Lag phase and area under the curve (AUC) were recorded. The lag phase represents the time required for fibrin fibers to grow sufficiently to allow lateral aggregation and it was measured at the point where optical density (O.D.) increased 0.015 from baseline. AUC was used for statistical comparison between treatments.

Protein carbonylation

A plasma aliquot containing 1 mg of protein was dissolved in 2M HCl (final volume of 500 μ L). 2,4-dinitrophenylhydrazine (500 μ L) was added and reaction was stopped after 30 min with the addition of TCA 10% and centrifugation (10,000xg, 10 min). Pellets were washed three times with ethanol:ethyl acetate (1:1) and dissolved in 8M urea (pH 2.3) and centrifuged. The resulting supernatant was read at 380 nm. We ran a blank in parallel to each sample, which had 2,4-dinitrophenylhydrazine replaced by 2M HCl [16].

Measurement of protein thiol content

Protein thiol content in plasma was analyzed to estimate oxidative

alterations in protein cystein residues. In brief, an aliquot containing 3mg of protein was diluted in 0.1% sodium dodecyl sulfate. 5,5'-dithionitrobis(2-nitrobenzoic acid) (0.01M) in ethanol was added, and the intense yellow color was developed and read in a spectrophotometer at 412 nm after 20 minutes. Results are expressed percentage of control [17].

Fibrinogen purification and fibrinocoagulation

A protease inhibitor cocktail (500 μ L) was added to whole blood before centrifugation, in order to avoid fibrinolysis activation and fibrinogen degradation. Plasma was isolated as described above and 1mL was transferred to another tube, containing 80mM BaCl₂ (30min, 4°C, under agitation), in order to precipitate vitamin K dependent proteins. The plasma was centrifuged (4500xg, 20 min, 4°C) and the supernatant was moved to another tubes, mixed with equal volume of 50% (NH₄)₂SO₄ (1h, 4°C, under agitation) and centrifuged (7000xg, 4°C, 20min). Now, supernatant was discarded and pellet was suspended in 1mL of 50mM citrate-phosphate buffer (Ph 6.6). The same volume of (NH₄)₂SO₄ was added and tubes were maintained for 1 hour, at 4°C, under agitation. Tubes were centrifuged (7000xg, 20 min, 4°C) and supernatant discarded. Pellets were suspended in 1mL of 10mM citrate buffer/100mM NaCl (pH 7.3) and dialyzed against 1L of 10mM citrate buffer (pH 7) overnight, at 4°C [18].

Fibrinocoagulation was run in 96 well microplate using 200ug of fibrinogen. Volumes were adjusted to 90 μ L using 50mM HEPES (pH 7,4) and polymerization was triggered using 10 μ L of thrombin (0,025 NIH U/ μ L),

according [6]. Onset time was recorded as index of time required to fibrin fibers to grow sufficiently to allow lateral aggregation and was taken at the time where the absorbance increased 0.015 from the baseline. Maximal absorbance is an index of average fiber thickness [19].

Western blotting

Purified fibrinogen was mixed in a reducing sample buffer (20% (v/v) glycerol, 120mMTris, 4% (w/v) SDS, 0.002% (w/v) bromophenol blue, 10% (v/v) betamercaptoethanol, pH6.75) and samples (7ug) were run in a 10% SDS-PAGE (20mA) under reducing conditions. Commercial fibrinogen (Sigma) was run in parallel to as molecular weight marker. Samples were electrotransferred onto nitrocellulose membranes at 75mA for 180 min. Afterwards, membranes were blocked with TTBS (0.1% Tween, Tris buffered saline) containing 5% BSA for 1 hour. The membranes were incubated with anti-AGE (2G11) (1:2500) overnight (4°C). After washing with TTBS, membranes were incubated with peroxidase-labeled antimouse IgG (1:10000) for 2 hours at room temperature. The reaction was developed using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

Statistical Analysis

Analysis were made using ANOVA followed by Dunnett test. Significance were considered when $P < 0.05$.

Results

GA administration induces plasma protein carbonylation and sulfhydryl oxidation

Protein carbonyl is an indicative of lysine and arginine modification, mainly due to metal ion-catalyzed oxidation and reaction of primary amino groups with reducing sugars or reactive aldehydes [20]. Sulfhydryl oxidation may result from oxidative attack as well as after reactive aldehydes reaction [21]. Figure 1 shows that there is an early plasma carbonyl generation (6 hours after GA administration), whereas a late sulfhydryl oxidation (24 hours after GA administration).

GA administration accelerates the plasma coagulation time and alters the net architecture

Figure 2A shows that GA administration decreases the time needed to plasma coagulate. Unexpectedly, it did happen in time or dose dependent. The fibrin net architecture also changed after GA administration. The increase in maximal absorbance indicates the generation of thicker fibers (figure 2B). Despite these alterations, there is no alteration in the susceptibility of plasma clot to trypsin action (figure 2C).

Fibrinogen isolated from GA injected rats is glycated

Glycation was analyzed just at 24 hours after GA administration. There is an increase in glycation in the 50mg/kg dose and there are no difference in glycation among the fibrinogen chains (figure 3).

Fibrinogen isolated from GA injected rats display a delay in the onset time

Fibrinogen isolated from rats injected with GA display a delay in all doses analyzed (figure 4A). Fibrin net did not show alteration in maximal absorbance, indicating a lack of alteration in the net architecture (figure 4B).

Discussion

Type 2 diabetes is associated with increased risk of atherothrombotic events. The underlying factors are not completely understood. Fibrinogen levels, platelet activation, extrinsic factors release, fibrinolysis inhibition and post-translational modification are already described as key events in the atherothrombotic development [1, 3]. Fibrinogen is considered the most susceptible plasma protein to oxidative attack [5] and it was already described that diabetic patients present increased levels of glycation, which can be controlled with insulin treatment [4, 11]. We previously showed that GA induces carbonyl formation in plasma proteins and resistance to fibrinolysis in an *in vitro* study [6]. Here we show that increasing levels of GA *in vivo* can raise the plasma protein post-translational modifications (figure 1). The increased levels of carbonylation suggest that arginine and lysine residues are target to GA attack, as previously described [22]. GA administration also decreases the levels of free thiol (figure 1B), which can partly be attributed to the direct reaction between GA and cysteine residues [23]. Indirect effects of GA, such as free radicals mediated protein oxidation can not be excluded and, in fact, there are evidences supporting this mechanism in cell culture [24].

There are several evidences showing that post-translational fibrinogen modification by either oxidation or glycation result in dysfunction in its coagulability pattern, as well as in its susceptibility to enzymatic lysis. Clots formed by fibrinogen from type 2 diabetic patients displayed thicker fibers with a less porous structure when compared with healthy subjects. These data relate strongly with both fasting glucose and HbA_{1c} [11]. Moreover, these alterations lead to generation of a plasmin-resistant fibrin [25]. Interestingly, healthy relatives of patients with coronary arterial disease (CAD) also showed decreased lag time and porosity when compared with age matched controls, factor that could contribute to the development of CAD [26]. Here we present evidences that GA can also mediate post-translational modification in plasma proteins, which contributes to shorten lag time, despite not affecting fibrinolysis (figure 2).

The bias in analyzing the whole plasma is that the interference of other plasma proteins can not be ruled out. In fact, it was already described that glycated albumin can induce apoptosis and tissue factor release in cultured human endothelial vein endothelial cells [27]. Moreover, direct effects of aldehydes on vascular cells are also important. Methylglyoxal, another high reactive aldehyde that is elevated in diabetes, is able to induce mitochondrial superoxide production in cultured endothelial cells [28], as well as to promote platelet-neutrophil aggregation and tissue factor release [29]. In the same way, endothelial cells treated with glyoxal, an oxo-aldehyde that can arise from GA oxidation, display higher levels of COX-2 [30]. We could eliminate these indirect effects by isolating fibrinogen and assessing its post-translational modifications,

as well as its coagulatory characteristics.

Fibrinogen isolated from GA-injected rats display increased levels of N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML), evidenced by western blot analysis employing the specific anti-CML 2G11 antibody [31]. Lys is a central amino acid in coagulation proteins. Modification of fibrinogen lys residues can impair the cleavage of fibrinopeptide A during the thrombin-catalyzed fibrin polymerization, as well as impair sites responsible for plasmin approach during fibrinolysis [15, 32]. Contrarily to our findings concerning the coagulation with whole plasma (figure 2), fibrinogen isolated from GA-injected rats displayed delayed times of coagulation (figure 4A) and present no difference in the fiber thickness, evaluated by maximal absorbance (figure 4B).

Despite this apparent anticoagulant effect seen when using isolated fibrinogen, it is noteworthy that most of fibrinogen modifications *in vivo* cause impaired fibrin polymerization and it is accompanied by prothrombotic state, not hemorrhage. A mutation in an arginine residue in fibrinopeptide A (A α R16C) leads 15% of the patients to present thrombosis [32]. Moreover, fibrinogen with A α R16C is resistant to enzymatic lysis induced by both plasminogen or trypsin [15]. We have previously described that either plasma or fibrinogen incubated *in vitro* with GA display increased levels of carbonyl and delayed times of coagulation. Despite this apparent anticoagulant effect of GA, we also show that fibrin was resistant to enzymatic action of either trypsin or plasmin, suggesting the generation of persistent clots that could contribute to vascular events seen in some pathologies [6]. The apparent contradiction between whole plasma and isolated fibrinogen coagulation times can also be partly explained by the

aforementioned effect of GA and CML on other vascular cells, such as platelets, endothelial cells and leukocytes [27-30, 33].

In conclusion, our data point to a prothrombotic effect of GA *in vivo* that is can be partly attributed to glycation of fibrinogen and partly attributed to action of GA and AGEs on vascular cells.

References

1. Grant, P.J., *Diabetes mellitus as a prothrombotic condition*. J Intern Med, 2007. **262**(2): p. 157-72.
2. Aronson, D. and E.J. Rayfield, *How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms*. Cardiovasc Diabetol, 2002. **1**: p. 1.
3. Carr, M.E., *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. J Diabetes Complications, 2001. **15**(1): p. 44-54.
4. Pieters, M., et al., *Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes - a purified fibrinogen model*. Thromb Haemost, 2008. **99**(4): p. 691-700.
5. Shacter, E., et al., *Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay*. Free Radic.Biol.Med., 1994. **17**(5): p. 429-437.
6. Andrades, M.E., et al., *Glycolaldehyde induces fibrinogen post-translational modification, delay in clotting and resistance to enzymatic digestion*. Chem Biol Interact, 2009. **180**(3): p. 478-84.

7. Vadseth, C., et al., *Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species*. J Biol.Chem., 2004. **279**(10): p. 8820-8826.
8. Paton, L.N., et al., *Increased thrombin-induced polymerization of fibrinogen associated with high protein carbonyl levels in plasma from patients post myocardial infarction*. Free Radic Biol Med, 2009.
9. Pieters, M., et al., *Glycation of fibrinogen in uncontrolled diabetic patients and the effects of glycaemic control on fibrinogen glycation*. Thromb Res, 2007. **120**(3): p. 439-46.
10. Jaleel, A., et al., *Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(3): p. 645-52.
11. Dunn, E.J., R.A. Ariens, and P.J. Grant, *The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function*. Diabetologia, 2005. **48**(6): p. 1198-206.
12. Nagai, R., et al., *Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48905-12.
13. Brown, B.E., R.T. Dean, and M.J. Davies, *Glycation of low-density lipoproteins by methylglyoxal and glycolaldehyde gives rise to the in vitro formation of lipid-laden cells*. Diabetologia, 2005. **48**(2): p. 361-369.
14. Lerant, I., et al., *Modulation of plasminogen activation and plasmin activity by methylglyoxal modification of the zymogen*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1480**(1-2): p. 311-20.
15. Flood, V.H., H.A. Al-Mondhiry, and D.H. Farrell, *The fibrinogen Aalpha*

- R16C mutation results in fibrinolytic resistance.* Br.J Haematol., 2006. **134**(2): p. 220-226.
16. Levine, R.L., et al., *Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins.* Methods Enzymol., 1994. **233**: p. 346-357.
 17. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups.* Arch Biochem Biophys, 1959. **82**(1): p. 70-7.
 18. Vieira, C.O., et al., *Bothrops jararaca fibrinogen and its resistance to hydrolysis evoked by snake venoms.* Comparative Biochemistry and Physiology, 2008. **151**: p. 428-432.
 19. Weisel, J.W. and C. Nagaswami, *Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled.* Biophys J, 1992. **63**(1): p. 111-28.
 20. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.* Amino Acids, 2003. **25**(3-4): p. 207-18.
 21. Zeng, J., et al., *Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols.* Biochem.J, 2006. **398**(2): p. 197-206.
 22. Valencia, J.V., 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): p. 68-78.
 23. Adrover, M., et al., *Kinetic study of the reaction of glycolaldehyde with*

- two glycation target models*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1126**: p. 235-40.
24. Al-Enezi, K.S., M. Alkhalaf, and L.T. Benov, *Glycolaldehyde induces growth inhibition and oxidative stress in human breast cancer cells*. Free Radic Biol Med, 2006. **40**(7): p. 1144-51.
 25. Dunn, E.J., et al., *Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2006. **49**: p. 1071-1080.
 26. Mills, J.D., et al., *Altered Fibrin Clot Structure in the Healthy Relatives of Patients With Premature Coronary Artery Disease*. Circulation, 2002. **106**: p. 1938-1942.
 27. Min, C., et al., *Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells*. Diabetes Res Clin Pract, 1999. **46**(3): p. 197-202.
 28. Miyazawa, N., et al., *Methylglyoxal augments intracellular oxidative stress in human aortic endothelial cells*. Free Radic Res, 2010. **44**(1): p. 101-7.
 29. Gawlowski, T., et al., *AGEs and methylglyoxal induce apoptosis and expression of Mac-1 on neutrophils resulting in platelet-neutrophil aggregation*. Thromb Res, 2007. **121**(1): p. 117-26.
 30. Yamawaki, H. and Y. Hara, *Glyoxal causes inflammatory injury in human vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(4): p. 1155-9.
 31. Mera, K., et al., *Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products*. J Immunol

- Methods, 2008. **334**(1-2): p. 82-90.
32. Flood, V.H., et al., *Incorporation of fibrin molecules containing fibrinopeptide A alters clot ultrastructure and decreases permeability*. Br J Haematol, 2007. **138**(1): p. 117-24.
33. Gawlowski, T., et al., *Advanced glycation end products strongly activate platelets*. Eur J Nutr, 2009. **48**(8): p. 475-81.

Figure 1 – GA administration induces plasma protein carbonylation and sulfhydryl oxidation. Rats were injected (i.v.) in three doses of GA (10, 50 and 100mg/Kg) and plasma was collected 6, 12 or 24 hours after GA administration. Plasma was assayed for A) carbonyl levels and B) sulfhydryl levels. Data from each experiment were normalized to its control group, which is represented by the dotted line on the plot. All groups were compared with this value. Data are expressed as mean+S.E.M. (n=7). Statistical significance was determined using ANOVA followed by Dunnett test. (*) difference from control when $P<0.01$.

Figure 2 - GA administration accelerates the plasma coagulation time and alters the net architecture but does not affect fibrinolysis. Rats were injected (i.v.) in three doses of GA (10, 50 and 100mg/Kg) and plasma was collected 6, 12 or 24 hours after GA administration. Plasma coagulation was triggered with 10mM CaCl_2 and after complete coagulation, trypsin (1.5mg) was added to the top of the clot. A) The clotting time was recorded when absorbance reached 0.015 above the baseline. B) Maximal absorbance was the absorbance recorded when the clotting process reached the plateau. C) The time necessary to initiate fibrinolysis was recorded when absorbance decay 0.015 from baseline. Data from each experiment were normalized to its control group, which is represented by the dotted line on the plot. All groups were compared with this value. Data are expressed as mean+S.E.M. (n=7). Statistical significance was determined using ANOVA followed by Dunnett test. (*) difference from control when $P<0.01$.

Figure 3 - Fibrinogen isolated from GA injected rats is glycosylated. Rats were injected (i.v.) in three doses of GA (10, 50 and 100mg/Kg) and plasma was collected 24 hours after GA administration. Fibrinogen was isolated after 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and overnight dialysis. Samples were mixed with sample buffer, loaded (7ug) in a 10% SDS-PAGE and run at 20mA, 2 hours. Samples were electrotransferred onto nitrocellulose membranes at 75mA for 180 min. Membranes were blocked and incubated with anti-AGE (2G11) (1:2500) overnight (4°C). After washing with TTBS, membranes were incubated with peroxidase-labeled antimouse IgG (1:10000) for 2 hours at room temperature. Densitometry was performed using Image J software and the control group represented 100% for each experiment (n=4). Representative film is showed on the top. Statistical significance was determined using ANOVA followed by Dunnett test. (*) difference from control when $P<0.01$.

Figure 4 - Fibrinogen isolated from GA injected rats display a delay in the onset time. Rats were injected (i.v.) in three doses of GA (10, 50 and 100mg/Kg) and plasma was collected 24 hours after GA administration. Fibrinogen was isolated after 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation and overnight dialysis. Equal amount of fibrinogen was utilized in this assay (200 μ g). Fibrin polymerization was triggered after thrombin addition (25 NIH U/mL). A) Clotting time was recorded when absorbance reached 0.015 above the baseline (n=4). B) Maximal absorbance was recorded after polymerization reached a plateau (n=4). Statistical significance was determined using ANOVA followed by Dunnett test. (*) difference from control when $P<0.01$.

Figure 1

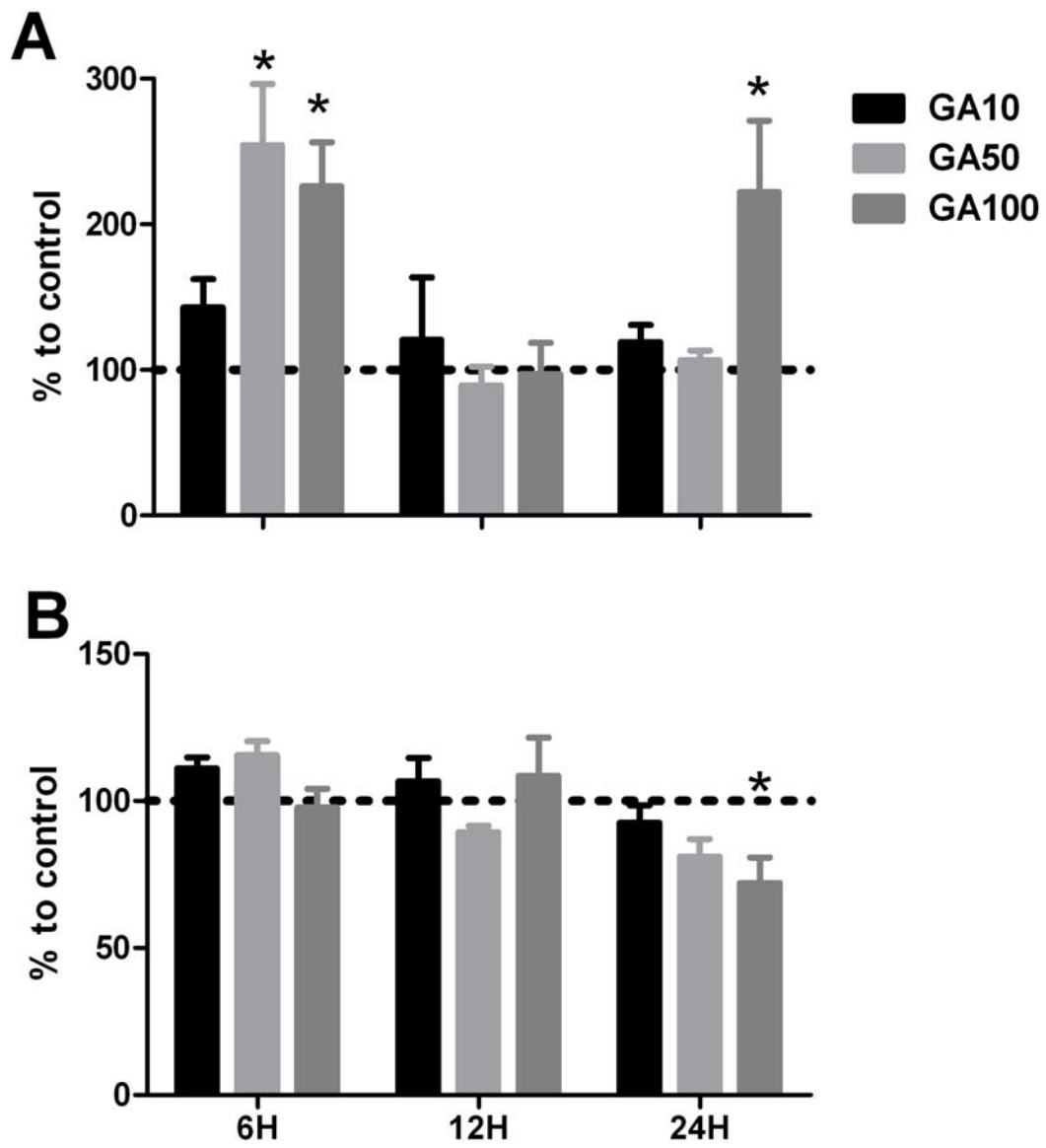


Figure 2

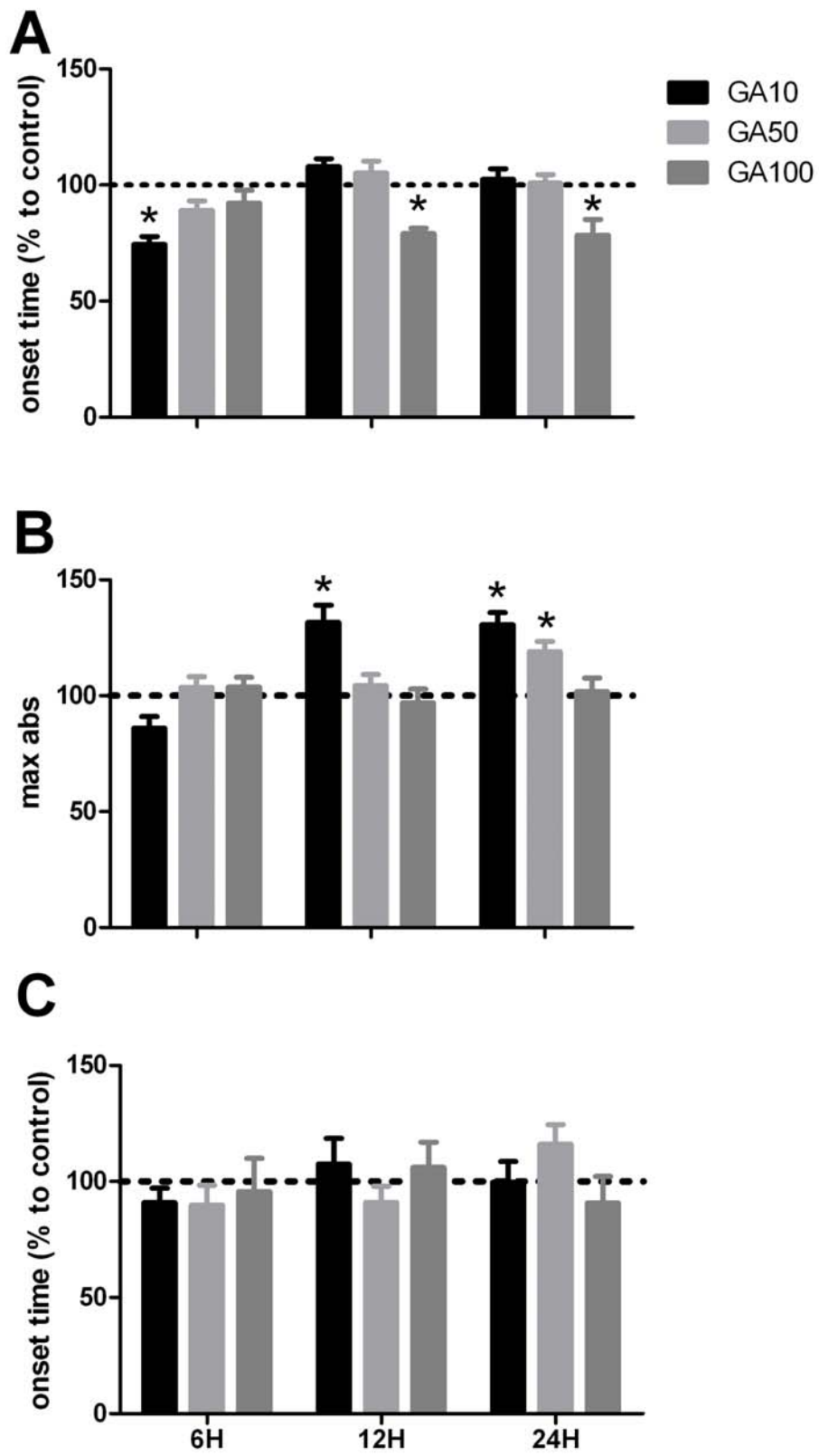


Figure 3

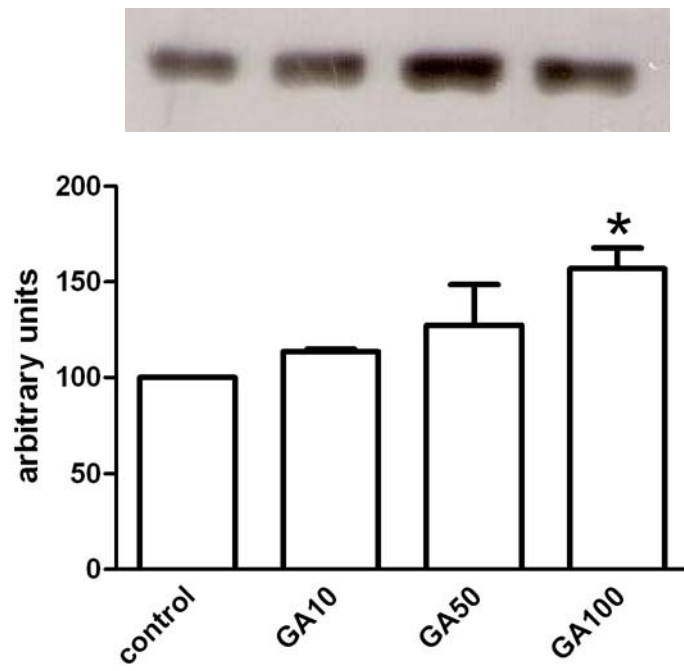
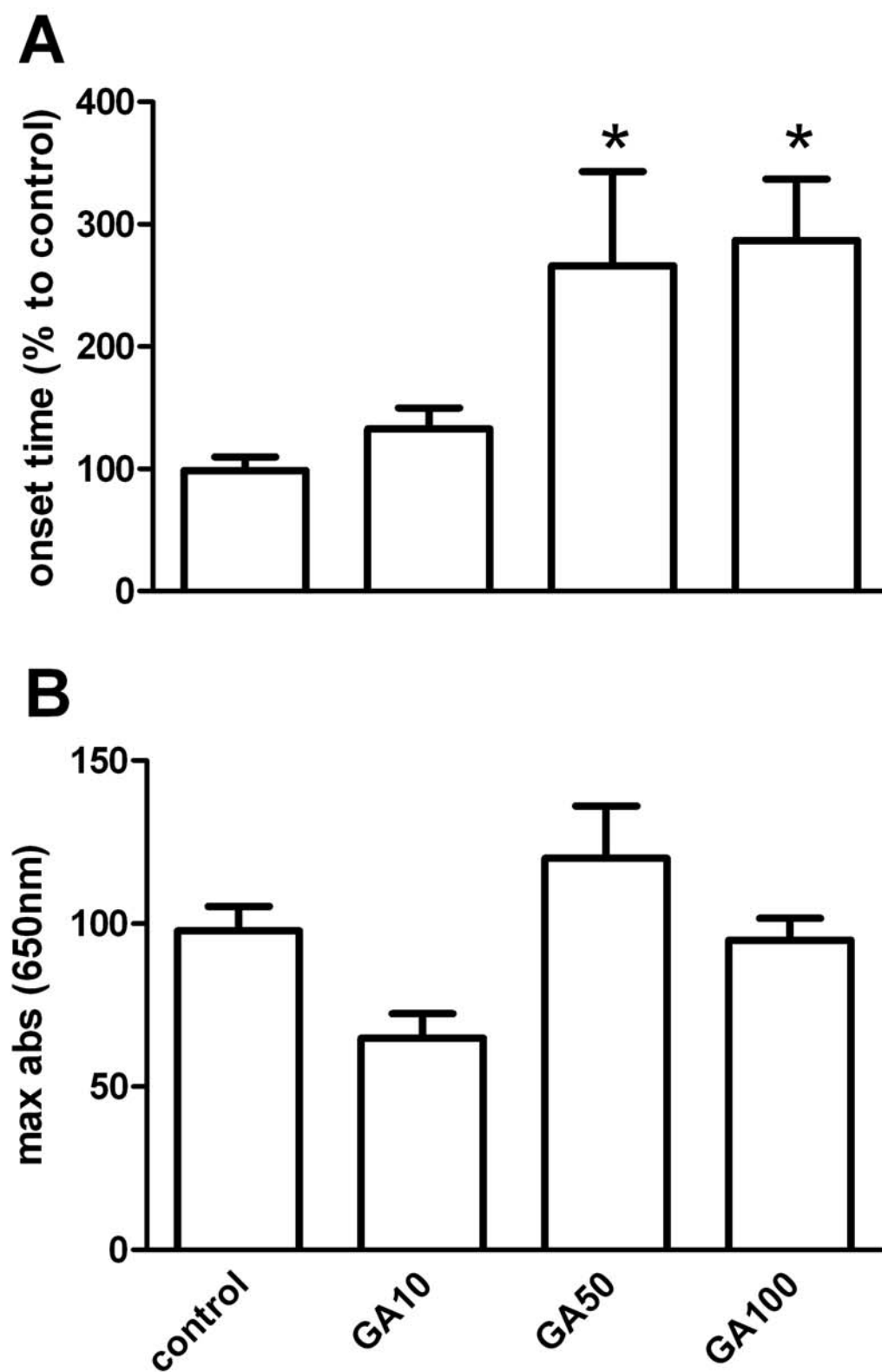


Figure 4



PARTE 3

3. DISCUSSÃO

Alguns trabalhos têm demonstrado que a hiperglicemia é capaz de interferir nos mecanismos hemostáticos de diversas formas. A glicação do fibrinogênio (DUNN *et al.*, 2006), o dano ao endotélio (NIEUWDORP *et al.*, 2006) e a ativação plaquetária (CARR, 2001) tem sido descritos como eventos centrais no desenvolvimento de doenças cardiovasculares no diabético. Apesar disso, poucos trabalhos têm investigado o papel de aldeídos de cadeia curta nessa disfunção. Este trabalho teve como objetivo investigar o papel do GA na disfunção hemostática causada pela interação entre o aldeído e proteínas da cascata de coagulação. A importância desse aldeído de cadeia curta nos mecanismos patológicos se deve ao fato de que sua concentração pode estar elevada em situações como inflamação, hiperglicemia e estresse oxidativo, devido ao aumento das suas fontes produtoras (GLOMB e MONNIER, 1995; ANDERSON *et al.*, 1997). Apesar disso, os níveis de GA não foram ainda quantificados e estima-se que pode facilmente alcançar concentrações de 200 μ M durante o processo inflamatório (ANDERSON *et al.*, 1997). A reação do GA com proteínas pode levar à formação de AGE (NAGAI *et al.*, 2002; VALENCIA *et al.*, 2004). Ainda, o GA pode agir diretamente sobre as células levando à geração de radicais livres (AL-ENEZI *et al.*, 2006) ou à formação de AGE intracelulares (NAGAI *et al.*, 2002). A presença de uma forma de AGE especificamente resultante da reação entre GA e proteínas (GA-piridina) foi identificada no citoplasma de células espumosas presentes em lesões ateroscleróticas (NAGAI *et al.*, 2002).

O fibrinogênio é uma proteína plasmática abundante (cerca de 4% das

proteínas plasmáticas) e ocupa papel central na hemostasia. A clivagem dos fibrinopeptídeos A e B pela trombina promove a conversão do fibrinogênio em fibrina, permitindo a sua polimerização e a formação do coágulo (GUYTON e HALL, 2005). Outra característica importante do fibrinogênio é a sua elevada suscetibilidade a modificações pós-traducionais (SHACTER *et al.*, 1994). Espécies reativas de nitrogênio são capazes de causar modificações no fibrinogênio que tornam sua polimerização mais rápida (VADSETH *et al.*, 2004). Ainda, a injeção de homocisteína em coelhos leva a modificações na estrutura da rede de fibrina e deixa o fibrinogênio resistente à ação de enzimas hidrolíticas (SAULS *et al.*, 2003). Baseando-se nesses dados prévios, nós sugerimos que o GA ocupa um importante papel no desenvolvimento da característica pró-coagulante vista no diabetes, e que a sua importância é subestimada pela ausência de dados na literatura científica.

No primeiro trabalho desta tese (Artigo 1) foi demonstrado que o plasma incubado com GA apresentou aumento no dano proteico, evidenciado pelo aumento nos grupamentos carbonil (Artigo 1, figura 4A). Ainda, a incubação com GA causou um retardo na velocidade de coagulação (Artigo 1, figura 1B). Esses resultados estão de acordo com a ideia de que alguns tipos de modificação pós-traducionais do fibrinogênio são capazes de alterar suas características na polimerização. Porém, o retardo na velocidade de coagulação aponta para um efeito anti-trombótico do GA, o qual não está de acordo com a hipótese de que o GA participa na geração de eventos pró-trombóticos. É importante lembrar que muitas disfibrogenemias apresentam retardo na velocidade de coagulação e ainda assim os pacientes apresentam

um perfil pró-trombótico (HAVERKATE e SAMAMA, 1995; FLOOD *et al.*, 2006). Para entender esse paradoxo aparente devemos olhar o sistema hemostático como um todo, considerando não só a coagulação, mas também a fibrinólise. Dificuldades na clivagem do fibrinopeptídeo A leva a uma polimerização lenta. A velocidade da coagulação é extremamente importante na definição da arquitetura das fibras da rede de fibrina, que por sua vez é um fator importante na determinação da resistência da rede de fibrina à ação proteolítica (BLOMBACK *et al.*, 1994; MOSESSON, 2005). Uma polimerização lenta tende a gerar associações entre três moléculas de fibrina, conhecidas como associação equilateral. Esse tipo polimerização é o principal responsável pela geração de ramificações em detrimento do espessamento das fibras. Conseqüentemente, há a formação de uma rede mais compacta e com fibras mais finas (MOSESSON, 2005) (Figura 3). Essa configuração tridimensional é capaz de determinar a suscetibilidade da fibrina à ação de enzimas. Exatamente isso foi verificado no Artigo 1. O coágulo formado foi resistente à ação da tripsina, uma serino-proteinase com sítios de clivagem semelhantes ao da plasmina (após lisina ou arginina em direção à posição c-terminal) (Artigo 1, figura 1D). Não se sabe ao certo o porquê do aumento das ramificações causar um aumento da resistência à proteólise. Alguns autores sugerem que as fibras finas não fornecem área de ligação suficientemente grande para a ligação de plasminogênio e t-PA (GABRIEL *et al.*, 1992; DUNN *et al.*, 2006). Outros sugerem que os dobramentos causados pelas ramificações geram impedimentos estéricos nos sítios de ligação das enzimas fibrinolíticas (GABRIEL *et al.*, 1992). Ainda, a maior compactação gera uma menor

permeabilidade do solvente contendo as enzimas e assim, a atividade proteolítica também encontrar-se-á reduzida (FLOOD *et al.*, 2007). Um quarto mecanismo está relacionado à formação de ligações cruzadas entre as moléculas de fibrina. Fisiologicamente, essas ligações são catalisadas pelo fator XIIIa (GUYTON e HALL, 2005). Porém, a longa exposição a esse fator promove a formação de ligações que estabilizam demasiadamente a rede de fibrina, promovendo a resistência à fibrinólise (SIEBENLIST *et al.*, 1996). O GA também pode gerar ligações cruzadas entre resíduos de aminoácidos contendo amina inter ou intramolecular, gerando agregados de alto peso molecular (ACHARYA e MANNING, 1983). Aqui, nós demonstramos que a incubação do GA com o fibrinogênio isolado também é capaz de formar agregados de alto peso molecular e assim, promover a resistência à ação proteolítica. Seja qual for o mecanismo, o fato é que a rede de fibrina gerada a partir de plasma de pacientes diabéticos é mais resistente à ação da plasmina do que a fibrina gerada a partir do plasma do grupo controle (DUNN *et al.*, 2006), efeito que pode ser causado pela reação entre o GA e proteínas plasmáticas.

A incubação do GA com o plasma total permitiu uma verificação final da coagulação e da fibrinólise, mas não permite avaliar cada um dos diversos componentes da cascata de coagulação. Na tentativa de isolar os efeitos do GA sobre os componentes da cascata de coagulação, foram avaliadas as vias intrínseca e extrínseca analisando o tempo de coagulação após a ativação preferencial de cada uma dessas vias. Como ambas as vias apresentavam atraso no tempo de coagulação, sugerindo uma alteração na via comum (Artigo 1, figura 2). Para testar a via comum, a formação do coágulo é disparada com

uma solução de trombina comercial. Portanto, qualquer atraso no tempo de coagulação pode ser única e exclusivamente atribuído a modificações no fibrinogênio. A verificação do atraso na via comum, somada ao fato de que o fibrinogênio é uma proteína abundante no plasma e é altamente susceptível a modificações pós-traducionais reforçou a hipótese de que essa proteína é um alvo da ação do GA. Para averiguar o efeito do GA sobre o fibrinogênio, foi realizada uma incubação de fibrinogênio puro (Sigma) com GA. Da mesma forma que com o plasma total, houve um aumento nos níveis de carbonil (Artigo 1, figura 4B), um retardo no tempo necessário para coagular e resistência à ação da plasmina e da tripsina (Artigo 1, figura 3).

Modificações pós-traducionais no fibrinogênio são importantes determinantes na clivagem dos fibrinopeptídeos, e conseqüentemente na polimerização da fibrina. Nesse contexto, modificações em resíduos de lisina são extremamente importantes. O Artigo 1 (figura 4) demonstra que houve aumento na geração de grupamentos carbonil quando o plasma ou o fibrinogênio foram incubados com GA. Esse tipo de alteração acontece preferencialmente em resíduos de arginina ou lisina e é geralmente catalisada por íons metálicos (Cu I ou Fe II). A presença de aldeídos reativos também levam a formação de grupamentos carbonil nesses resíduos através da formação de base de Schiff (STADTMAN e LEVINE, 2003). Essas modificações podem ter ocorrido em resíduos essenciais para a ação enzimática ou ainda em regiões de ligação da enzima ao substrato. A polimerização da fibrina expõe sítios de ligação ricos em lisina para t-PA e plasminogênio, os quais estão protegidos no fibrinogênio. A modificação de

resíduos neste sítio poderia ser parcialmente responsável pela inibição da lise enzimática vista no Artigo 1.

O sistema hemostático é composto de frações protéicas e celulares (GUYTON e HALL, 2005). A avaliação *in vitro* utilizada no Artigo 1 é capaz de isolar os efeitos sobre as proteínas da cascata de coagulação, mas deixa de avaliar os efeitos do GA no restante do sistema hemostático. A administração de GA em ratos (i.v.) foi o meio escolhido para avaliar se os efeitos desse aldeído são específicos sobre o fibrinogênio ou se sua presença no organismo tem efeitos sobre outras células do sistema hemostático.

A via de administração foi escolhida devido à alta reatividade do GA. A administração i.p. poderia desencadear efeitos localizados, não dando tempo de o GA chegar a corrente sanguínea. A volemia de ratos pode ser estimada utilizando a seguinte equação (LEE e BLAUFIX, 1985):

$$\text{Volemia (em mL)} = 0,06 \times \text{peso do animal (em gramas)} + 0,77$$

A partir desse valor de volume sanguíneo, foram escolhidas três diferentes doses de GA (10, 50 e 100mg/Kg) de modo que as concentrações sanguíneas foram de 1,3, 6,5 e 13 mM. Como a administração foi única e o GA é altamente reativo, a concentração sanguínea da molécula ficou próximo ao que pode ser alcançada em um estado patológico (entre 0,2 à 1mM).

Da mesma forma que no Artigo 1, a administração de GA *in vivo* levou a uma rápida carbonilação das proteínas plasmáticas (6 horas), que parece diminuir com o passar das horas (Artigo 2, figura 1A). Por outro lado, a oxidação de resíduos de cisteína aconteceu nos tempos mais tardios (24 horas) (Artigo 2, figura 1B).

Diferentemente do estudo *in vitro*, a administração de GA em ratos causou uma aceleração nos tempos de coagulação, avaliado pelo aumento da turbidez após a adição de CaCl₂ (Artigo 2, figura 2A). Não houve alteração na suscetibilidade à fibrinólise (Artigo 2, figura 2B). Novamente, olhando o balanço entre o sistema pró- e anti-coagulante, podemos inferir que o GA promove a geração de um perfil pró-coagulante nos animais, apesar de ter tido uma resposta bastante diferente daquela vista *in vitro* (Artigo 1, figura 1A e 1D). Porém, ao analisar a cinética de polimerização de fibrina utilizando o fibrinogênio isolado de ratos injetados com GA, verificou-se novamente um retardo no tempo necessário para polimerizar (Artigo 2, figura 4A). Esse resultado repete parcialmente aquele visto *in vitro* (Artigo 1, figura 3B) e sugere que os efeitos globais do GA no organismo se sobrepõe aos efeitos vistos no fibrinogênio isolado.

Esses efeitos globais do GA podem estar relacionados a dois eventos:

a) a geração de AGE plasmáticos, que levariam à ativação plaquetária e disfunção endotelial (MIN *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2007). Já foi descrito que plaquetas incubadas na presença de AGE expressam em sua membrana a P-selectina, marcador de ativação plaquetária, e RAGE (GAWLOWSKI *et al.*, 2009). Em outro estudo, plaquetas tratadas com albumina glicada apresentaram aumento da externalização de fosfatidilserina, um marcador precoce na ativação plaquetária (WANG *et al.*, 2007). A incubação de cultura primária de células endoteliais com albumina glicada promove apoptose e liberação de Fator Tecidual (MIN *et al.*, 1999) e expressão de VCAM (ISHIBASHIA *et al.*, 2010). *In vivo*, essas respostas celulares levariam a um

encurtamento nos tempos necessários para o plasma coagular, apesar de o fibrinogênio ainda sofrer as modificações pós-traducionais – carbonilação e glicação. A participação da sinalização de AGE via seus receptores (RAGE) parece ser de extrema importância na disfunção endotelial e no desenvolvimento da aterosclerose no diabetes, constituindo um alvo terapêutico promissor (HUDSON *et al.*, 2003). O bloqueio dessa sinalização por meio de sRAGE é capaz de prevenir a permeabilidade vascular no e diminuir a área da lesão aterosclerótica em ratos diabéticos (HUDSON *et al.*, 2003);

b) o GA pode agir diretamente sobre plaquetas e endotélio, levando a sua disfunção e ao encurtamento do tempo de coagulação. O glioxal, um aldeído relacionado ao glicolaldeído, é capaz de induzir a expressão da ciclooxigenase-2 e promover morte em células endoteliais cultivadas *in vitro* (YAMAWAKI e HARA, 2008). Recentemente foi demonstrado que o metilglioxal é capaz de promover o estresse oxidativo em células endoteliais por meio do aumento da produção de superóxido mitocondrial (MIYAZAWA *et al.*, 2010). O glicolaldeído já foi testado em alguns tipos celulares, mas nenhum relacionado ao sistema vascular. Em linhagem de câncer de pulmão (MCF7), o GA foi citotóxico em 20 μ M e ativou p53 e apoptose com 100 μ M. Esses eventos foram acompanhados de geração de radical superóxido e de aumento nos níveis celulares de proteínas carboniladas (AL-ENEZI *et al.*, 2006). Portanto, além da ação direta do GA sobre as proteínas da cascata de coagulação, o GA pode ter ações sobre qualquer célula que compunha o sistema vascular e que possa participar da regulação da coagulação/fibrinólise.

Da mesma forma que verificado no Artigo 1, o fibrinogênio isolado de

ratos injetados com GA apresentou aumento de dano (Artigo 2, figura 3). O parâmetro analisado foi o nível de CML presente no fibrinogênio, caracterizado após sua purificação, separação por eletroforese desnaturante e identificação de CML utilizando um anticorpo monoclonal (MERA *et al.*, 2008). Novamente aparecem aqui modificações em resíduos de lisina, centrais no processo de polimerização e fibrinólise.

A utilização de drogas anti-AGE tem sido avaliada como ferramenta terapêutica em diversos modelos *in vitro*, modelos animais de diabetes e em alguns estudos clínicos (PEYROUX e STERNBERG, 2006). A AMG é uma droga da classe dos quelantes de carbonil e age reagindo com os aldeídos antes que possam formar bases de Schiff com as proteínas (PEYROUX e STERNBERG, 2006). Ainda, essa droga é descrita como um potente quelante de metais em concentrações milimolares, e que esse seria o principal efeito benéfico dessa molécula (PRICE *et al.*, 2001). O No Artigo 1, a co-incubação com AMG evitou a geração de carbonil tanto no plasma quanto no fibrinogênio incubado com GA (Artigo 1, figura 4) e foi capaz de impedir o atraso no tempo de coagulação (Artigo 1, figura 3B). Como o mecanismo de carbonilação proteica, e mesmo a formação de CML, são processos que envolvem oxidação, o papel anti-AGE da AMG poderia estar sendo desempenhado por seu poder quelante de metais em vez do postulado poder anti-aldeídos. Price *et al.*(2001) descrevem que o IC₅₀ da AMG em um sistema de oxidação de ascorbato por íons cúpricos é de 2,5mM. Apesar de termos usado concentrações de 2,5 a 10mM de AMG no Artigo 1, nossos dados indicam que o papel primário desse molécula nesse sistema foi como quelante de aldeídos, uma vez que a co-

incubação com antioxidantes (trolox, vitamina c, glutathione e deferoxamina) não foram capazes de reverter os danos ao plasma e nem o atraso no tempo de coagulação (dados não apresentados).

Conclusões

Os resultados aqui apresentados sugerem que o GA colabora no desenvolvimento de características pró-coagulantes. Os mecanismos de ação apresentados aqui sugerem que ele tem uma ação anti-fibrinolítica, devido a modificações pós-traducionais do fibrinogênio, e uma ação pró-coagulante quando presente na circulação, devido a sua ação sobre células do sistema vascular.

Perspectivas

Apesar de os dados aqui apresentados sugerirem um potencial pró-trombótico do GA, é importante lembrar que o modelo experimental utilizado no estudo *in vivo* recebeu uma única administração do GA. A manutenção da concentração plasmática não pode ser mantida por muito tempo dessa forma, já que o GA é uma molécula altamente reativa. Estudar os efeitos do GA em um modelo em que sua concentração plasmática pudesse ser mantida elevada de forma crônica é interessante e forneceria dados mais precisos sobre a ação desse aldeído sobre a coagulação.

O GA parece estar diretamente envolvido com a geração de placas ateroscleróticas, já que foram encontrados modificações protéicas causadas

especificamente por esse aldeído (NAGAI *et al.*, 2002). Assim, a avaliação de formação dessas placas em animais injetados com GA também é interessante, assim como é a possibilidade da intervenção com medicamentos anti-AGE na tentativa de reverter as disfunções hemostáticas e uma eventual geração de placa aterosclerótica.

Por último, como não foi possível avaliar o papel do GA no restante do sistema vascular, fica a perspectiva de se fazer essa avaliação. A medição de algumas moléculas no plasma (como endotelina e Fator Tecidual) poderiam indicar dano ao endotélio. A ativação plaquetária poderia ser avaliada pela medição de fosfatidilserina ou P-selectina na membrana.

Assim, conhecendo-se melhor o mecanismo pelo qual o GA é capaz de proporcionar os efeitos danosos, aumenta-se a possibilidade de desenho e utilização de drogas que previnam a disfunção cardiovascular comum em uma grande variedade de enfermidades.

Referências bibliográficas

- Acharya, A. S. e Manning, J. M., *Reaction of glycolaldehyde with proteins: latent crosslinking potential of alpha-hydroxyaldehydes*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **80**(12): p. 3590-3594 (1983).
- Adrover, M., Vilanova, B., Munoz, F. e Donoso, J., *Kinetic study of the reaction of glycolaldehyde with two glycation target models*. Ann N Y Acad Sci. **1126**: p. 235-40 (2008).
- Al-Enezi, K. S., Alkhalaf, M. e Benov, L. T., *Glycolaldehyde induces growth inhibition and oxidative stress in human breast cancer cells*. Free Radic Biol Med. **40**(7): p. 1144-51 (2006).
- Anderson, M. M., Hazen, S. L., Hsu, F. F. e Heinecke, J. W., *Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation*. J Clin.Invest. **99**(3): p. 424-432 (1997).
- Anderson, M. M. e Heinecke, J. W., *Production of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase: a role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation*. Diabetes. **52**(8): p. 2137-43 (2003).
- Assuncao, M. C., Santos, I. e Gigante, D. P., *Diabetes mellitus at the primary health care level in Southern Brazil: structure, course of action and outcome*. Rev Saude Publica. **35**(1): p. 88-95 (2001).
- Blomback, B., Carlsson, K., Fatah, K., Hessel, B. e Procyk, R., *Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation*. Thromb Res. **75**(5): p. 521-538 (1994).
- Bobbink, I. W., Tekelenburg, W. L., Sixma, J. J., de Boer, H. C., Banga, J. D. e de Groot, P. G., *Glycated proteins modulate tissue-plasminogen activator-catalyzed plasminogen activation*. Biochem Biophys Res Commun. **240**(3): p. 595-601 (1997).
- Carr, M. E., *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. J Diabetes Complications. **15**(1): p. 44-54 (2001).
- Corbett, J. A., Tilton, R. G., Chang, K., Hasan, K. S., Ido, Y., Wang, J. L., Sweetland, M. A., Lancaster, J. R., Jr., Williamson, J. R. e McDaniel, M. L., *Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents*

- diabetic vascular dysfunction*. Diabetes. **41**(4): p. 552-6 (1992).
- Davie, E. W. e Ratnoff, O. D., *Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting*. Science. **145**: p. 1310-2 (1964).
- Dunn, E. J., Ariens, R. A. e Grant, P. J., *The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function*. Diabetologia. **48**(6): p. 1198-206 (2005).
- Dunn, E. J., Philippou, H., Ariens, R. A. e Grant, P. J., *Molecular mechanisms involved in the resistance of fibrin to clot lysis by plasmin in subjects with type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia. **49**(5): p. 1071-80 (2006).
- Feng, C. Y., Wong, S., Dong, Q., Bruce, J., Mehta, R., Bruce, W. R. e O'Brien, P. J., *Hepatocyte inflammation model for cytotoxicity research: fructose or glycolaldehyde as a source of endogenous toxins*. Arch Physiol Biochem. **115**(2): p. 105-11 (2009).
- Flood, V. H., Al-Mondhiry, H. A. e Farrell, D. H., *The fibrinogen Aalpha R16C mutation results in fibrinolytic resistance*. Br.J Haematol. **134**(2): p. 220-226 (2006).
- Flood, V. H., Nagaswami, C., Chernysh, I. N., Al-Mondhiry, H. A., Weisel, J. W. e Farrell, D. H., *Incorporation of fibrin molecules containing fibrinopeptide A alters clot ultrastructure and decreases permeability*. Br J Haematol. **138**(1): p. 117-24 (2007).
- Gabriel, D. A., Muga, K. e Boothroyd, E. M., *The effect of fibrin structure on fibrinolysis*. J Biol Chem. **267**(34): p. 24259-63 (1992).
- Gawaz, M., Langer, H. e May, A. E., *Platelets in inflammation and atherogenesis*. The Journal of Clinical Investigation. **115**(12): p. 3378-3384 (2005).
- Gawlowski, T., Stratmann, B., Ruetter, R., Buenting, C. E., Menart, B., Weiss, J., Vlassara, H., Koschinsky, T. e Tschoepe, D., *Advanced glycation end products strongly activate platelets*. Eur J Nutr. **48**(8): p. 475-81 (2009).
- Glomb, M. A. e Monnier, V. M., *Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction*. J Biol.Chem. **270**(17): p. 10017-10026 (1995).
- Grant, P. J., *Diabetes mellitus as a prothrombotic condition*. J Intern Med. **262**(2): p. 157-72 (2007).
- Guyton, A. C. e Hall, J. E. (2005). Textbook of Medical Physiology, W.b. Saunders Company.

- Haverkate, F. e Samama, M., *Familial dysfibrinogenemia and thrombophilia. Report on a study of the SSC Subcommittee on Fibrinogen*. *Thromb Haemost.* **73**(1): p. 151-161 (1995).
- Heffron, S. P., Parastatidis, I., Cuchel, M., Wolfe, M. L., Tadesse, M. G., Mohler, E. R., 3rd, Ischiropoulos, H., Rader, D. J. e Reilly, M. P., *Inflammation induces fibrinogen nitration in experimental human endotoxemia*. *Free Radic Biol Med.* **47**(8): p. 1140-6 (2009).
- Hudson, B. I., Bucciarelli, L. G., Wendt, T., Sakaguchi, T., Lalla, E., Qu, W., Lu, Y., Lee, L., Stern, D. M., Naka, Y., Ramasamy, R., Yan, S. D., Yan, S. F., D'Agati, V. e Schmidt, A. M., *Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders*. *Arch Biochem Biophys.* **419**(1): p. 80-8 (2003).
- Ishibashia, Y., Matsuaia, T., Takeuchib, M. e Yamagishia, S., *Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of VCAM-1 mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression*. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **391**(3): p. 1405-1408 (2010).
- Jaleel, A., Halvatsiotis, P., Williamson, B., Juhasz, P., Martin, S. e Nair, K. S., *Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment*. *Diabetes Care.* **28**(3): p. 645-52 (2005).
- Kaplanski, G., Farnarier, C., Kaplanski, S., Porat, R., Shapiro, L., Bongrand, P. e Dinarello, C. A., *Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism*. *Blood.* **84**(12): p. 4242-8 (1994).
- King, H., Aubert, R. E. e Herman, W. H., *Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections*. *Diabetes Care.* **21**(9): p. 1414-31 (1998).
- Lapolla, A., Flamini, R., Dalla Vedova, A., Senesi, A., Reitano, R., Fedele, D., Basso, E., Seraglia, R. e Traldi, P., *Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method*. *Clin Chem Lab Med.* **41**(9): p. 1166-73 (2003).
- Lee, H. B. e Blaufox, M. D., *Blood volume in the rat*. *J Nucl Med.* **26**(1): p. 72-6 (1985).
- Lerant, I., Kolev, K., Gombas, J. e Machovich, R., *Modulation of plasminogen activation and plasmin activity by methylglyoxal modification of the zymogen*. *Biochim Biophys Acta.* **1480**(1-2): p. 311-20 (2000).

Lutterloh, E. C., Opal, S. M., Pittman, D. D., Keith, J. C., Jr., Tan, X. Y., Clancy, B. M., Palmer, H., Milarski, K., Sun, Y., Palardy, J. E., Parejo, N. A. e Kessimian, N., *Inhibition of the RAGE products increases survival in experimental models of severe sepsis and systemic infection*. Crit Care. **11**(6): p. R122 (2007).

Macfarlane, R. G., *An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier*. Nature. **202**: p. 498-9 (1964).

Malerbi, D. A. e Franco, L. J., *Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence*. Diabetes Care. **15**(11): p. 1509-16 (1992).

Mera, K., Nagai, M., Brock, J. W., Fujiwara, Y., Murata, T., Maruyama, T., Baynes, J. W., Otagiri, M. e Nagai, R., *Glutaraldehyde is an effective cross-linker for production of antibodies against advanced glycation end-products*. J Immunol Methods. **334**(1-2): p. 82-90 (2008).

Mera, K., Takeo, K., Izumi, M., Maruyama, T., Nagai, R. e Otagiri, M., *Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin*. J Pharm Sci, (2009).

Min, C., Kang, E., Yu, S. H., Shinn, S. H. e Kim, Y. S., *Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells*. Diabetes Res Clin Pract. **46**(3): p. 197-202 (1999).

Miyazawa, N., Abe, M., Souma, T., Tanemoto, M., Abe, T., Nakayama, M. e Ito, S., *Methylglyoxal augments intracellular oxidative stress in human aortic endothelial cells*. Free Radic Res. **44**(1): p. 101-7 (2010).

Mosesson, M. W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. J Thromb Haemost. **3**(8): p. 1894-1904 (2005).

Nagai, R., Fujiwara, Y., Mera, K., Motomura, K., Iwao, Y., Tsurushima, K., Nagai, M., Takeo, K., Yoshitomi, M., Otagiri, M. e Ikeda, T., *Usefulness of antibodies for evaluating the biological significance of AGEs*. Ann N Y Acad Sci. **1126**: p. 38-41 (2008).

Nagai, R., Hayashi, C. M., Xia, L., Takeya, M. e Horiuchi, S., *Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins*. J Biol Chem. **277**(50): p. 48905-12 (2002).

Nieuwdorp, M., van Haefen, T. W., Gouverneur, M. C., Mooij, H. L., van Lieshout, M. H., Levi, M., Meijers, J. C., Holleman, F., Hoekstra, J. B., Vink, H., Kastelein, J. J. e Stoes, E. S., *Loss of endothelial glycocalyx*

during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes*. **55**(2): p. 480-6 (2006).

Nowak, P., Zbikowska, H. M., Ponczek, M., Kolodziejczyk, J. e Wachowicz, B., *Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences*. *Thromb Res*. **121**(2): p. 163-74 (2007).

Park, L., Raman, K. G., Lee, K. J., Lu, Y., Ferran, L. J., Jr., Chow, W. S., Stern, D. e Schmidt, A. M., *Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts*. *Nat Med*. **4**(9): p. 1025-31 (1998).

Pedchenko, V. K., Chetyrkin, S. V., Chuang, P., Ham, A. J., Saleem, M. A., Mathieson, P. W., Hudson, B. G. e Voziyan, P. A., *Mechanism of perturbation of integrin-mediated cell-matrix interactions by reactive carbonyl compounds and its implication for pathogenesis of diabetic nephropathy*. *Diabetes*. **54**(10): p. 2952-60 (2005).

Peyroux, J. e Sternberg, M., *Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes*. *Pathol Biol (Paris)*. **54**(7): p. 405-19 (2006).

Price, D. L., Rhett, P. M., Thorpe, S. R. e Baynes, J. W., *Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors*. *J Biol Chem*. **276**(52): p. 48967-72 (2001).

Sauls, D. L., Wolberg, A. S. e Hoffman, M., *Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia*. *J Thromb Haemost*. **1**(2): p. 300-306 (2003).

Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M. e van der Poll, T., *Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis*. *J Leukoc Biol*. **83**(3): p. 536-45 (2008).

Shacter, E., Williams, J. A., Lim, M. e Levine, R. L., *Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay*. *Free Radic.Biol.Med*. **17**(5): p. 429-437 (1994).

Sharp, P. S., Rainbow, S. e Mukherjee, S., *Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects*. *Diabet Med*. **20**(7): p. 575-9 (2003).

Siebenlist, K. R., Meh, D. A. e Mosesson, M. W., *Plasma factor XIII binds specifically to fibrinogen molecules containing gamma chains*. *Biochemistry*. **35**(32): p. 10448-53 (1996).

- Stadtman, E. R. e Levine, R. L., *Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins*. Amino Acids. **25**(3-4): p. 207-18 (2003).
- Stegenga, M. E., van der Crabben, S. N., Levi, M., de Vos, A. F., Tanck, M. W., Sauerwein, H. P. e van der Poll, T., *Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans*. Diabetes. **55**(6): p. 1807-12 (2006).
- Thornalley, P. J., Langborg, A. e Minhas, H. S., *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. Biochem J. **344 Pt 1**: p. 109-16 (1999).
- Vadseth, C., Souza, J. M., Thomson, L., Seagraves, A., Nagaswami, C., Penn, M. S., Hazen, S. L., Weisel, J. W. e Ischiropoulos, H., *Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species*. J Biol.Chem. **279**(10): p. 8820-8826 (2004).
- Valencia, J. V., Weldon, S. C., Quinn, D., Kiers, G. H., DeGroot, J., TeKoppele, J. M. e Hughes, T. E., *Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics*. Anal Biochem. **324**(1): p. 68-78 (2004).
- Wang, Y., Beck, W., Deppisch, R., Marshall, S. M., Hoenich, N. A. e Thompson, M. G., *Advanced glycation end products elicit externalization of phosphatidylserine in a subpopulation of platelets via 5-HT_{2A/2C} receptors*. Am J Physiol Cell Physiol. **293**(1): p. C328-36 (2007).
- Welten, A. G., Schalkwijk, C. G., ter Wee, P. M., Meijer, S., van den Born, J. e Beelen, R. J., *Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and a proinflammatory response*. Perit Dial Int. **23**(3): p. 213-21 (2003).
- Yamawaki, H. e Hara, Y., *Glyoxal causes inflammatory injury in human vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun. **369**(4): p. 1155-9 (2008).
- Zanotto-Filho, A., Schroder, R. e Moreira, J. C., *Xanthine oxidase-dependent ROS production mediates vitamin A pro-oxidant effects in cultured Sertoli cells*. Free Radic Res. **42**(6): p. 593-601 (2008).