

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A AUTOFAGIA NO INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO EM MODELO ANIMAL

ALESSANDRA GONÇALVES MACHADO

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA
SOBRE A AUTOFAGIA NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EM MODELO
ANIMAL**

Autor: Alessandra Gonçalves Machado
Orientador: Prof. Dr. Michael Everton Andrades
Co-orientadora: Profa. Dra. Andreia Biolo

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

Porto Alegre
2018

CIP - Catalogação na Publicação

Machado, Alessandra Gonçalves
AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE
GLICAÇÃO AVANÇADA SOBRE A AUTOFAGIA NO INFARTO AGUDO
DO MIOCÁRDIO EM MODELO ANIMAL / Alessandra Gonçalves
Machado. -- 2018.
49 f.
Orientador: Michael Everton Andrades.

Coorientadora: Andréia Biolo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Produtos de Glicação Avançada. 2. Metilglioxal.
3. Autofagia. 4. Infarto Agudo do Miocárdio. I.
Andrades, Michael Everton, orient. II. Biolo,
Andréia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico esta, bem como todas as minhas conquistas à minha família, que me apoia sempre. Vocês são os melhores presentes que Deus poderia me dar.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a vida e dar-me uma família maravilhosa, amigos e força para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus amados pais, Ricardo e Andréia, pela dedicação, paciência, carinho e apoio. A vocês minha eterna gratidão.

Ao meu orientador Michael Andrades, por aceitar orientar-me mesmo conhecendo-me tão pouco, compartilhando seus conhecimentos e dando direcionamento em todas as etapas desta pesquisa, além do companheirismo e amizade.

A minha colega, amiga e confidente Juliana Rangel, pela paciência, amizade e companheirismo que foram fundamentais em todos os momentos ao longo do período de realização e conclusão deste trabalho.

À colega Graziela Pinto, por toda troca de conhecimento, amizade e risadas.

Aos alunos de iniciação científica Daniel Sturza e Mariana Breidenbach que estiveram presentes em todas as etapas do trabalho, oferecendo apoio físico e emocional, meu muito obrigado, tenho muito carinho por vocês.

Aos colegas do laboratório, que além de todo auxílio científico tornaram-se minha família em Porto Alegre, serei eternamente grata por todos os momentos.

Às entidades financiadoras deste trabalho, Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Enfim, a todos que colaboraram direta ou indiretamente para este trabalho.

*A verdade é uma: antes vale andar descalço do
que tropeçar com os sapatos dos outros.*

Mia Couto

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
RESUMO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares	13
2.2 Infarto Agudo do Miocárdio.....	14
2.3 Produtos Finais de Glicação Avançada	16
2.4 Autofagia celular	18
2.5 Autofagia e AGEs no tecido cardíaco	22
3. JUSTIFICATIVA	24
4. HIPÓTESE	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo Geral	26
5.2 Objetivos Específicos	26
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
7. REFERÊNCIAS	29
8. ARTIGO	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE – Advanced Glycation and Products

AKT – Protein Kinase B

AMPK – AMP-activated protein kinase

ATG – Autophagy Related Genes/Proteins

ATP – Adenosine triphosphate

BECN1- Beclin-1

CML – N- ϵ -(carboxymethyl)lysine

DCV – Doenças Cardiovasculares

DM – Diabetes Melito

FKBP12 – FK506-binding protein 12

GSK-3 β – Glycogen Synthase Kinase 3 β

I/R – Isquemia/Reperusão

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

IC – Insuficiência Cardíaca

IGF1 – Insulin-like growth factor 1

LAMP2 – Lysosome-associated membrane protein 2

LC3 – Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

MGO – Metilglioxal

mTOR – Mammalian Target of Rapamycin

OMS – Organização Mundial da Saúde

p62 - Ubiquitin-binding protein p62

PI3K – Phosphoinositide 3-kinase

RAGE – Receptor de AGE

SUS – Sistema Único de Saúde

ULK ½ - Unc-51 like autophagy activating kinase

VE – Ventrículo Esquerdo

RESUMO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) decorre da obstrução da artéria coronária, o que diminui ou impede a chegada de sangue ao coração. O estado hiperglicêmico é fator de risco para o IAM e contribui para formação de produtos de glicação avançada (AGEs). O IAM pode ativar o processo autofágico, um mecanismo de reciclagem celular que gera energia em situações de privação de nutrientes. Entretanto, há controvérsias quanto ao seu benefício, principalmente quando a via autofágica é estimulada na presença de AGEs. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel do metilglioxal (MGO), um agente glicante, na ativação da autofagia e suas consequências no remodelamento cardíaco. Para isso, 90 ratos *Wistar* machos foram randomizados em 4 grupos: i) Sham; ii) IAM (ambos receberam uma administração de NaCl 0,9% por 7 dias antes da cirurgia); iii) IAM + MGO (75 mg/kg/dia, por 7 dias, 2x ao dia, antes do IAM); iv) IAM + Rapamicina (8 mg/kg em 2 doses, 24 e 4 horas antes do IAM). As análises ecocardiográficas e coleta do coração foram realizadas 24 horas após a cirurgia. O tratamento com MGO aumentou atividade de mTOR, sem alterar o conteúdo total de AGEs ou as moléculas relacionadas à autofagia (p70, p62 e LC3). Os tratamentos não influenciaram a função cardíaca. Concluindo, um agente glicante (MGO) administrado antes do IAM aumenta sinalização de mTOR, porém não altera remodelamento cardíaco.

1. INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) caracteriza-se pela obstrução das artérias coronárias, fazendo com que o suprimento de nutrientes diminua ou até mesmo cesse, podendo levar à morte celular (1). A perda de tecido viável é seguida pela sobrecarga do tecido sadio e resulta no remodelamento cardíaco, um processo que envolve vias histopatológicas e inflamatórias e que pode levar ao desenvolvimento da síndrome de insuficiência cardíaca (IC), enfermidade com alta morbidade, mortalidade e com alto custo para o sistema de saúde (2).

Entre os fatores de risco para o IAM, destacam-se o diabetes e suas decorrências inflamatórias e a geração de proteínas glicadas, AGEs (do inglês, Advanced Glycation End-Products) (3). Os AGEs são formados a partir da reação de Maillard, uma reação não enzimática que leva à glicação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, processo que é facilitado pelo estado hiperglicêmico e que contribui para manutenção de moléculas altamente reativas como o metilglioxal (MGO), um potente agente glicante (4). Estas moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de IC afetando as propriedades biológicas das proteínas de matriz extracelular ou ainda podem interagir diretamente com seu receptor RAGE (Receptor de AGE), iniciando processos inflamatórios no tecido cardíaco (5, 6).

A despeito do esforço no manejo clínico e farmacológico dos indivíduos infartados, principalmente referente a tratamentos pré-hospitalares, pouco se avançou em termos de conhecimento nos últimos 10 anos (7). Por isso, esforços têm sido despendidos na compreensão das vias de sinalização envolvidas no processo de remodelamento cardíaco que ocorrem após o IAM. Um dos processos que tem sido estudado é a autofagia, que ocorre nas células e é responsável pela

reciclagem de organelas e biomoléculas danificadas e geração de energia em situações de depleção energética (8, 9). Essa é uma rota que aparenta ser benéfica ao tecido cardíaco após o IAM, apesar de haver ainda alguma controvérsia quanto ao seu benefício (10).

A compreensão do processo autofágico no cenário do IAM ainda é incipiente. Assim, novos estudos na área são necessários, visto que o processo autofágico pode vir a constituir um alvo terapêutico relevante no futuro. Da mesma forma, a geração de AGEs no pós-IAM e suas implicações para o desenvolvimento da IC também tem sido demonstrada, porém pouco se sabe sobre a sua influência no processo autofágico. Por isso, o objetivo deste trabalho é avaliar se um importante precursor de AGEs (MGO) interfere no processo autofágico no cenário do IAM, e se essa interferência tem algum impacto na função cardíaca pós-IAM.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia das doenças cardiovasculares

Estatísticas populacionais destacam as doenças cardiovasculares (DCV) como a principal causa de mortalidade no mundo (11, 12). Dados referentes a 2015, publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), revelam que aproximadamente 17,7 milhões de pessoas vieram à óbito por DCV neste ano, o que representa 31% de todas as mortes naquele ano. Dentre as DCV, 80% das mortes tiveram como principais causas o acidente vascular cerebral e o infarto agudo do miocárdio (IAM), também conhecido como ataque cardíaco. A maior parte dos eventos ocorrem em países de baixa e média renda, acometendo principalmente indivíduos com mais de 70 anos de idade (12, 13). A evolução do quadro clínico do IAM pode levar ao desenvolvimento de IC, uma síndrome complexa que também apresenta altas taxas de mortalidade e que afeta em torno de 23 milhões de pessoas adultas no mundo (14).

No Brasil, as DCV são a principal causa de morte atualmente e, apesar de estarem em processo de redução desde a década de 80, continuam sendo uma das principais causas de internações no Sistema Único de Saúde (SUS), com alta taxa de mortalidade - cerca de 27% (15, 16). Dentre as DCV no Brasil, destaca-se o IAM, com taxa de mortalidade de 7% (16, 17) e elevado custo para o sistema de saúde.

Os prejuízos relacionados com o evento isquêmico vão além do alto custo para o governo. Após o IAM, há um somatório de consequências que interferem na vida dos indivíduos, estando entre elas a perda de força de trabalho, o uso de medicações, necessidade de realizar tratamento de outras doenças decorrentes do IAM e, no pior dos cenários, o incalculável valor da vida perdida. O desafio de

reduzir as taxas aqui apresentadas foi assumido pela *American Heart Association* em 2011, que propôs metas para a redução de 20% da mortalidade por DCV até 2020 (11).

Em meio a amplitude da importância econômica e social das DCV, torna-se imprescindível pensar em estratégias e soluções que contribuam para a diminuição da ocorrência de DCV e aumento da qualidade de vida.

2.2 Infarto Agudo do Miocárdio

O IAM decorre da obstrução das artérias coronárias, promovendo uma redução do fluxo sanguíneo e diminuindo ou impedindo a chegada de nutrientes aos cardiomiócitos, podendo levar à morte celular (18). A perda de tecido viável provoca uma sobrecarga de trabalho do tecido sadio e leva à reestruturação do arcabouço cardíaco, evento que envolve morte de cardiomiócitos, proliferação de fibroblastos, deposição de matriz extracelular e dilatação ventricular (19, 20). A esse processo é dado o nome de remodelamento ventricular e, apesar de ocorrer como um mecanismo compensatório para suprir o débito cardíaco, ele está relacionado com o aumento nas taxas de mortalidade (2), uma vez que, a proporção remodelamento do ventrículo esquerdo (VE) após o IAM pode determinar mudanças cruciais na estrutura e fisiologia do coração com efeitos a longo prazo (21). Esses processos histopatológicos e inflamatórios no miocárdio iniciam poucas horas após o evento isquêmico e continuam progredindo ao longo do tempo, levando o coração à falência progressiva e à síndrome da insuficiência cardíaca (2, 21, 22). A IC caracteriza-se pela incapacidade de o coração bombear o sangue de forma a suprir as demandas cotidianas do organismo. Apesar dos avanços no manejo clínico e diagnóstico, a

mortalidade ainda é elevada, com uma expectativa de 50% de mortalidade em 5 anos (23).

A utilização de modelos experimentais tem fornecido informações importantes sobre a morfologia, bioquímica, eletrofisiologia e propriedades mecânicas do miocárdio infartado. O artigo de revisão de Cohn e colaboradores relata que modelos animais são capazes de demonstrar características de remodelamento tais como expansão do infarto, desbaste da zona infartada e regional apenas um dia após o infarto (22). Além disso, são úteis no estabelecimento de terapias experimentais, antes que possam ser transpostas para humanos.

Assim, o modelo que tem sido empregado de forma bastante disseminada na literatura científica, e que será empregado no presente projeto, é o da ligação permanente do ramo descendente da coronária esquerda (24). Essa metodologia gera uma área isquêmica no ventrículo esquerdo, que apresenta um processo inflamatório e que é posteriormente substituída por fibrose (Figura 1). É um modelo que foi extensivamente caracterizado no passado (24, 25) e que contribuiu significativamente na caracterização do captopril como droga anti-remodelamento no pós-IAM (26). É utilizado em diversos trabalhos até hoje e apresenta um perfil de remodelamento semelhante ao ocorrido em humanos, onde há morte de cardiomiócitos, processo inflamatório, necrose, deposição de colágeno e dilatação do VE (27-29).

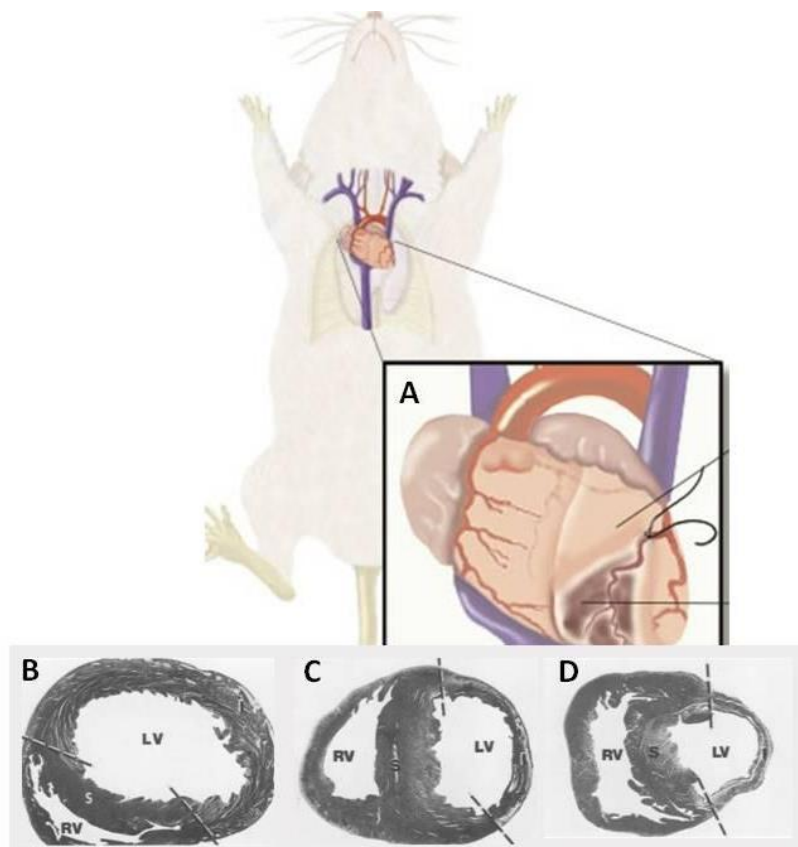


Figura 1 - Modelo esquemático do IAM induzido por ligadura da coronária descendente anterior esquerda. A figura apresenta uma visão transtorácica do coração, que é acessado pelo afastamento da 2ª e 3ª costelas esquerdas. Em (A) é possível ver a ligadura com a área de infarto. Cortes transversais de coração de rato 1 dia (B), 4 dias (C) e 21 dias (D) após o IAM. Percebe-se o afinamento das paredes na região infartada, delimitada pelas linhas tracejadas. LV – ventrículo esquerdo. RV – ventrículo direito. Adaptado de Fishbein, 1978 (24).

2.3 Produtos Finais de Glicação Avançada

Produtos finais de glicação avançada são uma classe de moléculas continuamente geradas pelos organismos saudáveis, principalmente no metabolismo energético, mas que também podem ser adquiridos na dieta, em alimentos assados ou fritos (30). A formação de AGEs dá-se a partir de uma reação não enzimática, descrita pela primeira vez em 1912 pelo bioquímico francês Louis Camille Maillard e conhecida até hoje como reação de Maillard (31). Este processo leva à formação de uma grande variedade de compostos que conferem aroma e cor aos alimentos, bem como à formação dos chamados produtos de glicação (32).

O procedimento não enzimático é caracterizado pela reação entre açúcares redutores e a extremidade N-terminal de aminoácidos ou grupo amino de proteínas e ácidos nucleicos. Inicialmente, forma-se uma base de Schiff, quimicamente reversível. Posteriormente, ocorre um rearranjo que leva à formação dos produtos de Amadori. A posterior degradação dessas estruturas, como desaminação e hidrólise, pode criar produtos secundários, os AGEs, que vão levar à formação de ligações cruzadas e modificações estruturais em moléculas (33-35).

O processo de glicação é facilitado pelo estado hiperglicêmico, que contribui para manutenção de moléculas altamente reativas como por exemplo o MGO, que é um potente agente glicante, bem como em condições pró-inflamatórias (4, 36, 37). Estas moléculas podem contribuir para o desenvolvimento de IC afetando as propriedades biológicas das proteínas de matriz extracelular ou ainda podem interagir diretamente com seu receptor RAGE, levando a mudanças miocárdicas e vasculares (5, 6, 38).

Os AGEs encontram-se elevados em indivíduos com algumas doenças, como insuficiências renais e diabetes melito (DM), sendo essa última um fator de risco para eventos isquêmicos cardíacos (39, 40). Apesar de a relação dos AGEs com as doenças renais e com o DM estar sedimentada, ainda se buscam informações que estabeleçam o papel dos AGEs no processo de desenvolvimento e evolução das doenças cardíacas. Sabe-se que os AGEs estão aumentados após o IAM e a sua concentração é preditora independente de desenvolvimento de IC (5, 41). Além disso, níveis elevados de N-ε-(carboximetil)lisina (CML) e pentosidina, dois importante AGEs na área clínica, foram associados à maior chance de hospitalização, sendo que apenas a CML, teve associação com um maior risco de

mortalidade em paciente com IC (42). Os AGEs também foram relacionados com a gravidade da IC e à incidência de eventos cardíacos e morte 1 ano após IAM (5, 43).

Em modelo animal, os AGEs foram associados à piora da função cardíaca após o evento isquêmico (44). Um estudo com camundongos demonstrou aumento nos níveis teciduais de AGEs derivados de MGO após o IAM. Interessantemente, animais com superexpressão de Glioxalase 1 (enzima responsável pela detoxificação do MGO) submetidos ao IAM tinham menor tamanho de infarto e maior fração de ejeção, reforçando a importância de agentes glicantes no processo pós IAM (45). Apesar do conhecimento sobre os efeitos dos AGEs sobre alguns desfechos cardíacos, pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual exercem a sua ação durante o evento isquêmico, bem como qual seria seu papel na ativação de outras vias envolvidas no pós IAM.

2.4 Autofagia celular

A autofagia é um processo celular fisiológico de degradação de organelas citoplasmáticas danificadas, mas que também é ativada em momentos de supressão de nutrientes, energia ou presença de toxinas e patógenos (46-48). A regulação da autofagia é bastante complexa e mais de uma rota de sinalização está envolvida no processo (49).

O processo autofágico inicia com a ativação de proteínas conhecidas como Atg (do inglês Autophagy-related genes/proteins) (Figura 2), que atuam na expansão do fagóforo através do recrutamento de lipídeos para a membrana (50). O primeiro passo é a formação do complexo Atg1/Atg13/Atg17. A proteína Atg8, mais conhecida como MAP1LC3 (do inglês, Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), é necessária para o alongamento da membrana, recrutamento da carga e

maturação do fagóforo. Entretanto, para que ela possa atuar, deve ter sua forma citosólica (LC3-I) clivada e conjugada com fosfatidiletanolamina, sendo então incorporada à membrana em formação (LC3-II). A proteína LC3 é amplamente conhecida como marcador de autofagia, uma vez que seu nível é correlacionado diretamente com o número de autofagolisossomos (51). Após formado o autofagossomo, a marcação e recrutamento de proteínas para degradação no interior do fagóforo é realizado por proteínas chamadas adaptadoras, entre as quais destaca-se a SQSTM1 (p62), outra proteína utilizada como marcador de autofagia. Finalmente, o material recrutado é degradado, conjuntamente com a p62, e o conteúdo resultante fica disponível para reciclagem, podendo gerar energia (52). A avaliação da existência do processo em um tecido ou célula deve levar em consideração a sua iniciação e terminação, processo denominado de fluxo autofágico (53, 54). Ainda assim, não raro encontram-se artigos que avaliam somente a fase inicial (por exemplo, o imuno conteúdo de LC3) ou a fase final (por exemplo, diminuição da p62), gerando dados insuficientes para determinar se a autofagia está ativada ou não (54, 55).

A mTOR (mammalian target of rapamycin) é uma proteína cinase que age como eficiente controlador da autofagia. Quando as células estão em condições normais, a mTOR pode atuar fosforilando o Atg13 e impedindo sua interação com o Atg1, desta forma inibindo o início do processo autofágico (8). Fatores de crescimento e abundância de nutrientes promovem a ativação da via PI3K/Akt, que ativa a mTOR e, com isso, a autofagia é inibida (56). De modo oposto, a privação de nutrientes ativa a AMPK (AMP-activated protein kinase) e a GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β), as quais inibem a mTOR, ativando a autofagia (57). Existem drogas que inibem a mTOR e ativam a autofagia, sendo que a mais estudada é o

antifúngico e imunossupressor rapamicina (56). A rapamicina, fármaco com ação antiproliferativa utilizado principalmente no tratamento de alguns cânceres, atua inibindo mTOR de maneira indireta, seja ligando-se ao seu receptor FKBP12 (FK506-binding protein 12) e posteriormente à mTOR, ou pela competição pelo sítio de ligação do ácido fosfatídico, um antagonista da rapamicina (58). Tratando-se de estudos experimentais, a literatura é divergente quanto às doses utilizadas. São encontrados trabalhos com as mais diversas concentrações, as doses variam de 1 mg/kg a 8 mg/kg em pesquisas utilizando ratos (59, 60) e de 2 mg/kg a 10 mg/kg em camundongos (61-66). Tal divergência conduz à realização de projetos pilotos para definição de doses efetivas em cada modelo experimental, minimizando assim o uso indevido de animais.

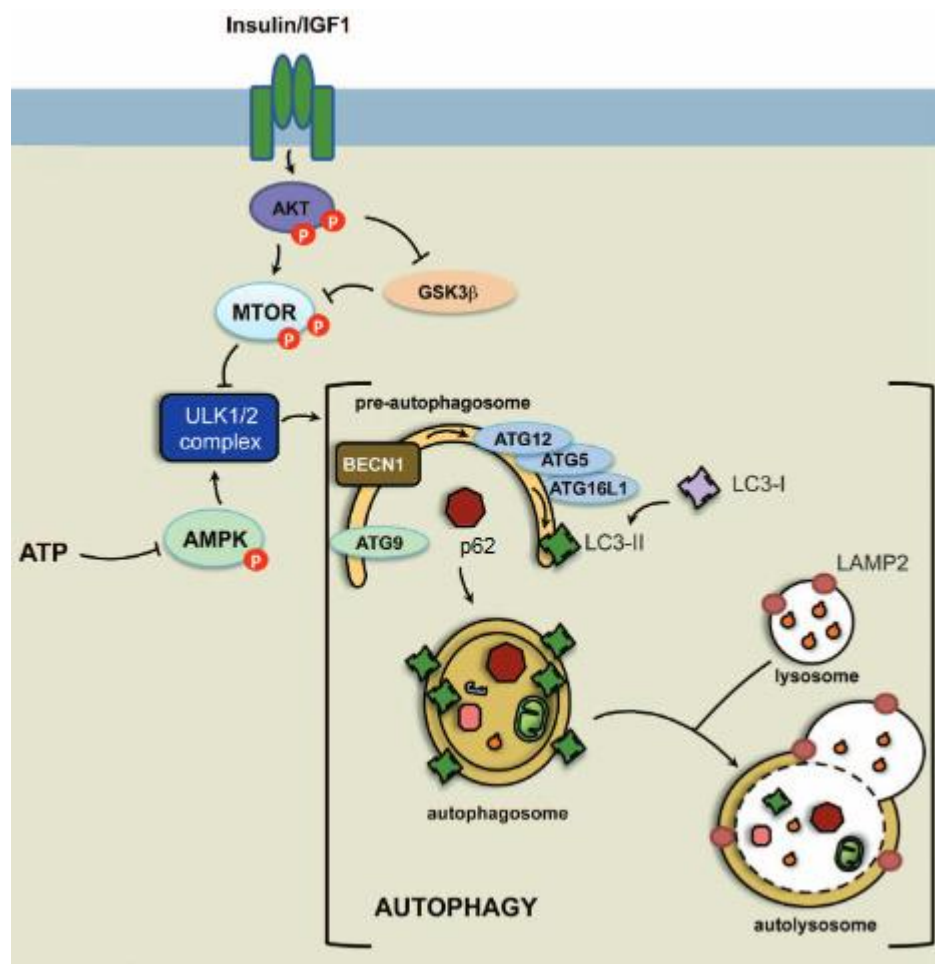


Figura 2 – Principais reguladores do processo autofágico. Esquema simplificado das principais vias celulares que coordenam respostas autofágicas nos cardiomiócitos. As setas denotam estimulação, e os indicadores em forma de T indicam a inibição. Adaptado de Lavandero, 2013 (67).

Em níveis basais, a autofagia atua na manutenção da função e sobrevivência dos cardiomiócitos (68, 69). Porém, no curso de uma enfermidade cardíaca, a ativação desse processo torna-se complexo (70-72). Em muitos cenários, a autofagia é ativada de forma compensatória para frear os estímulos deletérios. Porém, a ativação sustentada ou exacerbada pode repercutir de forma negativa para o funcionamento organismo (68, 70). Portanto, o papel cardioprotetor ou cardiodegenerativo da autofagia vai ser definido pelo ambiente co-sinalizador presente em cada momento.

A ativação farmacológica da autofagia promove cardioproteção em modelos animais de IAM e de isquemia/reperfusão (I/R), limitando o tamanho de infarto, atenuando o remodelamento do VE e diminuindo o processo apoptótico (73-75). No mesmo sentido, a inibição da autofagia concomitante à privação de nutrientes provoca aumento na mortalidade de miócitos cardíacos *in vitro* (76) e aumenta a área de infarto em modelo animal de IAM (73). A inibição da autofagia pode levar ao acúmulo de autofagossomos, contribuindo para a geração de espécies reativas de oxigênio, permeabilização mitocondrial morte de cardiomiócitos (77). Entretanto, outros estudos contrariam esses achados. Ayoagi e col. induziram I/R em camundongos que superexpressavam mTOR e estes animais apresentaram melhora na função cardíaca, menor mortalidade e inflamação em relação ao grupo controle após 28 dias (78). Já Lassaletta e col. detectaram uma perda da função cardíaca em suínos administrados com rapamicina antes da realização da I/R (79). Portanto, apesar do avanço na compreensão desse processo, o mecanismo de ação da autofagia no cenário do IAM ainda não está completamente elucidado, ainda se

encontra com um papel dualístico quanto ao seu benefício ou malefício nesse contexto.

2.5 Autofagia e AGEs no tecido cardíaco

A literatura atual é limitada em relação a trabalhos que relacionam os AGEs e autofagia. Não obstante, resultados sugerem RAGE ativa autofagia tanto inibindo a mTOR como ativando PI3K (phosphoinositide 3-Kinase) classe III em células tumorais (80). Também já se sabe que a AMPK ativa autofagia inibindo mTOR (57) e que, além disso, essa ativação pode ser pela via RAGE, demonstrando outra relação entre a ativação da autofagia e os AGEs (60).

A busca por artigos que abordem a relação entre autofagia, AGEs e doenças cardiovasculares se encontra ainda mais escassa. Trabalhos *in vitro* com cardiomiócitos demonstram que os AGEs ativam autofagia através do receptor RAGE, inibindo a via da PI3K/Akt/mTOR (81), aumentando LC3-II e autofagossomos, e reduzindo a proteína p62 (82). Contudo, nestes experimentos foi demonstrada uma piora na viabilidade celular com o uso dessas moléculas glicadas (81, 82), sendo questionado o benefício da ativação da autofagia por meio destes compostos no tecido cardíaco. Cardiomiócitos quando tratados com AGE e RAGE parecem induzir a via autofágica através do aumento de espécies reativas de oxigênio (83). Em contrapartida, camundongos nocautes para RAGE também apresentaram aumento da atividade autofágica, com menor disfunção mitocondrial e melhora da função cardíaca (84). Desta forma, torna-se indispensável a realização de trabalhos que relacionem os AGEs com a ativação da autofagia e seu papel no controle da homeostase do coração.

3. JUSTIFICATIVA

A compreensão da ativação da autofagia no cenário do IAM e suas consequências sobre o remodelamento ainda é inconclusiva, e os estudos realizados até o momento apontam para direções opostas. Da mesma forma, a ação dos AGEs como moléculas ativadoras ou inibidoras da autofagia apresenta discordâncias na literatura. Visto que o processo autofágico pode vir a constituir um alvo terapêutico na cardiologia, é essencial que esse mecanismo seja mais explorado, considerando os fatores coestimulatórios presentes na doença. Assim, este estudo justifica-se por trazer informações sobre a relação entre a glicação, presente em comorbidades que atribuem risco ao IAM, e o processo autofágico.

4. HIPÓTESE

Os AGEs influenciam o processo de autofagia após o IAM.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar se os produtos finais de glicação avançada ativam autofagia no infarto agudo do miocárdio e se essa ativação tem algum impacto na função cardíaca pós-IAM.

5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se o uso da rapamicina ativa autofagia e melhora função cardíaca.
- Avaliar o impacto dos AGEs na autofagia e na função cardíaca.
- Elucidar as rotas de sinalização envolvida na interconexão das vias do AGE e autofágica.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As DCV representam uma das grandes preocupações na área da saúde, visto que têm grande importância econômica e social, tendo grande destaque o IAM. Frequentemente são desenvolvidos estudos que buscam compreender as vias relacionadas ao IAM e suas consequências, visando desenvolver potenciais terapêuticos futuros. Neste sentido, trabalhos experimentais são de extrema importância, pois elucidam pontos chave que fundamentam estudos com humanos.

Recentes pesquisas têm demonstrado alguma associação entre AGEs e uma piora do funcionamento cardíaco. O processo autofágico também parece estar associado a mudanças funcionais cardíacas, entretanto não há certeza perante o seu papel, que inicialmente parece ser benéfico, porém, quando exacerbado pode acabar sendo prejudicial. A hipótese deste trabalho era de que os AGEs poderiam atuar positivamente sobre a autofagia, exacerbando o processo, contribuindo para um efeito maléfico no remodelamento cardíaco após o IAM. Para isso, tratamos os animais com um indutor de AGEs (MGO) e também com o conhecido ativador de autofagia, a rapamicina.

Os nossos resultados demonstraram que o MGO foi capaz de aumentar a atividade de mTOR, uma conexão entre as vias AGE e autofágica até então não demonstrada na literatura. Curiosamente, o MGO não causou modificações na LC3 ou p62 quando analisados 24 horas após IAM. Apesar do aumento na atividade da mTOR, medido através do alvo de mTOR (p70), nenhum impacto sobre o remodelamento pode ser visto 24 horas após o IAM. O mesmo resultado foi visto com o uso da rapamicina, conhecida pelo seu efeito cardioprotetor. É possível que devido ao tempo de avaliação escolhido, diferenças morfológicas não puderam ser

observadas. Assim, torna-se indispensável a realização de mais estudos para elucidar a relação entre AGEs e autofagia no contexto do IAM.

7. REFERÊNCIAS

1. Pesaro AE, Serrano CV, Jr., Nicolau JC. [Acute myocardial infarction -- acute coronary syndrome with ST-segment elevation]. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2004 Apr-Jun;50(2):214-20.
2. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):356-67.
3. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.
4. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001 Feb;44(2):129-46.
5. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007 Dec;9(12):1146-55.
6. Nevieri R, Yu Y, Wang L, Tessier F, Boulanger E. Implication of advanced glycation end products (Ages) and their receptor (Rage) on myocardial contractile and mitochondrial functions. *Glycoconj J*. 2016 Aug;33(4):607-17.
7. Piegas L, Timerman A, Feitosa G, Nicolau J, Mattos L, Andrade M, et al. V Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento St. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2015;105.
8. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May;221(1):3-12.
9. Wang F, Jia J, Rodrigues B. Autophagy, Metabolic Disease, and Pathogenesis of Heart Dysfunction. *Can J Cardiol*. 2017 Jul;33(7):850-9.
10. Lavandro S, Chiong M, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest*. 2015 Jan;125(1):55-64.
11. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2016 Jan 26;133(4):e38-360.
12. Organization WH. Hearts: technical package for cardiovascular disease management in primary health care. World Health Organization. 2016;105.
13. Organization WH. Cardiovascular diseases (CVDs). 2017 [cited 2017]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
14. Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Jan;8(1):30-41.
15. Mansur AdP, Favarato D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2011;99(2):7.
16. DATASUS. Estatísticas Vitais. 2014; Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205&id=6937>.
17. Mansur AdP, Favarato D, Fátima Md, Souza Md, Avakian SD, Aldrighi JM, et al. Trends in Death from Circulatory Diseases in Brazil Between 1979 and 1996. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2001;76:7.
18. Richardson WJ, Clarke SA, Quinn TA, Holmes JW. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Compr Physiol*. 2015 Sep 20;5(4):1877-909.
19. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev*. 2011 Jan;16(1):13-21.
20. Nishida K, Kyo S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ*. 2009 Jan;16(1):31-8.
21. Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*. 2017 May;112(3):33.

22. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):569-82.
23. Chen-Scarabelli C, Saravolatz L, Hirsh B, Agrawal P, Scarabelli TM. Dilemmas in end-stage heart failure. *J Geriatr Cardiol*. 2015 Jan;12(1):57-65.
24. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*. 1978 Jan;90(1):57-70.
25. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12.
26. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res*. 1985 Jul;57(1):84-95.
27. Wang J, Bo H, Meng X, Wu Y, Bao Y, Li Y. A simple and fast experimental model of myocardial infarction in the mouse. *Tex Heart Inst J*. 2006;33(3):290-3.
28. Wu Y, Yin X, Wijaya C, Huang MH, McConnell BK. Acute myocardial infarction in rats. *J Vis Exp*. 2011 Feb 16(48).
29. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:497841.
30. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15596-601.
31. Finot PA. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:1-8.
32. Barbosa JHP, Souza IT, Santana AEG, Goulart MOF. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos. *Química Nova*. 2016;39:13.
33. John WG, Lamb EJ. The Maillard or browning reaction in diabetes. *Eye (Lond)*. 1993;7 (Pt 2):230-7.
34. Wautier JL, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res*. 2004 Aug 6;95(3):233-8.
35. Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. 2005 Jul;15(7):16R-28R.
36. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(1):103-13.
37. Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, et al. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Sep;41(9):1166-73.
38. Hegab Z, Gibbons S, Neyses L, Mamas MA. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiol*. 2012 Apr 26;4(4):90-102.
39. Meerwaldt R, Hartog JW, Graaff R, Huisman RJ, Links TP, den Hollander NC, et al. Skin autofluorescence, a measure of cumulative metabolic stress and advanced glycation end products, predicts mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Dec;16(12):3687-93.
40. Vouillarmet J, Maucort-Boulch D, Michon P, Thivolet C. Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence: a new marker of diabetic foot ulceration. *Diabetes Technol Ther*. 2013 Jul;15(7):601-5.
41. Raposeiras-Roubin S, Rodino-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Grigorian-Shamagian L, Garcia-Acuna JM, Aguiar-Souto P, et al. Predictive value of advanced glycation end products for the development of post-infarction heart failure: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol*. 2012 Aug 21;11:102.

42. Willemsen S, Hartog JW, van Veldhuisen DJ, van der Meer P, Roze JF, Jaarsma T, et al. The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *Am Heart J.* 2012 Nov;164(5):742-9 e3.
43. Mulder DJ, van Haelst PL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, Smit AJ. Skin autofluorescence is elevated in acute myocardial infarction and is associated with the one-year incidence of major adverse cardiac events. *Neth Heart J.* 2009 Apr;17(4):162-8.
44. Cao W, Chen J, Chen Y, Chen X, Liu P. Advanced glycation end products promote heart failure through inducing the immune maturation of dendritic cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014 Apr;172(8):4062-77.
45. Blackburn NJR, Vulesevic B, McNeill B, Cimenci CE, Ahmadi A, Gonzalez-Gomez M, et al. Methylglyoxal-derived advanced glycation end products contribute to negative cardiac remodeling and dysfunction post-myocardial infarction. *Basic Res Cardiol.* 2017 Sep 1;112(5):57.
46. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 2000 Dec 1;290(5497):1717-21.
47. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr;1793(4):664-73.
48. Mei Y, Thompson MD, Cohen RA, Tong X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Feb;1852(2):243-51.
49. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728-41.
50. Gatica D, Chiong M, Lavandero S, Klionsky DJ. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2015 Jan 30;116(3):456-67.
51. Lee YK, Lee JA. Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. *BMB Rep.* 2016 Aug;49(8):424-30.
52. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol.* 2009;452:181-97.
53. Zhang XJ, Chen S, Huang KX, Le WD. Why should autophagic flux be assessed? *Acta Pharmacol Sin.* 2013 May;34(5):595-9.
54. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.
55. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010 Feb 5;140(3):313-26.
56. Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin.* 2005 Dec;26(12):1421-34.
57. Hardie DG. AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. *Mol Cell.* 2008 May 9;30(3):263-5.
58. Mukhopadhyay S, Frias MA, Chatterjee A, Yellen P, Foster DA. The Enigma of Rapamycin Dosage. *Mol Cancer Ther.* 2016 Mar;15(3):347-53.
59. Larsen JL, Bennett RG, Burkman T, Ramirez AL, Yamamoto S, Gulizia J, et al. Tacrolimus and sirolimus cause insulin resistance in normal sprague dawley rats. *Transplantation.* 2006 Aug 27;82(4):466-70.
60. Xie K, Jin B, Li Y, Luo X, Zhu J, Ma D, et al. Modulating autophagy improves cardiac function in a rat model of early-stage dilated cardiomyopathy. *Cardiology.* 2013;125(1):60-8.
61. Zhou Z, Wu S, Li X, Xue Z, Tong J. Rapamycin induces autophagy and exacerbates metabolism associated complications in a mouse model of type 1 diabetes. *Indian J Exp Biol.* 2010 Jan;48(1):31-8.
62. Malagelada C, Jin ZH, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Greene LA. Rapamycin protects against neuron death in in vitro and in vivo models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010 Jan 20;30(3):1166-75.

63. Auricchio N, Malinowska I, Shaw R, Manning BD, Kwiatkowski DJ. Therapeutic trial of metformin and bortezomib in a mouse model of tuberous sclerosis complex (TSC). *PLoS One*. 2012;7(2):e31900.
64. Di R, Wu X, Chang Z, Zhao X, Feng Q, Lu S, et al. S6K inhibition renders cardiac protection against myocardial infarction through PDK1 phosphorylation of Akt. *Biochem J*. 2012 Jan 1;441(1):199-207.
65. Lu XT, Liu XQ, Wang B, Sun YY, Yang RX, Xing YF, et al. The Role of Psychological Stress on Heart Autophagy in Mice With Heart Failure. *Psychosom Med*. 2017 Nov/Dec;79(9):1036-44.
66. Zhang Y, He X, Wu X, Lei M, Wei Z, Zhang X, et al. Rapamycin upregulates glutamate transporter and IL-6 expression in astrocytes in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*. 2017 Feb 9;8(2):e2611.
67. Lavandro S, Troncoso R, Rothermel BA, Martinet W, Sadoshima J, Hill JA. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy*. 2013 Oct;9(10):1455-66.
68. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007 May;13(5):619-24.
69. Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*. 2010 Jul;6(5):600-6.
70. Sciarretta S, Yee D, Shenoy V, Nagarajan N, Sadoshima J. The importance of autophagy in cardioprotection. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2014 Mar;21(1):21-8.
71. Nishida K, Otsu K. Autophagy during cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Jun;95:11-8.
72. Foglio E, Puddighinu G, Germani A, Russo MA, Limana F. HMGB1 Inhibits Apoptosis Following MI and Induces Autophagy via mTORC1 Inhibition. *J Cell Physiol*. 2017 May;232(5):1135-43.
73. Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, et al. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. 2011 Jul 15;91(2):330-9.
74. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Weiss CS, et al. Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 15;54(25):2435-46.
75. Chen HH, Mekkaoui C, Cho H, Ngoy S, Marinelli B, Waterman P, et al. Fluorescence tomography of rapamycin-induced autophagy and cardioprotection in vivo. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2013 May 1;6(3):441-7.
76. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res*. 2007 Mar 30;100(6):914-22.
77. Ma X, Liu H, Foyil SR, Godar RJ, Weinheimer CJ, Hill JA, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2012 Jun 26;125(25):3170-81.
78. Aoyagi T, Kusakari Y, Xiao CY, Inouye BT, Takahashi M, Scherrer-Crosbie M, et al. Cardiac mTOR protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jul;303(1):H75-85.
79. Lassaletta AD, Elmadhun NY, Zanetti AV, Feng J, Anduaga J, Gohh RY, et al. Rapamycin treatment of healthy pigs subjected to acute myocardial ischemia-reperfusion injury attenuates cardiac functions and increases myocardial necrosis. *Ann Thorac Surg*. 2014 Mar;97(3):901-7.
80. Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ*. 2010 Apr;17(4):666-76.

81. Hou X, Hu Z, Xu H, Xu J, Zhang S, Zhong Y, et al. Advanced glycation endproducts trigger autophagy in cardiomyocyte via RAGE/PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cardiovasc Diabetol.* 2014 Apr 14;13:78.
82. Hu P, Zhou H, Lu M, Dou L, Bo G, Wu J, et al. Autophagy Plays a Protective Role in Advanced Glycation End Product-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(2):697-706.
83. Zha Z, Wang J, Li S, Guo Y. Pitavastatin attenuates AGEs-induced mitophagy via inhibition of ROS generation in the mitochondria of cardiomyocytes. *J Biomed Res.* 2017 Nov 1.
84. Yu Y, Wang L, Delguste F, Durand A, Guilbaud A, Rousselin C, et al. Advanced glycation end products receptor RAGE controls myocardial dysfunction and oxidative stress in high-fat fed mice by sustaining mitochondrial dynamics and autophagy-lysosome pathway. *Free Radic Biol Med.* 2017 Nov;112:397-410.

8. ARTIGO

Methylglyoxal increases mTOR activity without altering autophagy in animal model of acute myocardial infarction

Alessandra Gonçalves Machado^{1,2}, Bianca de Moraes Fracasso^{1,2}, Juliana Oliveira Rangel^{1,2}, Graziela Hunning Pinto^{1,2}, Niara da Silva Medeiros^{1,2}, Mariana Breidenbach^{1,3}, Daniel Lucas Sturza Caetano^{1,3}, Andreia Biolo^{1,2}, Michael Andrades^{1,2}.

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

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

3 – Student graduate in Biomedicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Michael Andrades

Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350,

Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

E-mail: meandrades@hcpa.edu.br

Abstract

The hyperglycemic state is a risk factor for AMI and contributes to the formation of advanced glycation products (AGEs). AMI can activate autophagy, a mechanism of cellular recycling that generates energy in situations of nutrient deprivation. However, the benefit of autophagy when stimulated in the presence of AGEs is still not clear. Therefore, the objective of this study was to evaluate the role of methylglyoxal (MGO) in the activation of autophagy and its consequences in cardiac remodeling. To this, we performed an experimental study where 90 male Wistar rats were randomized into Sham, AMI, and AMI pretreated with either MGO (75 mg/kg/day, twice a day) or rapamycin (8 mg/kg). Analyses were performed 24 hours after the surgery. Treatment with MGO increased mTOR activity in 9-fold ($p=0.02$) without altering molecules related to autophagy (LC3II/I ratio and p62). MGO treated rats did not present increase in AGEs accumulation in the heart tissue or impairment in ejection fraction, fractional shortening and chamber remodeling assessed 24 hours after the AMI. Rapamycin also did not prevent heart remodeling. In conclusion, a glycating agent (MGO) given before AMI increases mTOR signaling, but does not alter cardiac remodeling.

Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) occurs due to the obstruction of the coronary arteries, promoting reduction in blood flow and cell death (1). Tissue inflammation and biochemical signals continue to progress after the ischemic event, leading to overload of viable tissue and remodeling of the left ventricle (LV), which progressively leads to heart failure syndrome (HF) (2-6).

Advanced Glycation End-Products (AGEs) are a class of molecules continuously generated by healthy organisms or acquired in the diet (7). Moreover, pro-inflammatory conditions may stimulate the production of AGEs (8-10) and their precursors, such as methylglyoxal (MGO) (11). Recently, it was demonstrated that glyoxalase-1 overexpressing mice presented decreased heart scar area and improved ejection fraction after an AMI event (11). AGEs have been described as trigger to oxidative stress, inflammation, autophagy, and cell death through the direct modification of proteins or binding to their cell membrane receptors (RAGE). It is known that AGEs are increased after AMI and their concentration is an independent predictor of HF development (12, 13). N- ϵ -(carboxymethyl)lysine (CML) and pentosidine, two of the most studied AGEs in clinical setting, were associated with hospitalization and mortality (14).

Autophagy is a physiological cellular process of degradation of damaged cytoplasmic organelles, necessary to the normal functioning of the cell (15, 16). It also can be activated during nutrient suppression or energy need (17-19). This process is also central during disease and can be either beneficial or harmful, depending on the environmental stimuli present (5, 20, 21). A molecule known to control the autophagic process is mTOR (mammalian target of rapamycin), a kinase protein which acts by inhibiting the onset of the autophagic process under normal conditions (22). When activated, this molecule phosphorylates the p70S6K (Ribosomal protein S6 kinase beta-1), with consequent activation of cell growth pathways (23). Induction of autophagy can be accomplished through the use of rapamycin, an effective mTOR inhibitor (24).

The relationship between AGEs and autophagy is poorly described in the literature. Results suggest that the RAGE activates autophagy both by inhibiting

mTOR and by activating PI3K class III in tumor cells (25). In addition, this activation may be directly via RAGE, demonstrating another relationship between the activation of autophagy and AGEs (26). In contrast, an in vivo study with knockout mice for RAGE demonstrated an improvement on cardiac function with increased autophagic activity (27). The role of AGEs in the activation of autophagy in the AMI context remains unclear. Thus, the objective of this study is to evaluate whether the AGE-inducing molecule MGO activates autophagy in acute myocardial infarction and whether this activation has any impact on cardiac function.

Methods

Animal model and experimental design

Male Wistar rats (12 weeks of age) were randomized in four groups: Sham + NaCl 0.9% i.p. for 7 days before AMI surgery (n = 21), AMI + NaCl 0.9% i.p. for 7 days before AMI surgery (n = 22), AMI treated with methylglyoxal (MGO) (75 mg/kg/day; i.p. divided in two doses per day) seven days before AMI surgery (n = 27) and AMI treated with rapamycin (8 mg/kg; i.p.) 24 and 4 hours before AMI surgery (n = 20). The doses were defined based on a pilot study. AMI groups were subjected to a left anterior descending coronary artery ligation to induce AMI (28, 29). Briefly, the rats were anesthetized using ketamine (100 mg/kg; i.p.) and xylazine (10 mg/kg; i.p.), placed on mechanical ventilation set at 66 RPM, 2.46 mL (Harvard Model 683), and underwent left lateral thoracotomy between the third and the fourth intercostal space. Prior to thoracotomy, bupivacaine was applied (1 mg/kg; i.m.) in the infiltration of the nervous branch (caudal ribs), two ribs before and two after the incision site. After, the left atrium was pushed aside and the left coronary artery was ligated with 6.0 mononylon thread between the exit point of the pulmonary artery and left atrium.

Next, the muscle layers and skin incision were sutured with 5.0 mononylon thread sutures. Sham operated animals underwent the same procedure, except that the arterial ligation was omitted. All animals receive post-operative analgesia with tramadol (5 mg/kg, i.p.), every 6 hours for 24 hours. The rats were housed at constant room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity (40-60%), and light cycle (12:12 h light-dark), with free access to standard food and tap water, for 9 days.

All protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre under protocol number 14-0711. The present study was conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This manuscript was prepared according to the ARRIVE guideline (30).

Echocardiography

Left ventricular function and infarct size were evaluated by echocardiography 24 hours after surgery (HD7 Philips Systems) with a 12-3 MHz linear transducer. Briefly, rats were anesthetized with isoflurane (3%, 0.5 L of O_2/min), had their chest shaved and were placed on a warm blanket. Echocardiography was blinded, being conducted by researcher who was not involved in the surgical procedure.

The infarct size (% AMI) was assessed by measuring the length of the akinetic and/or hypokinetic portion (AHP) of the ventricular walls and expressed as a percentage of the total perimeter of the endocardial contour (EP) in three transverse sections of LV (edges of the mitral valve, papillary muscles, and of apical region), using the formula: $\% \text{MI} = (\text{AHP}/\text{EP}) \times 100$ (31). Ejection fraction (EF) was calculated by the formula: $\text{EF} = (\text{LV End Diastolic Diameter}^3 - \text{LV End Systolic Diameter}^3 / \text{LV End Diastolic Diameter}^3) \times 100$, determined in the M-mode (31).

Tissue collection

After 24 hours from the surgery, the rats were killed by isoflurane overdose and the heart was collected. The heart was quickly washed in a cooled 0.9% NaCl solution and gently blotted against a clean paper. The heart was weighed and divided into 3 areas: infarcted, peri-infarct, and remote, that were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C freezer.

Western blot analysis

The samples were weighed and, to each 100 mg of tissue, 900 µL of homogenization buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 1% Triton X-100 octoxynol, 1 mM PMSF, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 1 tablet of SigmaFast protease inhibitor cocktail for every 100 mL of buffer) was added, homogenized, and immediately centrifuged (1000×g). The supernatant was collected and the protein concentration was assessed by the Bradford method (32). Samples were diluted in 0.1 M Tris, 6.8 pH, to achieve final protein concentrations of 3 µg/µL in Laemmli buffer (250 mM Tris, 8% SDS, 40% glycerol, 0.008% bromophenol blue, 6.8 pH, 20% β-mercaptoethanol). Samples were heated to 70°C for 10 min, loaded (10 µL) on polyacrylamide gel (SDS-PAGE, 16% for LC3 and 12% for other targets), and transferred to PVDF membrane (#IPVH000010, Merk-Millipore). Coomassie Blue staining was performed and recorded in an imager (LAS500, Healthcare GE Life Sciences). After washing with TTBS, membranes were blocked with skimmed milk for 1 hour at room temperature. After, the membranes were incubated with specific primary antibody (anti-LC3B #2775S, Abcam; anti-SQTM1/p62 #5114S, Abcam; anti-p70S6K #2708S, Abcam; anti-phospho p70S6K #9205S, Abcam; anti-AGE #AB9890,

Millipore) at a dilution of 1:3,000 for anti-AGE and 1:1,000 for other antibodies in TTBS and in 5% skimmed milk, and under constant agitation overnight at 4°C. Then, membranes were washed 4 times with TTBS and incubated with secondary antibody donkey 1:5,000 (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) for AGE and rabbit 1:10,000 (#7074S, Cell Signaling Biotechnology) for other antibodies for 2 hours at room temperature and washed again after incubation. Light was developed on the bands using the Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation) and recorded in ImageQuant Imager LAS500 (Healthcare GE Life Sciences). Quantified was performed with imageJ analysis software.

Data analysis and statistics

Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics 21 for Windows (IBM Corporation). Variables normality was assessed using Shapiro-Wilk test. To compare groups at the end of follow-up Kruskal-Wallis followed by Dunn test was used. To evaluate mortality Fisher's exact test was used. Differences were considered significant if p value <0.05.

Results

MGO induced mTOR activation after AMI

Evaluation of p70S6K protein phosphorylation, molecule known to be downstream to mTOR, was performed. AMI promoted a non-significant 3-fold increase in mTOR activation 24 hours after the surgery in peri-infarct area (p=0.11) (Fig. 1a). MGO treatment prior the AMI surgery induced a 9-fold mTOR activation (p=0.02) in the peri-infarct area (Fig. 1a) but no increase could be seen in infarcted

myocardium (Fig. 1b). As a methodological control, we tested mTOR activation in hearts from animals treated with rapamycin, a known inhibitor of mTOR. As expected, rapamycin-treated animals presented a decreased phosphorylation of p70S6K in both areas ($p=0.02$).

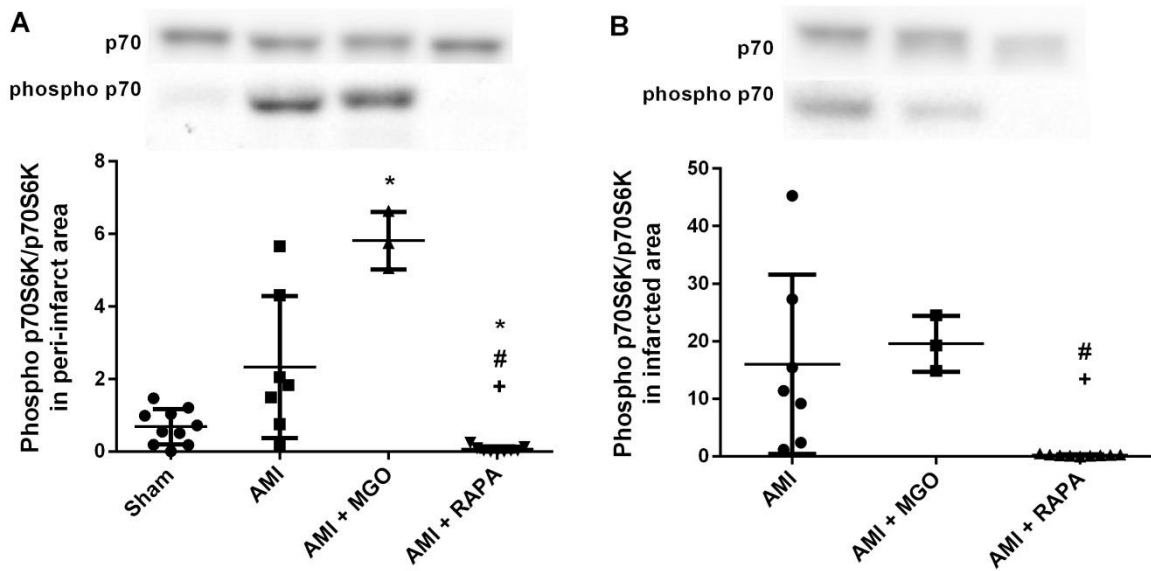


Figure 1. Evaluation for mTOR activity. Phospho p70S6K/p70S6K in cardiac tissue from peri-infarct area (a) and infarcted area (b). Molecular weight of p70SK and phospho p70S6K (70 kDa). Kruskal-Wallis with Dunn test, $p<0.05$. Data are expressed as median and interquartile range (IQR). * difference with Sham. # difference with AMI. + difference with AMI + MGO. AMI (acute myocardial infarction), MGO (methylglyoxal), RAPA (rapamycin).

MGO did not trigger autophagic process in AMI rats

LC3-II is an usual marker of the autophagy onset, whereas p62 fading is a marker of autophagy completion (22). Here we show that AMI did not trigger autophagy in heart tissue, nor did MGO (Fig. 2). In the same way, either AMI or AMI + MGO did not promote autophagy completion (Fig. 2d-f). Curiously, animals treated with rapamycin, a known trigger of autophagy, did not present increase in LC3-II or decrease in p62 levels.

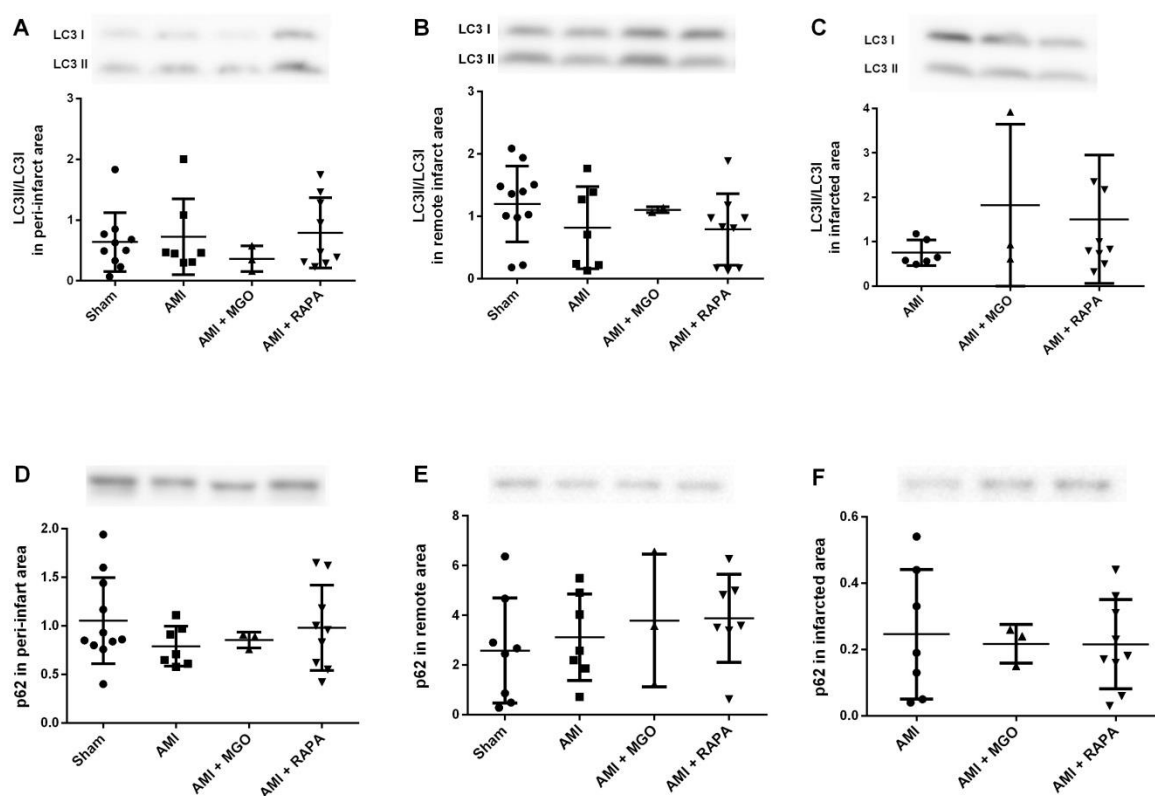


Figure 2. Autophagy markers. Ratio LC3II/LC3I from cardiac tissue peri-infarct area (a), remote area (b), and infarcted area (c). p62 from cardiac tissue peri-infarct area (d), remote area (e), and infarcted area (f). Molecular weight of LC3 (14-16 kDa), p62 (60 kDa). Kruskal-Wallis with Dunn test, $p < 0.05$. Data are expressed as median (IQR). * difference with Sham. # difference with AMI. + difference with AMI + MGO. AMI (acute myocardial infarction), MGO (methylglyoxal), RAPA (rapamycin).

Advanced Glycation End-Products

The total content of AGEs was unchanged in the peri-infarct and infarcted area with or without treatment with MGO or rapamycin in relation to sham (Fig. 3a).

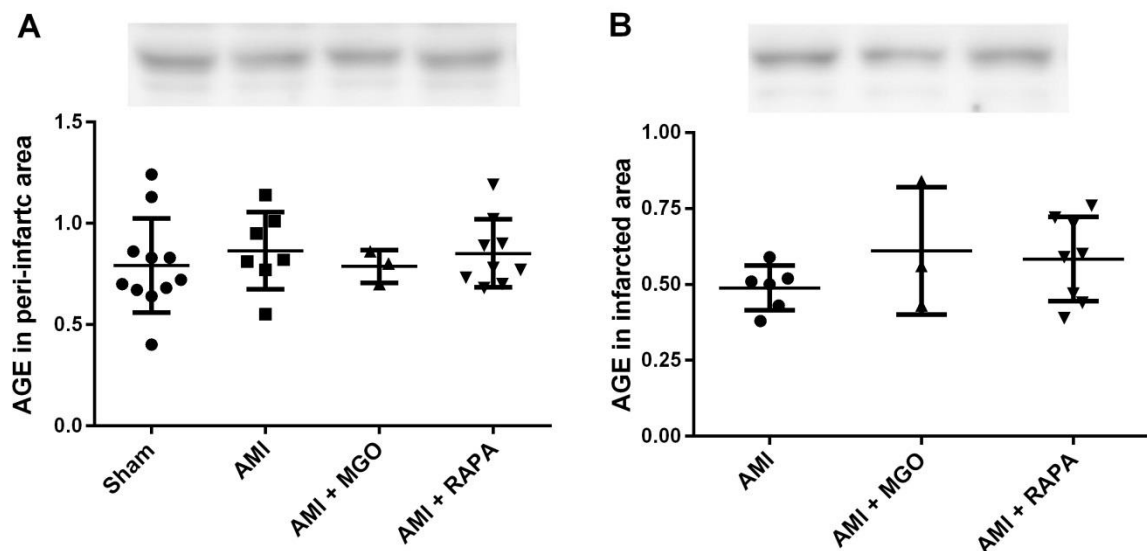


Figure 3. Content of AGEs. AGE from cardiac tissue peri-infarct area (a) and infarcted area (b). Molecular weight from AGE (N/A). Kruskal-Wallis with Dunn test, $p < 0.05$. Data are expressed as median (IQR). AMI (acute myocardial infarction), MGO (methylglyoxal), RAPA (rapamycin).

Cardiac Function and mortality

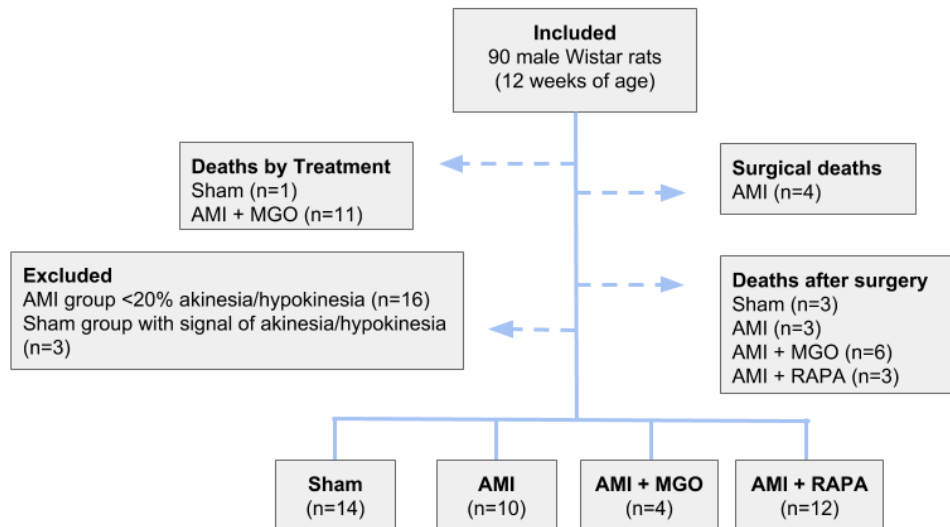
Twenty four hours after the surgery, animals were blindly assessed for cardiac function by echocardiography (Table 1). AMI group presented an infarct size of 35.1% and a decrease of 34% in ejection fraction ($p=0.02$), when compared to sham group. Also, AMI group presented an increase of 57% in the left ventricle end-systolic diameter (LVESD) ($p=0.001$). However, MGO or rapamycin did not influence cardiac remodeling.

The mortality was recorded in three moments: during the treatment with MGO or rapamycin, throughout the surgery, and post-surgery. MGO-treated rats presented higher mortality rate prior the surgery, indicating a toxicity effect. During the surgery, AMI group presented increased rate of mortality. A small protective effect was seen in rapamycin-treated animals during the follow-up (adjusted residual = 2.1) (Supplementary figure 1).

Table 1. Echocardiographic variables 24 hours after the AMI

	Sham (n=10)	AMI (n=6)	AMI + MGO (n=4)	AMI + rapamycin (n=7)
Infarct size (%)	0	35.1 (9.2)	33.2 (17.9)	31.6 (11.3)
EF (%)	84.1 (21.3)	49.6 (11.4)*	62.4 (20.6)	55.2 (22.3)*
FS (%)	47.5 (9.8)	22.3 (12.9)*	24.9 (11.1)*	22.6 (8.8)*
LVEDD (mm)	3.7 (1.1)	5.8 (3.1)*	5.8 (1.2)*	6.0 (1.0)*
LVEDD (mm)	6.6 (0.9)	7.4 (2.4)	7.6 (0.6)	7.6 (1.1)

Results are expressed as median (IQR). * indicates difference from sham group (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$). EF (Ejection Fraction), FS (Fractional Shortening), LVEDD (left ventricle end-systolic diameter), LVEDD (left ventricle end-diastolic diameter), AMI (acute myocardial infarction), MGO (methylglyoxal), RAPA (rapamycin).



Supplementary figure 1. Animal inclusion and exclusion diagram. Animals were randomized in 4 groups for preoperative treatment. Deaths were recorded during treatment and surgery, as well as after the procedure. Akinesia or hypokinesia <20% in the AMI groups or any sign of akinesia or hypokinesia in the Sham group was used as exclusion criterion. Some losses occurred during the experimental procedures and the actual sample size for each analysis is presented in the figures. AMI (acute myocardial infarction), MGO (methylglyoxal), RAPA (rapamycin).

Discussion

The autophagic process either during or after an AMI is not fully understood. Still less is known about the role of AGEs as triggers of autophagy and their

consequences to the cardiac remodeling. Autophagy activation through mTOR-inhibitor rapamycin has been used in animal studies with cardioprotective effects (33-35). Despite this, excessive activation of autophagy may be harmful and contribute to a negative remodeling (36). Thus, here we evaluate the role of methylglyoxal upon autophagy activation and their consequences on cardiac remodeling.

Our results show an increased p70S6K phosphorylation after MGO administration, indicating activation in mTOR pathway. However, markers of autophagy activation, such as increased ratio of LC3-II/LC3-I and p62 immunoccontent, were unaltered. In the same way, rapamycin did not increase autophagic flux, despite reducing mTOR activity in heart, as demonstrated by the decrease in p70S6K phosphorylation. The conversion of LC3-I to LC3-II is widely employed as marker of autophagy activation but it is not evident in some organs. Moreover, western blot analysis in tissue homogenates may represent an additional challenge due to the heterogeneity of the cell content (37). Thus, we suggest that p70S6K phosphorylation inhibition may be employed to check rapamycin-induced autophagy in heart tissue homogenate. Although the rapamycin did not alter markers of autophagy, it increased the survival rate during the follow-up, as demonstrated in a stroke model (38).

MGO is a powerful glycating agent (39). In vitro studies show that proteins react with MGO and generate MG-H1 (40). Wistar rats administered with 17 mg/kg showed increased MGO levels in the heart (41). On the otherwise, MGO chronically given to Wistar rats increased plasmatic MGO without increase in tissue levels (42). Here, we found that the treatment with MGO for 7 days before surgery with a concentration of 75 mg/kg/day did not increase the immunoccontent of AGEs in cardiac tissue. We employed an antibody raised against glycolaldehyde-glycated

proteins (anti-AGE #AB9890, Millipore), which may not detect a specific MGO derivative MG-H1 previously linked to the remodeling process (11). Thus, we still cannot rule out that some types of AGEs indeed increased in our experimental model and are linked to the mTOR activation. Still, no changes could be seen in heart remodeling in both MGO and rapamycin-treated animals. We also showed that animals treated with MGO had higher mortality during the treatment, which could be related to a known toxic effect caused by this molecule (43).

Some limitations must be addressed. First, despite using a previously described MGO dose (44, 45), an unexpected high mortality was found. However, our final sample size stood similar to other studies evaluating autophagy (34, 46). Second, remodeling assessment was performed 24 hours after the injury. As the heart remodeling takes time to happen, we cannot rule out a potential effect of MGO or rapamycin in long term follow up. Despite this, some studies present remodeling signals as soon as in 6 hours after AMI (2, 11, 47). Lastly, we did not see an increase in autophagic flux in hearts from rapamycin-treated animal treated with two doses of 8 mg/kg. We chose this dose based on a pilot study (2, 4, 6, and 8 mg/kg) according previous studies (26, 34, 48, 49). Still, the comparisons for autophagy markers presented statistical power >80% (comparison between AMI and rapamycin).

In conclusion, a glycant agent (MGO) administered prior to the AMI increased mTOR signaling but did not impaired heart remodeling. Rapamycin, usually employed as cardioprotective drug, inhibited mTOR signaling but did not improve heart remodeling up to 24 hours of follow up, despite being associated with survival. The interference of MGO with the mTOR pathway reveal an important interplay between AGE and autophagic routes, mainly when considering that glycation prone environments, such as diabetes, are important risk factor for myocardial infarction.

More in vivo studies are needed to elucidate the connection between glycation agents and autophagy in AMI.

References

- Richardson WJ, Clarke SA, Quinn TA, Holmes JW. Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. *Compr Physiol*. 2015 Sep 20;5(4):1877-909.
2. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):569-82.
 3. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):356-67.
 4. Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities. *Heart Fail Rev*. 2011 Jan;16(1):13-21.
 5. Nishida K, Otsu K. Autophagy during cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2016 Jun;95:11-8.
 6. Jung M, Ma Y, Iyer RP, DeLeon-Pennell KY, Yabluchanskiy A, Garrett MR, et al. IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res Cardiol*. 2017 May;112(3):33.
 7. Vlassara H, Cai W, Crandall J, Goldberg T, Oberstein R, Dardaine V, et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15596-601.
 8. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(1):103-13.
 9. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001 Feb;44(2):129-46.
 10. Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, et al. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med*. 2003 Sep;41(9):1166-73.
 11. Blackburn NJR, Vulesevic B, McNeill B, Cimenci CE, Ahmadi A, Gonzalez-Gomez M, et al. Methylglyoxal-derived advanced glycation end products contribute to negative cardiac remodeling and dysfunction post-myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2017 Sep 1;112(5):57.
 12. Hartog JW, Voors AA, Bakker SJ, Smit AJ, van Veldhuisen DJ. Advanced glycation end-products (AGEs) and heart failure: pathophysiology and clinical implications. *Eur J Heart Fail*. 2007 Dec;9(12):1146-55.
 13. Raposeiras-Roubin S, Rodino-Janeiro BK, Paradela-Dobarro B, Grigorian-Shamagian L, Garcia-Acuna JM, Aguiar-Souto P, et al. Predictive value of advanced glycation end

products for the development of post-infarction heart failure: a preliminary report. *Cardiovasc Diabetol*. 2012 Aug 21;11:102.

14. Willemsen S, Hartog JW, van Veldhuisen DJ, van der Meer P, Roze JF, Jaarsma T, et al. The role of advanced glycation end-products and their receptor on outcome in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *Am Heart J*. 2012 Nov;164(5):742-9 e3.
15. Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007 May;13(5):619-24.
16. Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*. 2010 Jul;6(5):600-6.
17. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000 Dec 1;290(5497):1717-21.
18. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):664-73.
19. Mei Y, Thompson MD, Cohen RA, Tong X. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Feb;1852(2):243-51.
20. Sciarretta S, Yee D, Shenoy V, Nagarajan N, Sadoshima J. The importance of autophagy in cardioprotection. *High Blood Press Cardiovasc Prev*. 2014 Mar;21(1):21-8.
21. Foglio E, Puddighinu G, Germani A, Russo MA, Limana F. HMGB1 Inhibits Apoptosis Following MI and Induces Autophagy via mTORC1 Inhibition. *J Cell Physiol*. 2017 May;232(5):1135-43.
22. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May;221(1):3-12.
23. Lee SB, Kim S, Lee J, Park J, Lee G, Kim Y, et al. ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase. *EMBO Rep*. 2007 Apr;8(4):360-5.
24. Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*. 2005 Dec;26(12):1421-34.
25. Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ*. 2010 Apr;17(4):666-76.
26. Xie K, Jin B, Li Y, Luo X, Zhu J, Ma D, et al. Modulating autophagy improves cardiac function in a rat model of early-stage dilated cardiomyopathy. *Cardiology*. 2013;125(1):60-8.
27. Yu Y, Wang L, Delguste F, Durand A, Guilbaud A, Rousselin C, et al. Advanced glycation end products receptor RAGE controls myocardial dysfunction and oxidative stress in high-fat fed mice by sustaining mitochondrial dynamics and autophagy-lysosome pathway. *Free Radic Biol Med*. 2017 Nov;112:397-410.
28. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*. 1978 Jan;90(1):57-70.
29. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12.
30. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010 Jul;1(2):94-9.

31. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ. [Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure]. *Arq Bras Cardiol.* 2006 Feb;86(2):105-12.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
33. Buss SJ, Muenz S, Riffel JH, Malekar P, Hagenmueller M, Weiss CS, et al. Beneficial effects of Mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Dec 15;54(25):2435-46.
34. Chen HH, Mekkaoui C, Cho H, Ngoy S, Marinelli B, Waterman P, et al. Fluorescence tomography of rapamycin-induced autophagy and cardioprotection in vivo. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2013 May 1;6(3):441-7.
35. Aisa Z, Liao GC, Shen XL, Chen J, Li L, Jiang SB. Effect of autophagy on myocardial infarction and its mechanism. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Aug;21(16):3705-13.
36. Lavandero S, Chiong M, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest.* 2015 Jan;125(1):55-64.
37. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.
38. Buckley KM, Hess DL, Sazonova IY, Periyasamy-Thandavan S, Barrett JR, Kirks R, et al. Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Transl Stroke Med.* 2014;6:8.
39. Maessen DE, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. *Clin Sci (Lond).* 2015 Jun;128(12):839-61.
40. Zhao D, Le TT, Larsen LB, Li L, Qin D, Su G, et al. Effect of glycation derived from alpha-dicarbonyl compounds on the in vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin: A model study with glyoxal, methylglyoxal and butanedione. *Food Res Int.* 2017 Dec;102:313-22.
41. Dhar A, Desai KM, Wu L. Alagebrium attenuates acute methylglyoxal-induced glucose intolerance in Sprague-Dawley rats. *Br J Pharmacol.* 2010 Jan;159(1):166-75.
42. Crisostomo J, Matafome P, Santos-Silva D, Rodrigues L, Sena CM, Pereira P, et al. Methylglyoxal chronic administration promotes diabetes-like cardiac ischaemia disease in Wistar normal rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013 Dec;23(12):1223-30.
43. Kalapos MP. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact.* 2008 Feb 15;171(3):251-71.
44. Rodrigues T, Matafome P, Santos-Silva D, Sena C, Seica R. Reduction of methylglyoxal-induced glycation by pyridoxamine improves adipose tissue microvascular lesions. *J Diabetes Res.* 2013;2013:690650.
45. Subramanian U, Nagarajan D. All-Trans Retinoic Acid supplementation prevents cardiac fibrosis and cytokines induced by Methylglyoxal. *Glycoconj J.* 2017 Apr;34(2):255-65.
46. Ma X, Liu H, Foyil SR, Godar RJ, Weinheimer CJ, Hill JA, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to cardiomyocyte death in ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2012 Jun 26;125(25):3170-81.

47. Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, Jensen TM, Toft E, Berning J. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1997 Aug 15;80(4):449-53.
48. Di R, Wu X, Chang Z, Zhao X, Feng Q, Lu S, et al. S6K inhibition renders cardiac protection against myocardial infarction through PDK1 phosphorylation of Akt. *Biochem J.* 2012 Jan 1;441(1):199-207.
49. Lu XT, Liu XQ, Wang B, Sun YY, Yang RX, Xing YF, et al. The Role of Psychological Stress on Heart Autophagy in Mice With Heart Failure. *Psychosom Med.* 2017 Nov/Dec;79(9):1036-44.