

EMANUELA PAZ ROSAS

**EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO
E A VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS**

Recife

2015

EMANUELA PAZ ROSAS

**EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO
E A VIABILIDADE CELULAR EM MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Linha de Pesquisa: Modelos morfofisiológicos e imunológicos das doenças.

Orientadora: Profa. Dra. Wylla Tatiana Ferreira e Silva

Co-orientadores: Profa. Dra. Sueli Moreno Senna

Prof. Dr. André de Lima Aires

Recife

2015

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

R789e Rosas, Emanuela Paz.
Efeito dos produtos finais de Glicação avançada sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos / Emanuela Paz Rosas. – Recife: O autor, 2015.
84 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Wylla Tatiana Ferreira e Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Produtos Finais de Glicosilação. 2. Macrófagos. 3. Óxido Nítrico. 4. Sobrevivência Celular. I. Silva, Wylla Tatiana Ferreira e (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-177)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde- UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppepatologiaufpe.com>

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM PATOLOGIA**

AUTORA: Emanuela Paz Rosas

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Efeitos dos Produtos Finais de Glicação Avançada sobre a Produção de Óxido Nítrico e a Viabilidade Celular em Macrófagos"

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Wylla Tatiana Ferreira e Silva

DATA DA DEFESA: 27 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de Medeiros

Prof^a. Dr^a. Cybelle Rolim de Lima

Prof^a. Dr^a. Sueli Moreno Senna

Dedico a Deus, meu Senhor e Pastor, meu tudo, meu Pai, meu melhor amigo, meu refúgio, minha fortaleza e socorro bem presente nas horas das aflições, sem Ele nada seria possível, toda honra e glória é Dele.

Aos meus pais, que com amor, carinho, cuidado e dedicação me mostraram que a educação abre portas para muitas oportunidades. Que me ensinaram a seguir em frente e lutar pelos meus sonhos e nunca desistir, e seguir o único caminho que nos dá vida, Jesus Cristo! Quero retribuir o que com muito amor me foi dado, Amo vocês!

As minhas irmãs e sobrinha, pelo amor, força, apoio e carinho, vocês são muito preciosas em minha vida!

A minha família, por todo amor, cuidado, apoio, incentivo, e ao qual sou grata a Deus por cada membro.

A meu namorado, amigo e amor, pessoa que esteve ao meu lado em todos os momentos com todo seu amor, paciência e dedicação.

As Profs. Drs. Wylla Silva e Sueli Senna, que me ensinaram e me ajudaram em tudo, vocês foram como anjos em minha vida, essa conquista é nossa!

A todos que intercederam, e que colaboraram para que todo esse trabalho fosse desenvolvido e ao qual sou eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Criador e Senhor da minha vida, que me ama incondicionalmente, me dá vida em abundância, me dá força e coragem em todo tempo para superar as dificuldades, me dá sabedoria e conhecimento. Por colocar pessoas maravilhosas em minha vida, para que contribuíssem em todo este trabalho. Tudo é Dele, por Ele e para Ele. A ti sou grata meu Pai, meu Rei, e Deus Todo poderoso! Todo louvor, honra e glória a Ti!

À minha mãe Silvania Tavares Paz, um exemplo de vida para mim, uma mulher trabalhadora, batalhadora, guerreira, que me ama de forma única, que dedicou sua vida com todo seu melhor para me educar, que esteve presente nos momentos mais difíceis, que me incentivou em tudo, e acreditou que os meus sonhos eram possíveis, e sempre esteve ao meu lado pra me ajudar em todos os momentos. Obrigada por tudo minha melhor amiga, meu anjo e companheira de todos os dias. Te amo!

A meu pai João Rafael Rosas Neto, um homem batalhador, por todo amor, cuidado, carinho, dedicação, palavras de incentivo, pelas orações, por me ajudar quando preciso, por ser um amigo, e por tentar sempre dá seu melhor. Te amo meu pai!

Às minhas irmãs Joana Rafaela Paz Rosas e Myrella Sodré Rosas, exemplos de fé, sou grata pelo amor, carinho e palavras de ânimo, de força e esperança, que jamais esquecerei. Amo muito vocês!

À minha sobrinha Leticia Gabriela Rosas, por ter chegado a nossa família e ter trazido tanta alegria, amor, carinho, e pureza, te amo pequena!

Às minhas tias Maria das Graças Paz Machado e Maria do Socorro Paz Rocha, por cuidarem de mim como filha, por me ajudar em minha educação e os ensinamentos que vocês me deram desde pequena guardarei sempre comigo.

A meu namorado Rhânniel Clayton Barnabé de Santana, que esteve antes do ingresso na pós me ajudando no inglês, e continuou me acompanhando durante toda a caminhada, me ajudando nas traduções e incentivando com todo seu amor, sua fé, força, cuidado, carinho e paciência. Te amo meu amor!

À minha orientadora Profa. Dra. Wylla Tatiana Ferreira e Silva que como mãe foi muito atenciosa, se preocupou em todo tempo, me deu forças, me ensinou, me guiou em todo o trabalho com muita sabedoria, e me deu todas as coordenadas que foram essenciais neste trabalho, sendo uma verdadeira orientadora. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sueli Moreno Senna, por sua calma, paciência, generosidade, carinho, e tempo dedicado, por cada ensinamento cheio de sabedoria e por toda sua ajuda que foi fundamental para meu aprendizado. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. André de Lima Aires, pela amizade, e colaboração com todo seu conhecimento científico, e pelo apoio para que os experimentos fossem realizados.

À aluna de Iniciação científica do curso de Nutrição, Fernanda Priscila Barbosa Ribeiro, que foi uma parceira nessa jornada me ajudando em toda a pesquisa. A sua amizade e força foram fundamentais.

Aos meus amigos e irmãos em Cristo, que oraram e intercederam por mim, e me deram palavras acolhedoras nesta caminhada.

À Profa. Dra. Carol Leandro Virginia Gois e a doutoranda Maria Claudia Alheiros, que deram uma grande contribuição para que os experimentos fossem realizados.

À Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros e a mestrandia Erwelly Barros de Oliveira, que nos ajudaram no momento crucial, nos cedendo células e o Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT), como também paciência e ajuda em todo experimento.

À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Patologia, Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, e a todos (funcionários, técnicos e professores) do mestrado, pela amizade, por todo apoio e colaboração frente a minha pesquisa, aos conhecimentos adquiridos com as disciplinas, estágio e docência.

Aos departamentos de nutrição, de histologia e LIKA, que contribuíram para que todos os experimentos fossem desenvolvidos.

A Capes, pelo apoio financeiro.

A todos, que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado torcendo ou participando para que esse sonho se tornasse realidade. Muito Obrigada!

O Senhor é bom para todos, e as suas misericórdias estão sobre todas as suas obras. Todas as tuas obras te louvarão, ó Senhor, e os teus santos te bendirão. Falarão da glória do teu reino, e relatarão o teu poder, para que façam saber aos filhos dos homens os teus feitos poderosos e a glória do esplendor do teu reino. O teu reino é um reino eterno; o teu domínio dura por todas as gerações. O Senhor sustém a todos os que estão a cair, e levanta a todos os que estão abatidos. Os olhos de todos esperam em ti, e tu lhes dás o seu mantimento a seu tempo; abres a mão, e satisfazes o desejo de todos os viventes. Justo é o Senhor em todos os seus caminhos, e benigno em todas as suas obras. Perto está o Senhor de todos os que o invocam, de todos os que o invocam em verdade. Ele cumpre o desejo dos que o temem; ouve o seu clamor, e os salva. O Senhor preserva todos os que o amam, mas a todos os ímpios ele os destrói. Publique a minha boca o louvor do Senhor; e bendiga toda a carne o seu santo nome para todo o sempre.

Salmo 145: 13-20

RESUMO

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são compostos heterogêneos gerados a partir da reação não enzimática, irreversível, conhecida como reação de Maillard ou Glicação. Essa reação ocorre entre açúcares redutores e seus metabólitos reativos ou lipídeos oxidados e proteínas ou ácidos nucleicos. Os AGEs são formados endógena (hiperglicemia e estresse oxidativo) e exogenamente (alimentos e fumo), e podem ser acumulados em vários tecidos causando efeitos deletérios em diversas patologias relacionadas a idade e a diabetes. Uma de suas principais ações é gerar estresse oxidativo através do aumento da expressão de mediadores inflamatórios. Os macrófagos são células fundamentais no reconhecimento, degradação e remoção dessas substâncias, além disso, têm papel crucial na produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS) na resposta imune, e podem estar envolvidos com variadas patologias. Neste estudo avaliou-se o efeito dos AGEs sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos. Macrófagos J774 foram incubados com diferentes concentrações de BSA- AGE (15, 30, 60, 120 ou 240 μ g/mL) por 24 ou 48 h e em seguida foram expostas (ou não) ao LPS (100ng/ml) por 24h. Para analisar a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular utilizaram-se os métodos de Griess e de MTT, respectivamente. As células J774 submetidas ao tratamento com AGE apresentaram alterações nos níveis de NO e na viabilidade celular. Notou-se que os macrófagos quando incubados com AGE nas maiores concentrações (60, 120, 240 μ g/mL), sem LPS, produziram um aumento significativo na liberação de NO por 24 h. Também foi visto que o tratamento com AGE nas concentrações 120 e 240 μ g/mL, e com LPS, também elevaram os níveis de NO significativamente. Os resultados mostraram um aumento na produção de NO quando as células foram tratadas com AGE em todas as concentrações (15, 30, 60, 120 e 240 μ g/mL) por 48 h. A incubação de células J774 com AGE nas concentrações de 240 μ g/ml por 24h com LPS, como também as concentrações de 120 e 240 μ g/ml por 48h sem LPS, reduziram a viabilidade celular quando comparados com seus respectivos controles. Em conclusão, os AGEs podem causar aumento da produção de NO por macrófagos quando estes são estimulados ou não por LPS, e por consequência conduzir a morte celular.

Palavras-chave: Produtos finais de glicação avançada. Macrófago. Óxido nítrico. Viabilidade celular.

ABSTRACT

The advanced glycation end products (AGEs) are heterogenic compounds generated from Maillard reaction or Glycation reaction. It is an irreversible nonenzymatic reaction involving reductive sugars and reactive metabolites or oxidated lipids, proteins or nucleic acids. AGEs could be originated by endogenous way (hyperglycemia or oxidative stress) and by exogenous way (certain types of food and tobacco). They could be accumulated in several organic tissues causing deleterious effects seen in diabetes and age-related diseases. One of the main AGE effects is the induction and maintenance of stress oxidative through inflammatory mediators increasing expression. In this scenario, macrophages are fundamental cells on the recognition, degradation and clearance of AGEs. They also play an important role on immune response by stimulating reactive nitrogen species production (RNS), which could be involved on the evolution of several diseases. The present study evaluated the AGE effect on the macrophages nitric oxide production as well as the cell viability. J774 macrophages were incubated with different concentrations of BSA- AGE (15µg, 30µg, 60µg, 120µg ou 240µg/mL) by 24 or 48 hours, following a second incubation with or without LPS (100ng/mL) by 24 hours. Nitric oxide production was evaluated by Griess reaction and cell viability by MTT production. Macrophages incubated with AGE presented nitric oxide and cell viability alterations. It was noted that macrophages when incubated with AGE in higher concentrations (60, 120, 240µg/mL) without LPS produced a significant increase in the release of NO for 24 h. It has also been seen that treatment with AGE concentrations 120 and 240µg/mL and stimulation by LPS have also increased NO levels significantly. The results showed an increase in NO production when cells were treated with AGE at all concentrations (15, 30, 60, 120 and 240µg/ mL) for 48 h. The incubation J774 cells with AGE at concentrations of 240 µg/ mL for 24 hours with LPS, as well as the concentrations of 120 and 240 µg/ mL for 48h without LPS, reduced the cell viability compared to their respective controls. In conclusion, AGEs can cause increased production of NO by macrophages when these are stimulated or not with LPS, leading to cell death.

Key-words: Advanced glycation end products. Macrophages. Nitric oxide. Cell viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs).....	21
Figura 2. Vias de sinalização da interação AGEs – RAGE em micróglia/ macrófagos.....	24
Figura 3. Funções fisiológicas e patologias ligadas aos macrófagos.....	27
Figura 4. Isoformas de óxido nítrico sintase (NOS).....	31
Figura 1 – Quantidade de artigos encontrados inicialmente e artigos selecionados para discussão.....	39
Figure 1 – Effect of treatment with J774 macrophage AGE in varying concentrations for 24h or 48h on nitric oxide production in the absence or presence of stimulation by LPS.....	59
Figure 2 – Effect of treatment with J774 macrophage AGE at different concentrations for 24h or 48h on cell viability in the absence or presence of LPS stimulation.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AGE – Produtos finais de glicação avançada
- Akt – Serina/treonina-específica da proteína quinase
- ANOVA - Análise de Variância
- ApoB-AGE – Apolipoproteína B – AGE
- BSA-AGE - Albumina Sérica Bovina - AGE
- CD36 - Receptor *scavenger* envolvido na imunidade
- CML- Carboximetil Lisina
- CO₂ – Gás Carbônico
- CRP – Proteína C reativa
- DHE – Departamento de Histologia e Embriologia
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DN – Departamento de Nutrição
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
- ERK 1/2 – Quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2
- H⁺ – Íon hidrogênio
- HMGB1- Proteínas 1 do grupo de alta mobilidade
- HO· – Radical hidroxil
- HSA-AGE – Albumina Sérica Humana - AGE
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- IL-6 – Interleucina 6
- iNOS- Óxido nítrico sintase induzível

JNK - Quinases N-terminais c-Jun

LBP – Proteína de ligação de LPS

LCT – Laboratório de Cultura de Tecidos

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LENIB – Laboratório de Estudo de Nutrição e Instrumentação Biomédica

LON – Liberação de Óxido Nítrico

LPS – Lipopolissacarídeo

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

MAPKs – Proteínas quinases ativadas por mitógeno

MTT – Brometo de tiazoliltetrazólio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NF-κB- Fator nuclear kappa B

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NLRs – Receptor semelhante a Nod

O_2^- – Radical ânion superóxido

ONOO⁻ – Peroxinitrito

OxLDL – Lipoproteína de baixa densidade oxidada

p38- Classe de proteínas quinases ativadas por mitógeno

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PI3-K – Fosfatidilinositol-3-quinase

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

RAGE – Receptor de produtos finais de glicação avançada

RLRs – Receptor semelhante a gene indutível-ácido retinóico 1

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RNS – Espécies reativas de nitrogênio

SFB – Soro fetal bovino

TLR – Receptor semelhante a Toll

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1 – Molécula de adesão celular vascular-1

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	16
1.1 Caracterização do problema	16
1.2 Justificativa	18
1.3 Hipóteses	18
1.4 Objetivos	19
1.4.1 Objetivo Geral	19
1.4.2 Objetivos Específicos	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).....	20
2.1.1 Receptor de AGEs (RAGE) e os mecanismos de interação AGE-RAGE.....	23
2.1.2 Patologias associadas a AGEs	25
2.2 Macrófagos e sua relação com os AGEs	26
2.2.1 Uso de linhagens celulares como modelo para estudo	29
2.3 Óxido Nítrico (NO) e sua relação com os AGEs	30
3. MÉTODOS	33
3.1 Área	33
3.2 Método de Coleta	33
3.2.1 Cultivo celular de macrófagos.....	33
3.2.2 Contagem de macrófagos	34
3.2.3 Cultivo das células e tratamento com os produtos finais da glicação avançada..	34
3.2.4 Mensuração de NO.....	34
3.2.5 Análise da viabilidade celular	35
3.3 Método de Análise Estatística.....	35
4.1. EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO POR MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.	36
4.2 EFFECT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ON THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND VIABILITY OF J774 MACROPHAGE.	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE	82
ANEXOS	84

1. APRESENTAÇÃO

1.1 Caracterização do problema

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs – *Advanced Glycation End-products*) compõem um grupo de compostos heterogêneos formados por processo químico não enzimático, irreversível, conhecido como reação de Maillard ou glicação. Envolve grupos amino livres de proteínas ou ácidos nucleicos e grupos carbonila de açúcares redutores e seus metabólitos reativos ou lipídeos oxidados. Estas biomoléculas são obtidas endógenamente pela hiperglicemia ou processos relacionados com o estresse oxidativo. Os AGEs podem provir de compostos exógenos, relacionadas a fontes de alimentação e fumo. Dentre os tipos de AGEs já identificados, a pentosidina e a carboximetil-lisina (CML) são os mais frequentes em humanos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; NEDIC *et al.*, 2013).

Esses produtos podem causar efeitos deletérios em diferentes tecidos e isso se deve a sua composição química, sua ação oxidante e inflamatória. Tais efeitos estão diretamente relacionados aos mecanismos que não envolvem o receptor como os danos causados a estrutura da proteína e ao metabolismo da matriz extracelular; como também os que envolvem o receptor dos produtos finais de glicação avançada, o RAGE (CONTRERAS; NOVAKOFSKI, 2010).

O receptor para os AGEs (RAGE) é uma proteína transmembrânica expressa em uma ampla variedade de células (linfócitos, macrófagos, células musculares, endoteliais). Este receptor se liga a diversos ligantes extracelulares e medeiam respostas a condições de estresse, ativando vias de transdução de sinal que desempenham um importante papel na inflamação aguda e/ou crônica. A ativação deste receptor tem sido vista em uma variedade de doenças relacionadas com o envelhecimento, como a aterosclerose, a neurodegeneração, diabetes e câncer (NEDIC *et al.*, 2013).

O sistema imunológico inato participa de todo o processo de reconhecimento, degradação e remoção de AGEs, e dentre as células desse sistema, os macrófagos desempenham um papel fundamental. Eles removem as proteínas modificadas por AGEs através do receptor RAGE. Essa interação dos AGEs com RAGE, em macrófagos, induz uma variedade de resposta como: quimiotaxia, ativação celular, secreção de citocinas (IL-1) e fatores de crescimento. Além disso, os macrófagos expressam genes de receptores de LDL oxidadas: o receptor *scavenger* de classe A e o CD36. O aumento de expressão destes receptores por AGEs tem sido implicado em uma

maior captação de LDL oxidada (OxLDL), resultando na transformação de célula espumosa ou *foam cell* na aterosclerose (URATA *et al.*, 2002; GOLDIN *et al.*, 2006; BASSI *et al.*, 2007;).

Uma das substâncias sintetizadas quando os macrófagos são ativados é o óxido nítrico (NO), que é produzido por uma enzima denominada óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que tem a propriedade de gerar NO a partir do aminoácido arginina e oxigênio molecular. O NO é um gás solúvel com comportamento de radical livre, altamente lábil e que, conforme a concentração ou depuração tecidual pode ser benéfico ou potencialmente tóxico para as células. Em macrófagos, o NO exerce função citotóxica e citostática através da inibição de enzimas contendo ferro, causando fragmentação de DNA, atuando contra agentes patogênicos e células tumorais. A atividade microbicida do NO pode ser direta, quando este gás inativa enzimas presentes nos microrganismos, e indireta, produzindo moléculas oxidativas que interagem com proteínas acarretando danos as células (FORSTERMANN; KLEINERT, 1995; ROJAS *et al.*, 1996; FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; PARSLOW, 2004).

Estudos tem mostrado que os AGEs estimulam a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células endoteliais, macrófagos de ratos e células RAW 264.7 (ROJAS *et al.*, 1996; AMORE *et al.*, 1997; WU *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2003). Em micróglia e neurônios, placas de proteínas extracelulares com AGEs ativam vias intracelulares de transdução de sinal, aumentando a produção de NO e outras citocinas pró-inflamatórias. Esses produtos podem ser encontrados em níveis anormais em regiões do cérebro afetadas na doença de Alzheimer (STOLZING *et al.*, 2006).

O acúmulo de AGEs em tecidos tem sido considerado como um dos mediadores patogênicos importantes associados a complicações relacionadas com a diabetes e o envelhecimento (PEPPA; VLASSARA, 2005). Estudos mostraram que níveis da Apolipoproteína B-AGE (ApoB – um componente da LDL), são, aproximadamente, quatro vezes maiores em indivíduos diabéticos. A glicação da ApoB contribui para a aterosclerose, através da redução do clearance da LDL e da deposição da LDL-AGE na parede vascular (BUCALA *et al.*, 1994). Bar *et al.* (2003) demonstraram aumentos diferenciais de AGEs na demência vascular e na demência de Alzheimer quando comparados com os controles. Em pacientes diabéticos com retinopatia níveis séricos de carboximetilisina (CML) estão aumentados (AHMED, 2005).

1.2 Justificativa

Os AGEs estão relacionadas à gênese e à progressão de diversas doenças relacionadas à diabetes e ao envelhecimento, tais como neuropatia diabética, Alzheimer, aterosclerose, dentre outras.

É de fundamental importância o entendimento dos efeitos celulares e moleculares dessas substâncias para a intervenção nesses processos de modo a evitar ou reverter às consequências danosas dessas doenças. Mas ainda existem várias lacunas no conhecimento científico acerca dos efeitos dessas moléculas sobre células do sistema imunológico. Alguns estudos têm associado à presença de AGE com alterações na cadeia transportadora de elétrons de macrófagos, indicando que esse tipo celular é suscetível ao AGE.

O presente estudo visa esclarecer o efeito do AGE sobre o metabolismo oxidativo e a sobrevivência de macrófagos. Dessa forma, gerando subsídios para a melhor compreensão dos quadros patológicos vistos, por exemplo, no diabetes, onde a cicatrização de feridas e as defesas imunológicas inatas estão alteradas.

1.3 Hipóteses

- A interação AGE com seu receptor atua como uma via de ativação do macrófago que resulta na produção de radicais livres, como NO.
- O aumento na produção de NO pode ser tóxico para as próprias células, implicando em redução na viabilidade celular.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular em macrófagos J774.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito de diferentes doses (15, 30, 60, 120 ou 240µg/ mL) e tempos (24 ou 48h) de incubação de AGEs sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos na ausência ou presença de LPS.
- Avaliar o efeito de diferentes doses (15, 30, 60, 120 ou 240µg/ mL) e tempos (24 ou 48h) de exposição de AGEs sobre a viabilidade celular de macrófagos na ausência ou presença de LPS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs)

Reações não enzimáticas entre grupos amino livres em proteínas e ácidos nucleicos com grupos carbonila de açúcares redutores ou lipídeos oxidados são conhecidas como reação de glicação. Essa reação foi primeiramente descrita em 1912 por Louis Camille Maillard, que relatou formação de produtos castanhos em meio ao aquecimento de misturas de aminoácidos e açúcares. Essa reação pode ocorrer por três vias: clássica da Reação de Maillard, do estresse carbonílico e do poliols. A via clássica da Reação de Maillard inicia-se através das bases de Schiff entre glicose e os grupos amino de proteínas (lisina). Esses sofrem rearranjos e formam os produtos de Amadori (hemoglobina glicada e a frutosamina), que são estruturas estáveis. Esses produtos possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam aos grupos de amina primárias e geram os produtos finais de glicação avançada (AGEs) (Figura 1) (BIERHAUS *et al.*, 1998; MONNIER, 2003; MONNIER; SELL; GENUTH, 2005). Outro caminho alternativo para a formação de AGEs é a via do estresse carbonílico. A oxidação de lipídeos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como na glicólise e na auto-oxidação da glicose, onde é gerado o metilglioxal e o glioxal. Esses produtos juntamente com aminoácidos formam os AGEs como pentosidina, a carboximetilisina (CML) e a pirrilina (Figura 1) (BIERHAUS *et al.*, 1998; MEADE; MILLER; GERRARD, 2003; HENLE, 2003). Outro mecanismo também foi relatado como favorável à formação dos produtos finais de glicação avançada, a via do poliols. A glicose é convertida em sorbitol pela enzima aldose redutase e em seguida em frutose pela enzima sorbitol-desidrogenase. Metabólitos da frutose são convertidos α – oxaldeídos, que interagem com monoácidos para formar os AGEs (Figura 1) (CONTRERAS; NOVAKOFSKI, 2010).

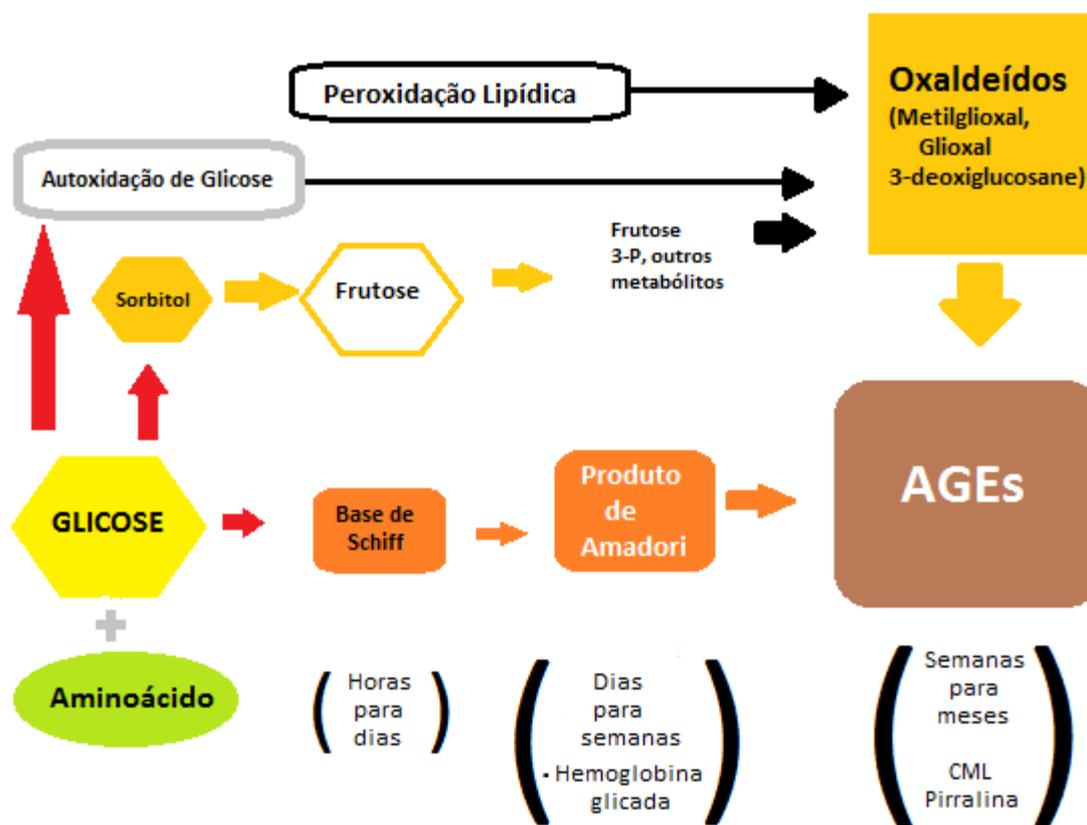


Figura 1. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). A formação de AGEs pode se dar por pelo menos três vias: A reação de Maillard; oxidação de glicose ou peroxidação de lipídios; e através da via do poliol. Fonte: Adaptado de Contreras; Novakofski, 2010.

Entre as proteínas mais suscetíveis à glicação temos a albumina, que é a proteína mais abundante nos seres humanos (cerca de 40mg/ml), responsável pela manutenção da osmolaridade do plasma e de fluidos intersticiais e transporte de substâncias. Sua grande tendência a glicação é devido à presença de resíduos de lisina e arginina, e durante esse processo ela sofre alterações ou perda da sua estrutura helicoidal, originando a albumina sérica humana - AGE (HSA-AGE). Aproximadamente 10% da albumina encontra-se glicada em indivíduos saudáveis, já em condições de hiperglicemia, como por exemplo, no diabetes, esse valor aumenta 2 a 3 vezes (NAKAJOU *et al.*, 2003; SATTARAHMADY *et al.*, 2007; SATTARAHMADY; MOOSAVI-MOVAHEDI; HABIBI-REZAEI, 2011).

A formação endógena dos AGEs se dá lentamente em condições fisiológicas, afetando proteínas importantes como o colágeno tipo I, acelerando o envelhecimento.

Além disso, pode envolver células como neutrófilos, monócitos e macrófagos, que depois de um estímulo inflamatório, irão produzir mieloperoxidase e a enzima NADPH oxidase, e assim formar esses produtos através da oxidação de aminoácidos; bem como, em condições de hiperglicemia e estresse oxidativo, há um aumento intensivo na geração desses compostos (HUEBSCHMANN *et al.*, 2006; FORBES; SOLDATOS; THOMAS, 2005; LAPOLLA; FEDELE ; TRALDI, 2005; JAY, 2006).

No entanto, a formação desses produtos não se dá apenas endogenamente. Podemos absorvê-los através da dieta e do fumo. Na dieta moderna os alimentos que são expostos ao cozimento ou processamento térmico são uma das fontes em AGEs. Cerca de 10% dos AGEs ingeridos através da dieta são absorvidos, dois terços são retidos no organismo e apenas um terço é excretado pela urina. Já a formação dessas biomoléculas pelo fumo se dá quando este é submetido à combustão, quando serão volatilizadas nos pulmões, podendo interagir com as proteínas plasmáticas iniciando os mecanismos da reação da glicação avançada (CERAMI, 1997; VLASSARA; PALACE, 2002; HUEBSCHMANN *et al.*, 2006).

Em contraposição a essa produção e absorção o corpo possui mecanismos regulatórios para impedir o acúmulo de AGEs, tais como sistemas enzimáticos. Esses sistemas incluem a oxaldeído redutase e a aldose redutase que atuam na detoxificação de intermediários dicarbonílicos reativos, a glioxilase I e II, a frutosamina-3-cinase e a frutosamina oxidase (amadoriase). Atuam na interrupção das reações de Maillard em diferentes fases, porém esses sistemas não são efetivos ou são superados em casos patológicos, como na diabetes, hiperglicemia e insuficiência renal, e em casos de indivíduos que consomem dietas com alto conteúdo de AGEs (VLASSARA; PALACE, 2003).

O reconhecimento dos AGEs é feito por receptores específicos tais como receptores *scavenger*. Desses receptores ou proteínas ligantes de AGEs o receptor RAGE é a molécula mais conhecida. O RAGE pertence à superfamília das imunoglobulinas de superfície celular presente nos macrófagos e diversos outros tipos celulares e sua ação é pró-inflamatória. Isso se deve ao fato de que no gene promotor do RAGE são encontradas regiões promotoras do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e da interleucina-6 (IL-6) (GOLDIN *et al.*, 2006; LIN, 2006).

Os mecanismos básicos pelos quais os AGEs danificam as células compreendem a modificação de estruturas intracelulares, incluindo as que participam da transcrição gênica; interação desses com proteínas da matriz extracelular, mudando a sinalização

entre a matriz e a célula, gerando falha nas funções e estrutura do tecido afetado; e a modificação de proteínas ou lipídeos plasmáticos. Essas alterações nas macromoléculas resultam na ligação de proteínas ou lipídeos a receptores específicos, como RAGE em macrófagos, levando a produção de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico sintase induzível (ROJAS *et al.*, 1996; BIERHAUS *et al.*, 1998; BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

A eliminação de AGEs formado endogenamente, nos tecidos, ocorre pela quebra extracelular de proteínas ou pelas células de *scavenger*, como os macrófagos, que englobam e identificam esses AGEs através de seus receptores. Ao serem degradadas, essas moléculas liberam AGE-peptídeos solúveis que apesar de serem extremamente reativos, são facilmente eliminados na urina. Por isso alterações no *clearance* renal são bastante representativas para desequilíbrio das concentrações séricas de AGEs (GUGLIUCCI; BENDAYAN, 1996; BIERHAUS *et al.*, 1998; NAKAMURA, 2003).

2.1.1 Receptor de AGEs (RAGE) e os mecanismos de interação AGE-RAGE

O receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) foi descrito primeiramente em 1992, através da captação de AGEs por macrófagos (GU *et al.*, 2006). É conhecido como um receptor de membrana da superfamília das imunoglobulinas, amplamente caracterizado na literatura, e expresso em diversas células do sistema imunológico tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, micróglias, além de neurônios, células musculares e endoteliais (YONEKURA *et al.*, 2005; GOLDIN *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2009). Possui domínios extracelulares sendo um tipo V (parte que envolve a ligação com o ligante) e dois do tipo C; apresenta também um domínio transmembrânico e uma cauda citoplasmática envolvida com a sinalização celular (SPARVERO *et al.*, 2009). Pode fazer ligações com vários outros ligantes além de AGEs, como peptídeo β amilóide, os membros da família de proteínas S100, proteínas 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) e príons (BASTA, 2008).

A interação de AGEs com o receptor RAGE dá início à sinalização de vias que ativam as proteínas quinases ativada por mitógeno (MAPK), como a ERK1 / 2, a JNK, a Akt e p38, e a via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3-K) que conduzem à ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Figura 2). Posteriormente à ativação, o NF- κ B irá ser translocado para o núcleo onde haverá a ativação da transcrição de genes para citocinas, fatores de crescimento (fator de necrose tumoral α – TNF α ; interleucina 6 – IL-6; fator

de crescimento endotelial vascular – VEGF), conhecidos como agentes inflamatórios, moléculas de adesão (molécula de adesão celular vascular 1 – VCAM-1), e proteína C reativa (CRP). O aumento da expressão de RAGE, é criado por um *feedback* positivo, através da ativação do NF- κ B, no qual eleva-se a resposta inflamatória. Da mesma forma, o complexo AGE-RAGE desencadeia o aumento do estresse oxidativo intracelular e a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da ativação do complexo NADPH oxidase, e de sua regulação positiva. Além disso, este aumento do estresse oxidativo por NADPH oxidase pode também ativar o NF- κ B. A ativação de NF- κ B mediado por RAGE também é conhecido por promover a ativação de genes de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Figura 2) (WAUTIER *et al.*, 2001; BASTA *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2009).

Devido ao RAGE ser um multiligante que conduz à ativação de vias que estão relacionadas à inflamação e estresse oxidativo, tem-se evidenciado sua participação em algumas condições patológicas, tais como a aterosclerose, artrite, síndrome metabólica, acidente vascular cerebral, neurodegeneração e câncer. (RIEHL *et al.*, 2009).

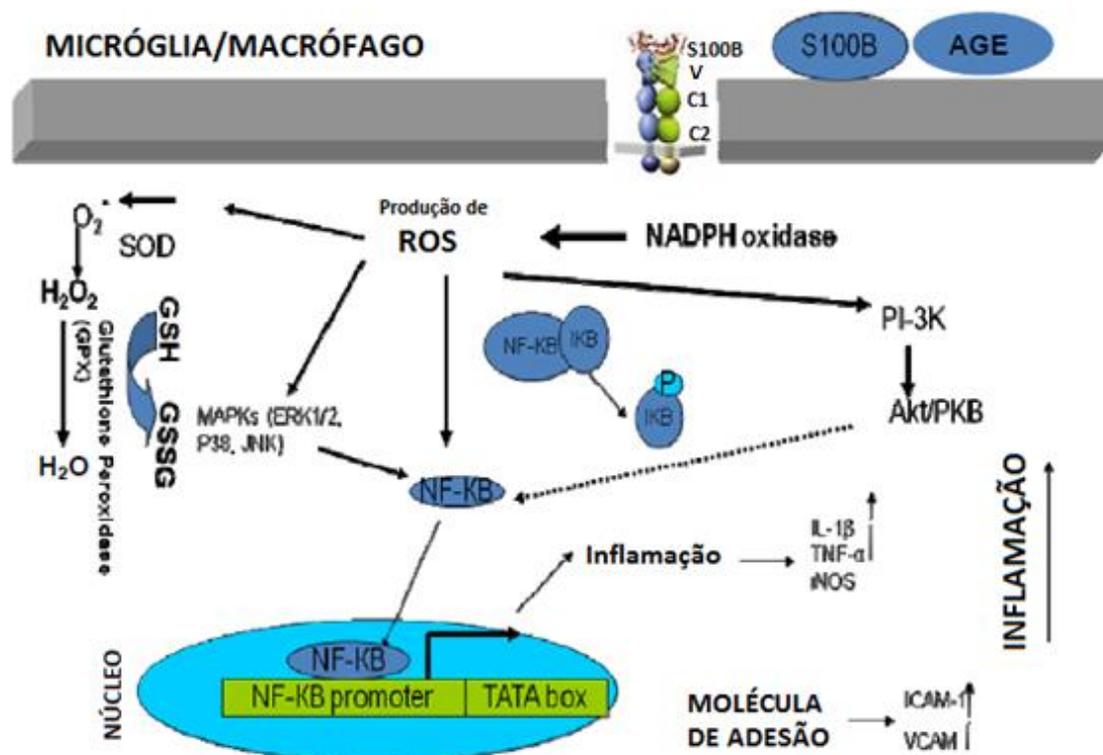


Figura 2. Vias de sinalização da interação AGEs – RAGE em micróglia/ macrófagos. São implicadas para ser envolvido na via de sinalização de RAGE: Fator nuclear kappa B (NF- κ B) e MAPK, tais como ERK1 / 2, de JNK, Akt e p38. Fonte: Adaptada de Younessi; Younessi, 2011.

2.1.2 Patologias associadas a AGEs

Tem sido observado que a presença de AGEs está associada a danos significativos em uma variedade de doenças, principalmente em pacientes diabéticos, onde a concentração dessas biomoléculas se torna maior. Isto se deve ao descontrole hiperglicêmico quando comparado a indivíduos saudáveis (ASO *et al.*, 2000; BANSAL *et al.*, 2013) Além disso, é verificado nos rins, órgão responsável pela eliminação dos AGEs peptídicos, que os níveis AGEs estão associados com a insuficiente função renal em um modelo de insuficiência renal aguda em ratos (SEBEKOVÁ *et al.*, 2001).

Estudos têm mostrado que elevados níveis de AGEs são encontrados em pacientes com doença arterial coronariana e sua presença no soro tem sido associada à rigidez aórtica (KANAUCHI; TSUJIMOTO; HASHIMOTO, 2001; MCNULTY; MAHMUD; FEELY, 2007). É relatado também que proteínas de longa vida como a elastina e colágeno junto com AGEs derivados das mesmas, podem se acumular de forma gradativa durante a vida unindo-se a outros AGEs da matriz extracelular. Dessa forma contribuindo para o enrijecimento arterial (BUCALA; TRACEY; CERAMI, 1991; SELL; MONNIER, 2012). Esses produtos estão envolvidos na produção de ROS e na inflamação local aos quais podem induzir mudanças vasculares e expressão de genes que estão diretamente relacionados com a aterosclerose, como VEGF. Além disso, a modificação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) por AGE gera uma diminuição da LDL plasmática contribuindo de forma relevante para o aumento da LDL *in vivo*, e desta forma para o desenvolvimento da aterosclerose (BUCALA *et al.*, 1995; YAMAGISHI, 2011).

Doenças neurodegenerativas são conhecidas por ter uma característica comum tanto no início como na sua progressão, o estresse oxidativo. Entre essas doenças estão a doença de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e doença priônica ou Creutzfeld-Jakob (NEDIC *et al.*, 2013). A produção de ROS no tecido cerebral pode ser estimulada pelo aumento de AGEs, assim como níveis baixos de enzimas antioxidantes e altas concentrações de ferro (SCHULZ *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2012). O acúmulo e expressão da proteína amiloide β no cérebro envolve a expressão de RAGE e a produção de AGEs. Do mesmo modo, os AGEs podem ser vistos em depósitos patológicos, tais como placas amiloides e emaranhados neurofibrilares na doença de Alzheimer (CARRANO *et al.*, 2011; CAI; ZHAO; RATKA., 2011 ; SRIKANTH *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012).

Em diversos tumores como carcinoma colorretal, gástrico, pancreático, prostático, de mama, cerebral e tumores ovarianos, tem sido detectado o aumento da expressão de RAGE, bem como ligantes de RAGE têm sido formados e segregados em células de vários tipos de câncer (RIEHL *et al.*, 2009). A interação AGE-RAGE tem causado através de vias de sinalização, a expressão de VEGF, aumentando desta forma, o potencial angiogênicos do carcinoma hepatocelular. Tem se verificado também que RAGE desempenha papel crucial em interações tumor-estroma os quais conduzem à inflamação do cólon associada à carcinogênese (TUROVSKAYA, *et al.*, 2008; TAKINO; YAMAGISHI; TAKEUCHI, 2012).

2.2 Macrófagos e sua relação com os AGEs

Os macrófagos são células pertencentes à linhagem mieloide de características fagocítica e mononuclear. São derivados de monócitos que se originam na medula óssea. Conhecidos como células efetoras da resposta imune inata e adaptativa, desempenham um papel crucial na eliminação de patógenos invasores, na manutenção da homeostase dos tecidos através da retirada de células em apoptose e pela produção de fatores de crescimento. São células capazes de apresentar antígenos e ativar células T e B. Além disso, estão envolvidos no desenvolvimento de vários tecidos, na reparação tecidual através da eliminação de detritos e secreção de fatores angiogênicos e fibrogênicos (LEIBOVICH; ROSS, 1975; GORDON, 2007; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

Macrófagos residem em quase todos os tecidos e são distribuídos vastamente por todo o corpo e, as morfologias e capacidades funcionais mudam entre as localidades. Entre esses temos as células de Kupffer do fígado que participa na depuração de patógenos e toxinas a partir da circulação; os macrófagos alveolares nos pulmões que removem a poeira, os alérgenos e microrganismos das vias respiratórias; os osteoclastos no sistema esquelético, importantes na reabsorção óssea; as micróglias no sistema nervoso que desempenham um papel na modelação neuronal, dentre outros (Figura 3) (MURRAY; WYNN, 2011; WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013).

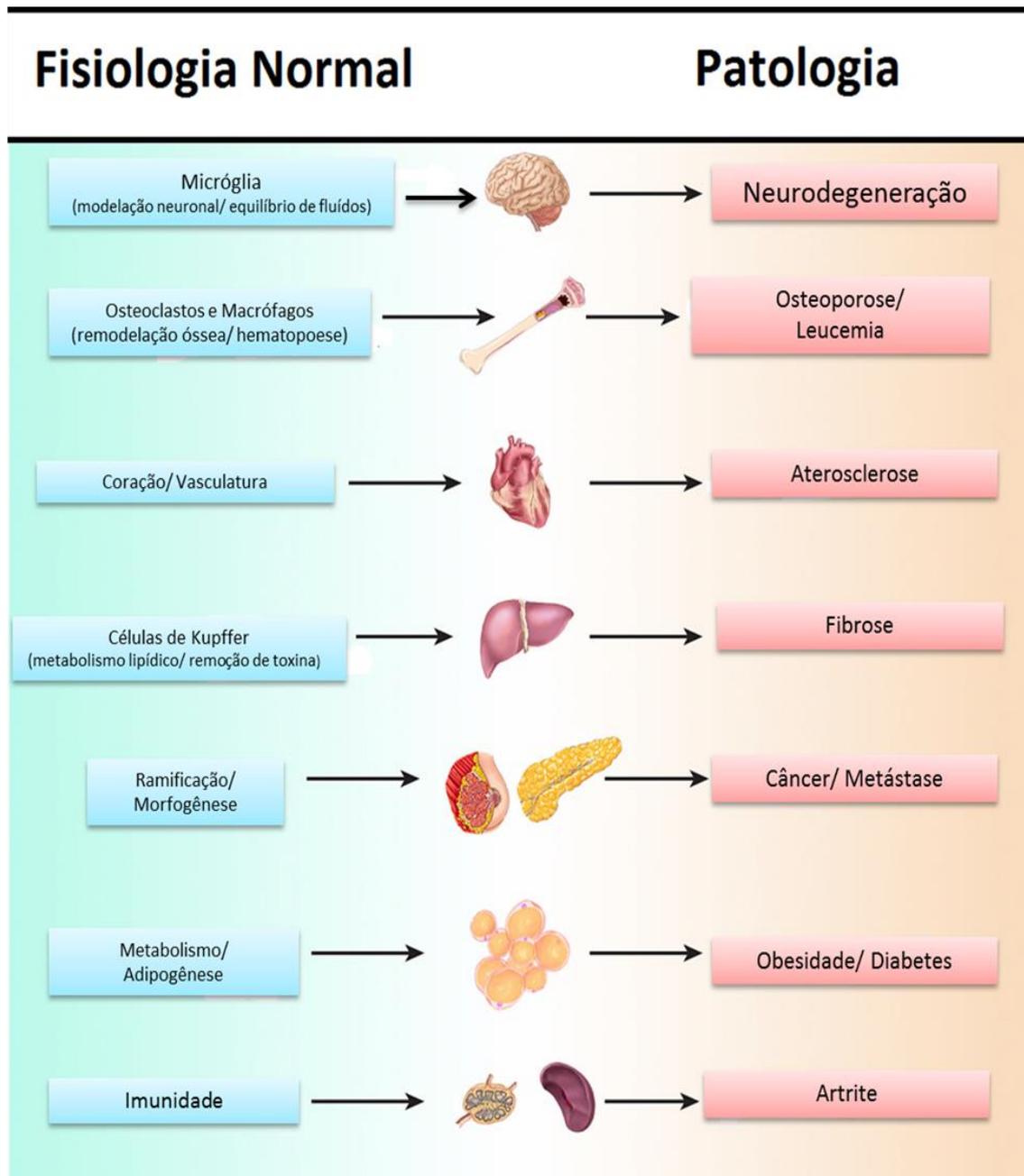


Figura 3. Funções fisiológicas e patologias ligadas aos macrófagos. Os macrófagos desempenham vários papéis de desenvolvimento que dão forma a arquitetura dos tecidos que variam do cérebro, do osso para a glândula mamária. São células que modulam a homeostase e a fisiologia normal regulando diversas atividades, incluindo o metabolismo, a conectividade neural e através da detecção de danos. Esses papéis tróficos e regulamentares, no entanto, são frequentemente subvertida pelo insulto contínuo e macrófagos contribuem para muitas doenças que são frequentemente associados com o envelhecimento.

Fonte: adaptada de WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013.

A ativação dessa célula multifuncional se dá após o contato com partículas vivas ou inertes que entram no meio interno. Além disso, outras células do próprio indivíduo,

quando modificadas em sua membrana, passam a serem ativadores de macrófagos. Quando ativados se tornam fagócitos ávidos a englobar qualquer partícula estranha ou resto celular que entrem em contato com eles. A fagocitose se processa por meio da relação entre receptores da membrana e certas moléculas de adesão que vão facilitar o contato com as partículas estranhas (LORENZI, 2006).

Juntamente com os neutrófilos, os macrófagos participam da primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos infecciosos do meio exterior. Sua finalidade é reconhecer tais agentes, e posteriormente, iniciar a inflamação. Para isso utilizam uma grande variedade de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes receptores permitem distinguir produtos microbianos conservados conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Entre os PAMPs que estão associados a infecções extracelular incluem: o ácido lipoteicoico dos microorganismos Gram-positivos, mananas da parede celular de leveduras, glicolipídeos micobacterianos e lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram negativas. O LPS é reconhecido por uma proteína de ligação de LPS (LBP) do plasma, sendo este complexo (LBP+LPS) capturado pela molécula depuradora CD14. O CD14 ativa o receptor semelhante ao Toll (TLR) que desencadeia eventos que culminam no desacoplamento do inibidor de NF- κ B; o NF- κ B livre irá ser translocado para o núcleo e gera o processo da fagocitose, com liberação de mediadores pró-inflamatórios (MEDZHITOV *et al.*, 1997; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; ROITT; DELVES, 2010).

Há uma variedade de classes de PRRs, os quais participam os receptores Toll-Like (TLRs), Nod-like (NLRs) e RIG-I like (RLRs). Os TLRs são capazes de reconhecer vários componentes microbianos, e este reconhecimento conduz a ativação dos macrófagos, que vão efetivar a produção e liberação de várias moléculas tais como espécie reativa do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS). Estas espécies tais como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, são muito difusas, e desempenham atividades citotóxicas contra microrganismos e células vizinhas, inclusive contra os próprios macrófagos. Adicionalmente, a ativação desses receptores resulta na produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β , e IL-6. (MEDZHITOV *et al.*, 1997; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; TAKEUCHI; AKIRA,2010; KOIKE *et al.*, 2015)

Embora essas células desempenhem uma grande gama de funções importantes para o organismo, acredita-se que macrófagos podem promover lesões em tecidos normais durante diversas condições patológicas, tais como a doença de Gaucher, artrite

reumatóide, tuberculose, malária cerebral, AIDS, aterosclerose e trauma da matriz extracelular e do cérebro (GORDON, 2001; ABBAS; JANEWAY, 2000). Esta hipótese é fundamentada na variedade de enzimas potencialmente lesivas que os macrófagos possuem em seus lisossomos (proteases neutras, metaloproteinases e elastases). Essas enzimas podem ser liberadas para o parênquima tecidual, durante a atividade destas células, causando degradação de colágeno, elastina e fibrina. Podem também liberar citocinas inflamatórias, radicais livres e NO, os quais são vistos em lesão tecidual relacionada à resposta inflamatória. (LIMA *et al.*, 2007).

Macrófagos são células que reconhecem, degradam e eliminam AGEs. São conhecidos por mediar lesões devido a deposição de AGEs nos tecidos e tem sido um fator crítico que contribui com complicações diabéticas. Sabe-se que os AGEs estimulam a ativação de macrófagos e a produção de citocinas por meio da interação com o receptor para AGEs (RAGE), que é encontrado em macrófagos nos locais de inflamação crônica (WEBSTER *et al.*, 1997; URATA *et al.*, 2002; CIPOLLONE *et al.*, 2003).

Contudo, os efeitos de AGEs sobre macrófagos não se limitam à produção de citocinas, eles também podem induzir a expressão do gene do receptor *scavenger* nos macrófagos, o que pode promover a absorção de LDL oxidada e aumento da transformação de células espumosas, o que resulta na formação de placas de ateroma (VLASSARA; BROWNLEE; CERAMI, 1984).

Além disso, a diabetes prolongada pode induzir a formação de compostos de AGE irreversíveis com a mielina, que pode promover o reconhecimento e a absorção da mielina modificada por macrófagos. Esta interação pode iniciar ou contribuir para a desmielinização segmentar associada à neuropatia diabética (VLASSARA; BROWNLEE; CERAMI, 1984).

2.2.1 Uso de linhagens celulares como modelo para estudo

Tipos celulares como macrófagos tem se reproduzido e expressado suas propriedades *in vitro* em condições apropriadas, podendo ser obtidos de tecidos vivos de animais ou seres humanos, ou serem isoladas e cultivadas em placas com meio de cultura nutritivo ou cultura primária (ALBERTS *et al.*, 2006). Experimentos que usam culturas primárias carregam em si um grande prejuízo desde o ponto de vista econômico até bioético, pois necessitam de um grande gasto de materiais, assim como o tempo

gasto pelo pesquisador. E muitas vezes são inviáveis durante longos períodos, podendo tudo ser descartado e um novo experimento ser montado. Com isso, vários animais serão sacrificados até que se consiga a quantidade de células necessárias, indo de encontro com as normas éticas que visa à utilização mínima de animais para validar resultados. (HOFF, 1980; NOVELINO *et al.*, 2003).

Linhagens celulares são células modificadas geneticamente que são isoladas de tecidos cancerosos, com alta proliferação, mas com características fenotípicas e genotípicas preservadas de seus tecidos de origem (COOPER; HAUSMAN, 2007). A linhagem J774 compreende macrófagos obtidos de ascite e de tumores sólidos originados de camundongos Balb/c. São modelos que estão estabelecidos na biologia e imunologia celular, além disso, podem ser mantidos e manipulados geneticamente (RALPH; PRICHARD; COHN, 1975). Exibem muitas das características de macrófagos peritoneais de camundongos, e servem de modelo experimental através da ativação da resposta imune com a produção de NO, TNF- α , IL-1. São reconhecidos também como sistemas para estudos biofísicos quantitativos da mobilidade de células eucarióticas e mecanismos imunes (LAM *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2014).

2.3 Óxido Nítrico (NO) e sua relação com os AGEs

O óxido nítrico (NO) foi descoberto como um mediador químico liberado por células endoteliais e que causava vasodilatação. Reconhecido hoje como um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que tem sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio. Um gás que pode ser sintetizado enzimaticamente e regulado em diversos tecidos e tipos de células. Constitui um dos principais mediadores de processos intra e extracelulares. A quantidade produzida, o tempo de exposição, bem como de seus locais de síntese, são cruciais para determinação dos efeitos benéficos ou maléficos deste gás (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980; MORRIS; BILLIAR, 1994; BECKMAN; KOPPENOL, 1996; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

A síntese do NO é obtida a partir da L-arginina e oxigênio molecular através da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três tipos de NOS – endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) (Figura 4). A iNOS é induzida quando os macrófagos e outras células são ativadas por citocinas, por exemplo TNF- α , e outros agentes. Essas isoformas são diferentes em função da localização, da dependência no

aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico, se é induzível ou constitutiva, e a duração de ação. (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; NATHAN, 1997).

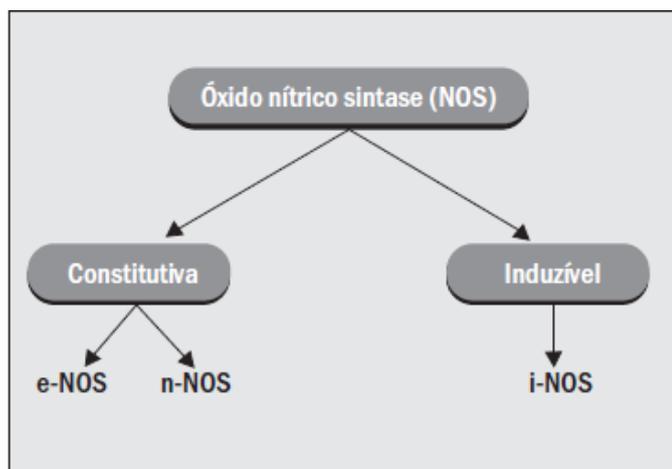


Figura 4. Isoformas de óxido nítrico sintase (NOS).

Fonte: DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003.

A expressão da enzima iNOS ocorre em diversos tipos celulares, os quais incluem macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos. Seu estímulo se dá após o contato das células com lipopolissacarídeos (LPS), citocinas (como $\text{IL-1}\beta$, $\text{TFN-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-6) e outros. O NO resultante da ativação desta enzima, possui ação citotóxica e citostática, promovendo ações antimicrobianas, antiparasitárias e antineoplásicas. A citotoxicidade do NO pode decorrer da ação direta através da reação com metais, como por exemplo, o ferro, contidas nas enzimas do seu alvo. Portanto, são inativadas enzimas importantes para o ciclo de Krebs, cadeia de transporte de elétrons, síntese de DNA e mecanismo de proliferação celular. (FORSTERMANN; KLEINERT, 1995; JAMES, 1995; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Nas infecções, células como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais ao serem ativadas, secretam concomitantemente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste em reagir com esses intermediários do oxigênio. A reação entre NO e ânion superóxido (O_2^-) gera a formação de peroxinitrito (ONOO^-), que tem grande potencial em oxidar proteínas. O ONOO^- pode reagir com o íon hidrogênio (H^+) e originar um radical muito reativo e tóxico, o hidroxil ($\text{HO}\cdot$), aumentando a efetiva ação do NO e do O_2^- . As células que produzem o NO e todas que estão seu redor, não estão livres da toxicidade dessa molécula, podendo ser danificadas ou destruídas. Tem sido visto que o NO contribui em diversas condições patológicas

tais como asma, artrite reumatóide, lesões ateroscleróticas, tuberculose, esclerose múltipla, Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

É mostrado em estudos que uma maior produção de NO é detectada no aparecimento precoce de diabetes, e que macrófagos desempenhando um papel protagonista. A produção de NO por macrófagos infiltrantes tem sido também implicada na glomerulonefrite inflamatória. (ROJAS *et al.*, 1996).

Recentes estudos têm sugerido que o óxido nítrico sintase induzível desempenha um papel-chave no processo de inflamação em tecido adiposo e infiltração de células imune na indução de resistência a insulina que ajuda no desenvolvimento de diabetes do tipo 2. A obesidade está ligada a um aumento do mRNA de expressão de óxido nítrico sintetase induzível, com a subsequente superprodução de óxido nítrico e de espécies reativas que levam a S-nitrosilação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização de insulina. Estas mudanças pós-translacionais diminuem a atividade das células e, podem levar à resistência à insulina. (TOUSKOVÁ; HALUZÍK, 2011)

Tem sido mostrado que os AGEs estimulam a expressão de óxido nítrico induzível (iNOS) em células endoteliais, em macrófagos murinos, e células RAW 264.7 e também pode ser um mediador importante envolvido na patogênese da nefropatia diabética. As altas concentrações de NO produzida por iNOS pode desempenhar um papel no desenvolvimento da aterosclerose. (TANJI *et al.*, 2000; SUMI; IGNARRO, 2004).

Foram detectados acúmulos de AGEs na área mesangial nos glomérulos dos rins de diabéticos, as quais foram associados a um aumento paralelo de óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), células positivas e intraglomerular e produção de NO^2/NO^3 (CHANG *et al.*, 2004). Em células de glioma foi visto que AGEs podem ativar uma proteína tirosina quinase para induzir a proteína quinase ativada por mitogênio MAPK p38, que por sua vez induz a expressão de iNOS. Sugeriu-se que a via de p38 da MAPK atua nos mecanismos de sinalização subjacentes à expressão de iNOS induzida por AGE em células mesangiais renais. (LIN *et al.*, 2001).

A secreção de fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento transformante- β (TGF- β) estimulados por AGEs, podem ativar a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e o fator nuclear kappa B (NF- κ B), induzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como a iNOS (BIERHAUS *et al.*, 1997).

3. MÉTODOS

3.1 Área

Os experimentos foram realizados na sala de cultura de células e tecidos do Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (DN/UFPE) e no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco (LCT/DHE/UFPE).

3.2 Método de Coleta

3.2.1 Cultivo celular de macrófagos

Para esse estudo, foram utilizados macrófagos da linhagem J774, que são células derivadas de camundongos Balb/c, J774.1 obtidas da clonagem de ascite e de tumores sólidos. Estas células foram fornecidas pela Prof^a Paloma Lys de Medeiros do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco (LCT/DHE/UFPE). As células foram preservadas em nitrogênio líquido (criopreservação) por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), um crioprotetor, e 90% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) (1 mL DMSO em 10mL de SFB) .

Para a realização dos ensaios *in vitro* as células foram descongeladas em banho maria a 37° C. Na iminência do descongelamento o material foi transferido para garrafas estéreis de cultura de tecidos de 75 cm² (TPP,-Biosystem, Curitiba, Brasil) contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), já aquecido a 37°C, suplementado com 10 % de SBF, 2 mM L-glutamina, 100U/mL penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, e levadas a estufa incubadora com gás carbônico (CO₂) a 5% e temperatura de 37° C até que as mesmas atingissem 80% confluência.

A suspensão contendo as células, então, foi coletada e centrifugada a 1200 rpm por 10 min para separação das células do meio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, 2mM l-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

3.2.2 Contagem de macrófagos

A suspensão de macrófagos foi contada com o auxílio de solução de azul de Tripán (0,4%) em hemocítômetro de Neubauer através de microscópio óptico.

3.2.3 Cultivo das células e tratamento com os produtos finais da glicação avançada

As células foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços (TPP, Cultilab, São Paulo, Brasil) e mantidas por 24 h em incubadora de CO₂ a 5% e temperatura 37°C para ambientação. Em cada poço foram pipetadas 0,05 x 10⁶ ou 0,025 x 10⁶ células por 100 µL de meio, para os ensaios de 24 ou 48 horas, respectivamente.

Para estudar os efeitos do AGE sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular, foram definidos 01 grupo controle negativo constituído de macrófagos não tratados, 01 grupo positivo, constituído de macrófagos não tratados e ativados com LPS e 05 grupos experimentais negativos, constituídos de macrófagos tratados com AGE em diferentes concentrações e 05 grupos experimentais positivos, constituídos de macrófagos tratados com AGE em diferentes concentrações ativados com LPS.

Os macrófagos J774 foram incubados com BSA-AGE (MERCK-MILLIPORE, SP, Brasil) preparada em meio contendo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) suplementado com 2mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) nas concentrações de 15, 30, 60, 120 ou 240µg/mL (HELTIANU *et al.*, 2008) por 24 ou 48 horas. Cada grupo foi constituído por 6 poços com macrófagos por tratamento em três experimentos independentes. Após cada tempo de incubação o sobrenadante foi descartado e a monocamada de células foi estimulada com 100ng/mL lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) preparado em água destilada. Para os grupos controle e experimentais negativos foi adicionado meio contendo DMEM suplementado com 2mM l-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil).

3.2.4 Mensuração de NO

Após 24 horas de incubação com LPS os sobrenadantes das culturas foram coletados e a análise da produção de NO foi realizada através de método colorimétrico

quantitativo baseado na reação de Griess (DING *et al.*, 1988), e os resultados foram expressos em μM .

No método colorimétrico quantitativo baseado na reação de Griess foram utilizadas alíquotas de 100 μL dos sobrenadantes de cultura incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com 100 μL de reagente de Griess imediatamente preparados (50 μL de sulfanilamida a 1% e 50 μL naftiletileno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%). A absorbância foi mensurada a 540 nm por leitor de microplaca.

A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão construída com nitrato de sódio nas concentrações de 0-100 μM . Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco correspondente a DMEM incubado por 24 h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células.

3.2.5 Análise da viabilidade celular

A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- brometo de difeniltetrazólio (MTT) ao formazam como descrito em Mossman (1983). As células foram incubadas com 10 μL de MTT/mL (5 mg/ml) e meio de cultura (90 μL) em cada poço por 4 h em incubadora de CO_2 a 5% e 37°C. O formazam resultante foi solubilizado com 100 μL por poço de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS), incubados por 12 h à temperatura ambiente.

A quantificação do formazam solubilizado foi realizada por leitor de microplaca a 540 nm. Os resultados foram expressos em absorbância de formazam.

3.3 Método de Análise Estatística

Foram utilizados para análise dos dados os parâmetros: média \pm erro padrão. A fim de verificar diferenças nos valores médios entre os grupos, foi utilizado o teste estatístico Two-Way ANOVA, seguido de teste Sidak, através do programa Sigma Stat versão 6 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Todos os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$.

4.1. EFEITO DOS PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO POR MACRÓFAGOS E NEUTRÓFILOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs— advanced glycation end products) compõem um grupo de compostos heterogêneos formados por processo químico não enzimático, irreversível, tido como reação de Maillard ou glicação. Envolve grupos amino livres de proteínas ou ácidos nucleicos e grupos carbonila de açúcares redutores e seus metabólitos reativos ou lipídeos oxidados. Dentre os poucos tipos de AGEs já identificados, a pentosidina e a carboximetil-lisina (CML) são os mais frequentes em humanos. A formação acelerada e o acúmulo dessas substâncias são um dos elementos que caracterizam a diabetes.¹⁻⁴

Os efeitos em que os AGEs estão envolvidos em muitas patologias estão relacionados à capacidade destes compostos modificarem propriedades químicas e funcionais das diversas estruturas biológicas, como também de causar o aumento da expressão de mediadores inflamatórios e alterações morfofuncionais, através de interações com receptores celulares e da formação de ligações cruzadas com proteínas⁵. O aumento da formação dessas biomoléculas, da expressão de seu receptor (RAGE), e da produção de espécies reativas do oxigênio, tem aumentado o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes, pontos cruciais para a patogênese da diabetes e de suas complicações. Este estresse oxidativo desempenha um papel crucial na patogênese da diabetes e de suas complicações.⁶

As espécies reativas do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS) são conhecidas por desempenhar funções como parte do sistema imune inato no combate às bactérias, e quando em altas concentrações, também pode induzir efeitos deletérios, causando danos as estruturas biológicas. ROS e RNS podem reagir com diversos componentes celulares (proteínas, lípidos, e ácidos nucleicos), e provocar mudanças que podem ser reversíveis ou irreversíveis e também disfunção celular. É visto em estudos, que AGEs causam um desequilíbrio entre a produção de enzimas antioxidantes e ROS, e promovem o desenvolvimento de maior quantidade de ROS e RNS, como peroxinitrito, levando a um ciclo vicioso de estresse nitrosativo e mais danos as proteínas^{7,8}.

Os neutrófilos são leucocitos polimorfonucleares responsáveis pela defesa do organismo contra a invasão microbiana através da produção de ROS e RNS. Uma das

alterações funcionais que é vista em neutrófilos de pacientes diabéticos é o aumento da produção de superóxido, da adesão, da quimiotaxia, da fagocitose e das atividades oxidativa e bactericida. Além disso, condições hiperglicêmicas, também são responsáveis por incitar neutrófilos circulantes, causando inflamação e dano tecidual exagerado.⁹⁻¹⁴

Os macrófagos são células fagocíticas que exercem um papel importante nos mecanismos de defesa endógenos, e estão envolvidos no reconhecimento, degradação e remoção de AGEs. Tais células quando em contato com esses produtos tem expressado genes de dois receptores de LDL-oxidadas de grande importância: o receptor scavenger de classe A e o CD36. O aumento da expressão destes receptores leva a uma maior captação OxLDL, resultando na transformação de células espumosa na aterosclerose. A ativação de monócitos por albumina do soro humano-AGE (HSA-AGE) conduz à expressão de IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF)¹⁵.

Considerando que os AGEs ao entrar em contato com receptores (RAGE ou scavenger), atuam no reconhecimento e na ativação de macrófagos e neutrófilos. Esta ativação gera uma cascata de sinalização que podem causar estresse e danos em diversas complicações diabéticas e no envelhecimento. Portanto, o nosso objetivo é avaliar os efeitos dos produtos finais de glicação avançada sobre a produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio por macrófagos e neutrófilos, através de uma revisão sistemática.

MATERIAIS E METODOS

A revisão sistemática foi desenvolvida através da pesquisa de artigos de artigos científicos publicados nas bases de dados online PubMed (U.S. National Library of Medicine), MEDLINE (Literatura Internacional em Ciências da Saúde), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) Scielo (Scientific Electronic Library Online) e Cochrane Library, realizada entre agosto de 2013 a setembro de 2014, sem delimitação do ano de publicação.

A busca realizada, em português e inglês, utilizou o cruzamento do termo livre, produtos finais de glicação avançada, e dos descritores: macrófago; neutrófilos; espécies de oxigênio reativas, óxido nítrico; espécies reativas de nitrogênio, como descrito abaixo:

- Produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end products), macrófago (macrophage), espécies de oxigênio reativas (reactive oxygen species);
- Produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end products), macrófago (macrophage), óxido nítrico (nitric oxide);
- Produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end products), macrófago (macrophage), espécies reativas de nitrogênio (reactive nitrogen species);
- Produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end products), neutrófilos (neutrophils), espécies de oxigênio reativas (reactive oxygen species);
- Produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end products), neutrófilos (neutrophils), óxido nítrico (nitric oxide);
- Produtos finais de glicação avançada (advanced glycation end products), neutrófilos (neutrophils), espécies reativas de nitrogênio (reactive nitrogen species).

Para combinação do termo livre e dos descritores recorreu-se ao operador lógico “E” ou “AND” e assim selecionamos as publicações.

Como critérios de inclusão foram selecionados os artigos: (a) que utilizavam produtos finais de glicação avançada como estímulo para síntese de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio por macrófagos e/ou neutrófilos, de linhagem humana e/ou de animais experimentais, em ensaios *in vitro*; (b) os escritos nas línguas: portuguesa ou inglesa e (c) os disponíveis em meio eletrônico na íntegra.

Após a seleção dos artigos com base nos critérios de inclusão, foram excluídos: (a) as revisões de literatura, (b) os artigos repetidos e (c) dissertações e teses.

RESULTADOS

No total foram encontradas 215 publicações, sendo 124 na PubMed, 86 na MEDLINE, 04 no Cochrane Library, 01 no Lilacs e nenhum no Scielo. Após leitura e análise de todas as publicações foram excluídas 201, sendo 59 pelo não atendimento aos critérios de inclusão, 112 por repetição, 29 por serem revisão de literatura e 01 por ser tese. Ao final, 14 artigos atenderam a todos os critérios de inclusão para o estudo (Figura 1).

A tabela 1 mostra um resumo dos estudos selecionados, nos quais foram consideradas as seguintes variáveis: autor/ano da publicação, produto reativo; tipo de célula; AGE/concentração do AGE utilizada no meio e seu tempo de incubação; estimulante; inibidor; resultados; conclusão;



Figura 1 – Quantidade de artigos encontrados inicialmente e artigos selecionados para discussão.

Tabela 1 - Variáveis consideradas e descritas dos artigos seleccionados referentes ao efeito dos produtos finais de glicação avançada em macrófagos e neutrófilos.

Autor/ Ano	Produto reativo	Tipo de célula	AGE/ Concentração/ Tempo de incubação	Estimulante	Inibidor	Resultados	Conclusão
Rojas et al./1996 ¹⁶	Óxido Nítrico NO	Macrófago peritoneal murino	BSA-AGE/ 50, 100, 150, e 250 g/ml/ 0 a 48 hs	LPS IFN- γ	LNMMMA Anticorpo anti-TNF- α e IL-1	Foi observado um aumento dose e tempo dependente na produção de NO induzido por LPS e IFN- γ quando tratado com BSA-AGE durante 48h, sendo paralelo com o aumento no mRNA iNOS. A presença de anticorpos neutralizantes para IL-1 e TNF- α sugeriu que a regulação do NO não foi devido a mediadores pró-inflamatórios.	O aumento de NO pelo acúmulo de AGEs representa risco aumentado na progressão de doenças relacionadas com o diabetes.
Ramirez et al./1997 ²⁰	Superóxido (O₂⁻)	Macrófago peritoneal de rato	BSA-AGE/ 200 ou 500 μ l (20-50 mg/ml)/ 0 a 60 min	PMA	Aminoguanidina	BSA- AGE inibe parcialmente o éster de forbol dependente de produção de O ₂ ⁻ por macrófagos <i>in vitro</i> . O efeito inibidor é demonstrado pela aminoguanidina, que impede completamente o efeito de BSA-AGE <i>in vitro</i> .	Os dados sugerem que o AGE pode estar implicado no prejuízo do burst respiratório de macrófagos na diabetes, que pode contribuir para a diminuição da capacidade bactericida.
Bernheim, et al/2001 ²¹	Superóxido (O₂⁻)	Leucócito Polimorfonuclear (PMN) de humanos	BSA-AGE 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5,10, 20mg mL ⁻¹ / 15min	fMLP PMA	-	A produção de superóxido basal de PMN foi aumentada por AGE em uma forma dependente \pm da dose. Em contraste outro grupo de PMN foi estimulado com AGE dialisado (sem hidratos de carbono reativos) ocasionando a inibição de superóxidos por estas células.	AGE diminuiu a produção de superóxido, suprimindo o burst respiratório em PMN. Essa disfunção pode contribuir para aumentar a prevalência e gravidade da infecção bacteriana em pacientes diabéticos.
Wu et al./2002 ¹⁷	NO	Macrófago RAW 264.7	BSA-AGE/ 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 μ g/ml/ 0 a 48hs	-	Anti - MAPK, Anti - NF-kB Genisteína, Anti - PI 3-K, PDTC	BSA-AGEs estimularam aumento na produção de NO ₂ ⁻ e iNOS dependentes da dose e do tempo. Os efeitos do BSA-AGE foram bloqueados pelos inibidores MAPK, NF-kB, Genisteína, PI 3-K, PDTC.	BSA-AGEs podem ativar o NF-kB por cascata de sinalização de tirosina quinase, a PI3K, da PKC, e p38 MAPK, resultando na expressão de iNOS e consequente liberação de NO em macrófagos RAW 264.7.
Wong et al/2002 ²⁴	Espécies de Oxigênio Reativas (ROS)	Neutrófilo	AGE-HSA/ 10, 50, 100,200, 400 e 800 μ g/ml/ 0 a 30min	fMLP PAF TNF- α	-	AGEs exerceram um aumento dose dependente sobre o burst respiratório de neutrófilos em resposta a um estímulo mecânico secundário, e ao fMLP. E esse processo pode ser reversível. Ambos TNF- α e PAF potencializaram o burst respiratório.	Através da sua ação co-agonistas, os neutrófilos, tem sido demonstrado que os AGEs podem desempenhar um papel fundamental na indução de um estado de aumento do estresse oxidativo por meio de aumento da produção de ROS por neutrófilos, e estes podem ser em parte responsável pela aceleração da doença vascular observado nestas condições

Urata et al./ 2002 ²⁶	Espécies de Oxigênio Reativas (ROS)	Macrófago RAW 264.7	CML-BSA; AGE-BSA/ 50,100,200, 400 µg/ml/ 0 a 25hs,	-	PD98059, NAC, NaBH ₄ , Trolox (vit. E)	CML-BSA e BSA-AGE estimularam a formação de ROS e concomitantemente a atividade do DNA da AP-1 e esta induziu a expressão de mRNAs VEGF. As vias Ras/ Raf/ MEK/ ERK1/2 estão envolvidas na transcrição da AP-1. A indução de mRNA de VEGF por AGE-BSA foi parcialmente inibida por antioxidantes.	Os AGEs induzem a expressão de RNAm VEGF mediado por AP-1 afetando na mitogênese das células endoteliais e da permeabilidade celular. A estratégia terapêutica para eliminação de ROS mediado por AGEs na progressão de complicações diabéticas foi sugerido.
Subramaniam et al/ 2002 ²⁷	Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)	Macrófago RAW 264.7	BSA-AGE; GO-AGE, MGO-BSA 10µM/ml/ 60min, 24hs	-	-	As células tratadas com BSA-AGE demonstraram um aumento aparente em comparação com a oxidação de BSA controle. Quanto a reatividade do agente glicante, o mais fraco foi o BSA-AGE gerado pela glicose, e a mais forte com BSA modificado por oxaldeído. O MGO-BSA aumentou a afinidade para Cu ⁺⁺ e Ca ²⁺ , mas foi semelhante à albumina. O MGO-BSA induz estresse oxidativo intracelular através de vias mediadas pelo receptor.	Estes estudos revelam ressalvas importantes do ensaio diclorofluoresceína amplamente utilizado, porem se sugere outros métodos são necessários para avaliar com precisão o estresse oxidativo celular na presença de albumina nativa ou modificada
Wu et al./ 2003 ¹⁸	NO	Macrófago RAW 264.7	BSA-AGE/ 30, 100, 300, 600 e 1000µg/ml/ 0 a24hs	-	Genisteína, U73122, D-609, Estaurosporina (Ro 318220), Go 6976.	A exposição de BSA-AGEs estimularam um aumento dose e tempo –dependentes na síntese e expressão de NO ₂ e iNOS. Os inibidores utilizados impediram a expressão de iNOS e a liberação de NO.	O BSA-AGE pode ativar a PKC e posteriormente induzir a expressão do iNOS e liberação de NO.
Milenkovic et al/ 2003 ¹⁹	NO	Micrógliia murina N-11	Aβ-AGE, Albumina de ovo da galinha (CEA-AGE)/ 25 µM, 1 ou 4 µM/ 24hs	LPS IFN- γ	-	A combinação de Aβ-fibrilação e Aβ-AGE com cada um dos co- indutores (CEA-AGE, LPS ou IFN- γ) resultou em uma regulação positiva sinérgica da síntese de NO. Aβ-AGE pode amplificar a produção de NO de 2 a 7 vezes na presença de outros indutores neuroinflamatórios	Estes dados sugerem que as terapias podem atingir os sinais pró-inflamatórios, pela inibição da formação de AGE com inibidores de AGE ou disjuntores de ligações-cruzadas, como tenilsetam ou ALT-711, ou Aβ como potenciador pró-inflamatório.
Wong et al/ 2003 ²⁵	Espécies de Oxigênio Reativas (ROS)	Neutrófilo	AGE-HSA/ 50, 100, 200, 400,800 µg/ml/ 0 a 30min	fMLP	MK-886 Indometacina MAFP Mepacrine cPLA ₂ NAC	O ácido araquidônico (AA) em si parece mediar o burst respiratório de neutrófilos aumentado por AGE. Os inibidores da ciclooxigenase e lipoxigenase, não distorcem o efeito do AGE. O AA é gerado por cPLA ₂ onde sua síntese é estimulada pela via sensível à redox que é ativado pelo AGE.	Os AGEs podem desempenhar um papel fundamental na indução de um estado de aumento do estresse oxidativo por meio de aumento da produção de ROS por neutrófilos, e este pode ser em parte responsável pela aceleração da doença vascular observada nestas condições.
Wang et al/ 2007 ²³	Espécies de Oxigênio Reativas (ROS)	Microglia de ratos Sprague Dawley	AGEs/ 500µg/ml/ 24hs	-	Sinomenine	AGEs induziram uma liberação significativa de TNF-α, IL-1β, IL-6 e ROS na microglia da retina. Sinomenine diminuiu a produção de ROS em uma forma dose-dependente e reduziu a translocação nuclear de NF-κB em microglia ativada por AGEs em cultura.	Sinomenine desempenha um papel de modular a expressão induzida por AGEs e liberação de TNF alfa, IL-1 β, IL-6 na microglia em cultura via produção de ROS e translocação de NF-κB

Mahali et al/ 2011 ²	Intermediários Reativos de Oxigênio (ROI)	Macrófago U937, U373	AGE-HSA / 1, 5, 25, 50, 100, 200µ g/ml/ 0 a 72hs	-	NAC, Vit. C PDTC CsA, BAPTA-AM, anti-TNF Ab, anti-IL-8 Ab	AGE induz morte celular refratária aos antioxidantes. A IL-8 está envolvida na expressão de FasL mediada por AGE-HSA através do aumento de Ca ²⁺ e da atividade da calcineurina, que, leva à morte celular. AGE induz a formação de autofagossomo e isto conduz a uma proteção parcial da morte celular.	Este estudo tem imensa importância para ajudar a compreender o mecanismo de ação pelo qual AGE induz os seus efeitos deletérios, tais como a neurodegeneração em condições fisiológicas, especialmente em pessoas diabéticas e envelhecidas.
Pinto et al/ 2012 ²²	Espécies de Oxigênio Reativas (ROS)	Macrófago J774	AGE-albumina em 4 dias/ 2 mg/mL/ 0 a 18hs	-	DPI, Oligomicina, Aminoguanidina, Benfotiamina	Aumento da produção de ROS induzido por AGE-albumina em macrófagos, este aumento foi atribuído as atividades da NADPH-oxidase e do sistema mitocondrial. A geração de ROS foi tempo-dependente e associado com a redução de ABCA-1. A aminoguanidina impediu a elevação de ROS e restaurou o conteúdo de ABCA-1, já a benfotiamina apenas reduziu ROS.	AGE-albumina aumenta a expressão do receptor scavenger e a produção de ROS e diminui a expressão de ABCA-1 que está associada com o estresse oxidativo do sistema NADPH-oxidase e mitocôndrias. O anti-AGE e antioxidante (AMG e BF) diminuem a produção ROS podendo contribuir para a prevenção da aterosclerose em pacientes com diabetes.
Bansal et al/ 2012 ⁶	Óxido Nítrico (NO) Superóxido (O₂⁻)	Neutrófilo	AGE-HSA/ 50, 100, 200, 400,800 µg/ml/ 0 a 9hs	-	DPI Anti-RAGE Anticorpo IgG de coelho	AGE-HSA exerce aumento de ROS e de intermediários reativos de nitrogênio (RNI) dependentes da dose e do tempo, mediada através de NADPH-oxidase e da sintase óxido nítrico induzível (iNOS). A geração ROS e RNI foi inibida na presença de DPI. Além disso, o aumento da geração de ROS e RNI cessou quando as células foram incubadas com anti-RAGE sugerindo o envolvimento da interação AGE-RAGE.	Os AGEs podem desempenhar um papel fundamental na indução de estresse oxidativo através do aumento da geração de ROS e RNI por PMN e este pode ser em parte responsável pelo desenvolvimento de patologia diabética induzida por AGE.

PMN (Polimorfonuclear); NO (do inglês Nitric Oxide – Óxido Nítrico); ROS (do inglês Reactive Oxygen Species – Espécies de Oxigênio Reativas); iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzível); ROI (do inglês - Reactive Oxygen Intermediates – Intermediários Reativos de Oxigênio); BSA-AGE (do inglês Bovin Serum Albumin - Advanced Glycation End products – Albumina Sérica Bovina – Produtos Finais de Glicação Avançada); HSA-AGE (do inglês Human Serum Albumin – Advanced Glycation End products – Albumina Sérica Humana – Produtos Finais de Glicação Avançada); CML-BSA (do inglês Carboxymethyl-lysine – Bovin Serum Albumin – Carboximetil-lisina –Albumina Sérica Bovina); GO-AGE (do inglês Glyoxal–Advanced Glycation End products – Glioxal–Produtos Finais de Glicação Avançada); MGO-BSA (do inglês Methylglyoxal – Bovin Serum Albumin – Metilglioxal –Albumina Sérica Bovina); PMA (do inglês Phorbol 12-myristate 13-acetate – Forbol 12-miristato 13-acetato); MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases - Proteína-quinase ativadas por mitógenos); VEGF (Fator de crescimento endotelial -vascular); AP-1 (Apolipoproteína-1); Ca²⁺ (Cálcio); IL-8 (Interleucina-8); NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato-oxidase); Ras (família de proteínas relacionadas que é expressa ubiquamente em todas as linhagens de células e órgãos); Raf (família de três quinases serina / treonina-proteína específica que estão relacionados com oncogenes retrovirais); MEK (Quinase ativada por mitógeno da proteína quinase); ERK1/2 (quinases reguladas por sinais extracelulares); IL-1 β (Interleucina-1 beta); IL-6 (Interleucina-6); AA (Ácido Araquidônico); ABCA-1 (ATP-ligação cassette transportador ABCA 1 – conhecida como proteína reguladora de efluxo de colesterol); Aβ (Beta amiloide - aminoácidos que são crucialmente envolvidas na doença de Alzheimer); FasL (Ligante Fas - é um tipo de proteína transmembranar II que pertence ao fator de necrose tumoral); NF-kB (Fator nuclear kappa B); TNF-α (Fator de Necrose Tumoral - alfa); PAF (Fator de ativação de plaquetas); mRNA (RNA mensageiro); LNMMA (inibidor de todas isoformas de NOS); MK-886 (inibidor da proteína de ativação de cinco lipoxigenase); U73122 (inibidor da inositol fosfolipase C); D-609 (inibidor da fosfatidilcolina fosfolipase C); MAFP (Inibidor enzima fosfolipase A₂); cPLA₂(do inglês Cytosolic phospholipase A₂ .Fosfolipase A₂ Citosólica); fMLP (formil - Metionilada - Leucilo - Fenilalanina); PD98059 (inibidor de MEK); NaBH₄ (Boro-hidreto de sódio - agente redutor de aldeídos e cetonas para álcoois.); Trolox (anti-oxidante tal como a vitamina E); DPI (do inglês Diphenyleneiodonium – um inibidor da enzima NADPH-oxidase); Anti-RAGE (inibidor de Receptor de Produtos finais de glicação avançada); IgG (Imunoglobulina G); NAC (N-acetilcisteína – um antioxidante); Vit. C (Vitamina C); PDTC (Pirrolidina ditiocarbamato de amônio - inibidor de NF-kB); CsA (ciclosporina A – inibidor de calcineurina); BAPTA-AM (quelante de Ca²⁺ citosólico - inibidor de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem tipo L); anti-TNF Ab (inibidor de TNF Ab); anti-IL-8 Ab (inibidor de interleucina

8 Ab); AMG (Aminoguanidina); BF (Benfotiamina).

DISCUSSÃO

Os estudos selecionados foram publicados entre os anos de 1996 a 2012. Os macrófagos são responsáveis por reconhecer, degradar e remover os produtos finais de glicação avançada (AGEs)²⁶. Os neutrófilos junto aos macrófagos fazem parte da primeira linha de defesa contra bactérias, respondendo através da produção de radicais livres contra a invasão microbiana, contudo essa produção pode se tornar exacerbada em condições hiperglicêmicas e de exposição a AGEs, trazendo sequelas prejudiciais, como é visto em doença macrovascular²⁴. Em micróglias e neurônios, placas de proteínas extracelulares com AGEs têm o potencial para ativar vias intracelulares de transdução de sinal, que gera a produção de radicais livres e posterior liberação de citocinas. Esta ativação das micróglias é encontrada na doença de Alzheimer, e leva a uma maior produção de óxido nítrico (NO) e outras citocinas pró-inflamatórias que podem ser encontrados em níveis anormais em regiões do cérebro afetadas na doença de Alzheimer²⁸.

O NO foi a principal espécie reativa estudada, produzidas por macrófagos, micróglias e neutrófilos (em 35,71%, 5 dos 14 artigos) estimulados por AGEs. Segundo Rojas *et al* (1996), isto se dá de forma paralela ao aumento da expressão de iNOS. Em concordância com esse resultado, Wu *et al* (2002), encontraram também aumento significativo de NO e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Nesse trabalho, as vias que levavam à produção de NO através da ativação do NF- κ B foram elucidadas. A ativação do NF- κ B dispara a cascata de sinalização da tirosina quinase (PI 3-K, p38 MAPK e PKC)¹⁸. Em vários estudos^{16-18,6} a produção de NO foi dose e tempo dependente, ou seja, aumentava quanto maior a dose e/ou o tempo de incubação com esses produtos. No entanto, a dose de AGE estimulante e o tempo incubado com ele, para as células, não foi letal, mesmo havendo um aumento na produção de NO.

Classicamente, sabe-se que a resposta na produção de NO por macrófagos e micróglias é aumentada quando as células são incubadas com interferon gama (IFN- γ) e subsequentemente lipopolissacarídeo (LPS) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)²⁹. O LPS é o estímulo melhor caracterizado para indução de genes transcricionais codificadores de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1), quimiocinas (MCP-1, IL-8), e enzima (iNOS). Essa estimulação da síntese de iNOS, responsável pela produção de NO, é conhecida por ter um importante papel na proteção do hospedeiro contra a infecção, suprimindo os efeitos na proliferação de linfócitos e danos a outras

células normais do hospedeiro^{30,31}. O IFN- γ é conhecido como um agente que interfere na replicação viral. Sua estimulação em macrófago induz mecanismos antimicrobianos, tais como produção de espécie reativa do oxigênio (ROS) e NO, depleção de triptofano, e a regulação de enzimas lisossomais que promovem a destruição do microorganismo³². No estudo de Milenkovic *et al.* (2003) observou que em micróglia a produção de NO na presença de placas beta amiloide-AGE (A β -AGE) foi ampliada por estimulantes como o LPS e IFN- γ enquanto que no estudo de Rojas *et al.* (1996) o aumento de iNOS foi expressivo quando o macrófago foi incubado com AGE-BSA/LPS+IFN- γ quando em comparação ao LPS+IFN- γ ou AGE-BSA apenas. Desta forma, tem-se que AGE junto com LPS e IFN- γ potencializam a resposta inflamatória através de aumento significativo de NO. Em muitas doenças degenerativas, as implicações para células expostas a níveis elevados de NO podem variar de morte celular, a alterações na morfologia e função delas em condições crônicas¹⁹.

Bansal *et al.* (2012) e Pinto *et al.* (2012) evidenciaram em seus estudos que os AGEs quando em contato com neutrófilos e macrófagos induzem o aumento de ROS através da atividade exercida pela NADPH oxidase. O complexo enzimático NADPH oxidase é conhecido como a mais importante fonte de ROS em células fagocitárias, constituído por subunidades que estão situadas na membrana celular (gp91phox e p22phox) e no citosol (p47phox e p67phox). Quando estimulada, a sub-unidade citosólica p47phox é fosforilada e todo o complexo do citosol é translocado para a membrana constituindo a oxidase ativa para a produção de ROS³³. Wautier *et al.* (2001) destacaram a contribuição da ativação da NADPH oxidase, pelo qual AGE gerava intermediários reativos de oxigênio (ROI), constatando em seu estudo que quando estimulados por AGEs, o aumento da atividade da tromboplastina em macrófagos de camundongos com gp91phox ausentes era eliminada quando em comparação com macrófagos que tinham a subunidade gp91phox. Portanto, a atividade da NADPH oxidase é tida como uma das principais vias para produção de ROS.

Wong *et al.* (2003) demonstraram a existência da via da fosfolipase A₂ e de geração de ácido araquidônico, na qual os AGEs podem aumentar a atividade da NADPH-oxidase de neutrófilos. Através da ligação do AGE com o receptor haverá a geração de superóxido intracelular, que posteriormente ativará uma via redox sensível envolvendo uma ou mais proteína-quinases. Essa via resulta na ativação da Fosfolipase A₂ Citosólica (cPLA₂). A cPLA₂ hidrolisa o ácido araquidônico da membrana plasmática, que modifica a subunidade p47 da NADPH-oxidase aumentando a

eficiência funcional desse complexo. Isto é um dos destaques que tem contribuído para o estresse oxidativo vascular e doenças cardiovasculares presentes em indivíduos diabéticos.

Em seu estudo Mahali *et al.* (2011) forneceu pela primeira vez evidências que o AGE em doses de 100 µg/ml incubadas durante 48hs *in vitro*, causava 32% de morte celular, e esta se dava através de uma cascata de sinalização que envolve a liberação de interleucina -8. Esta via medeia uma resposta celular que induz a ativação da calcineurina, a translocação de NF-AT e expressão de FasL, e como resposta o AGE desgranula as enzimas proteolíticas e citocinas fazendo com que haja uma resposta inflamatória, e tardiamente esta ativa as caspases, para em sequência ocorrer a morte celular. Este estudo ainda sugeriu que a produção de ROI mediada por AGE pode causar a ativação de NF-κB, porém a morte celular mediada por AGE é independente do ROI. A produção de ROI por AGE é um evento precoce, mas a ativação de caspases aguarda a liberação do citocromo c da mitocôndria, e isto vai ocorrer muito depois. Este estudo foi de grande importância, pois foi possível entender que em concentrações (a partir de 100 µg/mL) e tempos consideráveis (a partir de 48hs) de exposição das células com essas substâncias, podem acarretar na morte celular. Desta forma, este trabalho esclareceu um dos possíveis mecanismos e efeitos citotóxicos dos AGEs, como é vista na neurodegeneração em pacientes diabéticos e em idosos.

Foi esclarecido em Pinto *et al.* (2012), que um dos efeitos causados por AGEs é a redução nos níveis do transportador ABCA-1. Esta redução se deve ao aumento da produção de ROS, gerada pela atividade da NADPH-oxidase, e essa redução é crescente ao longo do tempo que é incubado com os AGEs. Esse transportador desempenha um papel crucial na remoção do colesterol intracelular e no transporte reverso de colesterol realizado por macrófagos arteriais. Com esse trabalho, evidenciou-se que o acúmulo de lipídeos causado pelo aumento do fluxo de colesterol intracelular por AGEs pode conduzir a doenças como a aterosclerose.

Resultados opostos aos de Bansal *et al.* (2012), Pinto *et al.* (2012) e Wong *et al.* (2002) foram encontrados no trabalho de J. Bernheim, *et al.* (2001) e de Ramirez *et al.* (1997) onde houve inibição da produção de superóxido em neutrófilos e macrófagos estimuladas por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) ou formil-metionilada-leucilofenilalanina (fLMP). A inibição nos achados pode ser devido a uma ação inibitória sobre a atividade da NADPH-oxidase, causada pelo AGE através de uma disfunção ou intracelular, ou na via de sinalização da PKC, segundo o estudo de Bernheim *et al.*

(2001). E para Ramirez *et al* (1997) pode haver um papel fisiológico duplo em macrófagos para BSA-AGE, primeiro em função da sua concentração, a liberação de citocinas se dá em baixas concentrações e, segundo, a inibição da produção de ânion superóxido se dá em concentrações mais elevadas. Embora os mecanismos ainda não tenham sido identificados, este efeito dos AGEs pode ajudar a esclarecer, de certa forma, a frequência e gravidade da infecção bacteriana analisada em pacientes diabéticos, que possuem por inúmeros fatores a imunidade diminuída.

Foi mostrado em Bansal *et al.* (2012) a importância do receptor de AGE, o RAGE, que é fundamental para o reconhecimento dessas biomoléculas e está presente na membrana plasmática de neutrófilos. É sabido que os AGEs exercem o seu efeito através da interação com o receptor RAGE, e que ativam uma cascata de vias bioquímicas. Nesse estudo comprovou-se que com o uso do inibidor (anti-RAGE), houve o bloqueio do RAGE, e conseqüentemente reduções significativas na produção de ROS e NO, deixando claro que o envolvimento de AGEs com RAGE na produção de ROS e NO por neutrófilos é essencial. Além disso, o desenvolvimento da aterosclerose é acelerado pelo eixo AGE/RAGE e que tem uma ampla gama de efeitos, que gera estresse oxidativo, aumenta a disfunção endotelial, a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1), tromboplastina e eleva a expressão de molécula de adesão (VCAM)³⁴.

Subramaniam *et al.* (2002) analisaram em seu trabalho, a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o estresse oxidativo gerados por AGEs, através do ensaio de diclorofluorocéina (DCF), que é um ensaio que tem sido utilizado em diversos estudos de diversas funções celulares, tais como a regulação do cálcio, a viabilidade celular, a proliferação celular, a função mitocondrial, potencial da membrana e ligação de anticorpo. Embora atividade pró-oxidante de MGO-BSA tenham sido documentados, para avaliar o estresse oxidativo intracelular na presença de albumina modificada ou não, é necessário outros métodos tais como microscopia confocal e ESR (do inglês Electron Paramagnetic Resonance- espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica), pois sozinho a DCF pode gerar falsos positivos e um potencial de interferência que pode ser causada pela autofluorescência da proteína.

Urata *et al.* (2002) sugerem que a indução de VEGF por AGEs é mediada por receptores de sinais e é estimulada por ROS. Visto que a indução de RNAm de VEGF por AGE-BSA foi inibida parcialmente por antioxidantes, e que essa participação de ROS na expressão de VEGF, não era mediada pela NADPH-oxidase, mas sim pelas

atividades de Ras / Raf / MEK / ERK1 / 2, e o AP-1. Portanto, os AGEs podem estar envolvidos com a capacidade dos macrófagos causar neovascularização e elevar a permeabilidade vascular em doenças como na microangiopatia diabética na retina ou do rim, e o tratamentos com antioxidantes, como o explicitado nesse estudo, podem ser uma possibilidade para melhoria dos danos causados por tais substancias.

Estratégias para reduzir os efeitos maléficos dos AGEs tem sido bastante estudadas na atualidade, entre os estudos selecionados para minimizar tais efeitos foram usados inibidores como a aminoguanidina^{20,22} e sinomenine²³, que mostraram ser bastante eficazes na restauração do transportador ABCA-1, e na inibição da produção de ROS e do NF-kB, e ambos já são bem utilizados em diversas patologias. Foram também empregados em algumas das pesquisas inibidores específicos moleculares como DPI, Oligomicina, Genisteina, inibidor de MAPK, NF-kB, , PD98059, PI 3-K, PDTC, MK-886, Indometacina, MAFP, Mepacrine, cPLA 2, U73122, D-609, Estaurosporina, Go 6976. BAPTA-AM, anti-TNF Ab, anti-IL-8, PDTC, CsA, LNMMA, anticorpo-TNF- α , anticorpo-IL-1, para que fossem evidenciadas as principais vias pelas quais os AGEs gerava a produção de ROS, RNS, e morte celular^{2,6,16-18,22,25,26}. Fez-se também o uso de antioxidantes como benfotiamina, trolox, vitamina C, NAC, NaBH₄, porem a inibição na maioria dos casos foi parcial^{2,22,25,26}.

CONCLUSÃO

Apesar da variedade dos métodos usados e falta de padronização, a maioria dos trabalhos selecionados sugeriram que os AGEs estão relacionados com o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio (ROS e RNS), sendo esta em sua maioria dependente da dose e do tempo. O aumento dessas espécies reativas pode estar envolvido nas diversas doenças relacionadas a complicações de diabetes e a doenças do envelhecimento. Porém, o uso de inibidores e de antioxidantes pode ser uma via alternativa que pode diminuir os danos causados por estes produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nedić O, Rattan SIS, Grune T, Trougakos IP. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. *Free Radic Res.* 2013; 47: 28–38.
2. Mahali S, Raviprakash N, Raghavendra PB, Manna SK. Advanced Glycation End Products (AGEs) induce apoptosis via a novel pathway involvement of Ca²⁺ mediated by Interleukin-8 protein. *J Biol Chem.* 2011; 286(40): 34903–34913.
3. Lapolla A, Piarulli F, Sartore G et al Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. *Diabetes Care* 2007; 30: 670–676.
4. Piwowar A, Knapik-Krdecka M, Szczecinska J, Warwas M. Plasma glycooxidation protein products in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 549–553.
5. Barbosa JHP, Oliveira SL.; Seara LT. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2008; 52(6): 940-950.
6. Bansal S, Siddarth M, Chawla D, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro. *Mol Cell Biochem* 2012; 361: 289–296.
7. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Santos AN, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014; 2: 411–429.
8. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 2015; 5(2): 472-484.
9. Karima M, Kantarci A, Ohira T, Hasturk H, Jones VL, Nam BH, Malabanan A, Trackman PC, Badwey JA, Van Dyke TE. Enhanced superoxide release and elevated protein kinase C activity in neutrophils from diabetic patients: association with periodontitis. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 862–870.
10. Hand WL, Hand DL, Vasquez Y. Increased polymorphonuclear leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 76: 44–50.
11. Gupta A, Tripathi AK, Tripathi RL, Madhu SV, Banerjee BD. Advanced glycosylated end products mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* 2007; 44: 373–378.

12. Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, Schmidt AM, Stern DM, Al-Mohanna FA, Kate S. RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol* 2002; 71: 433–444.
13. Anderson B, Goldsmith GH, Spagnuolo PJ. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus: the role of cellular and plasma factors. *J Laboratory Clin Med* 1988; 111: 275-285.
14. Brayton RG, Stokes PE, Schwartz MS, Louria DB. Effect of alcohol and various disease on leukocyte mobilization, phagocytosis and intracellular bacterial killing. *N Engl J Med* 1970; 282: 123-128.
15. Goldin ABA, Beckman JAMD, Schmidt AMMD, Creager MAMD. Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*. 2006; 114: 597-605.
16. Rojas A, Caveda I, Romay C, Lopez E, Valdes S, Padron J, Glaria L, Martinez O, Delgado R. Effects of advanced glycation end products on the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 225(2): 358-62.
17. Wu CMH, Chien HL, Yuan SH, Chien MC, Horng ML. Advanced glycosylation end products induce NF-kB dependent iNOS expression in RAW 264.7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 194(1-2): 9 – 17.
18. Wu CMH, Chien HL, Yuan SH, Chien MC, Horng ML. Role of protein kinase C in BSA-AGE-mediated inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66(2): 203–12.
19. Milenkovic JV, Stefanovic SD; Conrad WD, Gartner U, Munch G. b-Amyloid peptide potentiates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, interferon -g and ‘advanced glycation endproducts’ in a murine microglia cell line. *Eur J Neurosci*. 2003; 17: 813–821.
20. Ramirez R, Bedoya FJ, Chiara MD, Sobrino F. Inhibitory Effect Of Albumin-Derived Advanced Glycosylation Products On Pma-Induced Superoxide Anion Production by Rat Macrophages. *Life .Sci* 1997; 60(25): 2279-2289.
21. Bernheim J, Rashid G, Gavrieli R, Korzets Z, Wolach B. In vitro effect of advanced glycation end-products on human polymorphonuclear superoxide production. *Eur J Clin Invest*. 2001; 31: 1064-1069.

22. Pinto RS, Castilho G, Paim BA, Lima AM, Inada NM, Nakandakare ER, *et al.* Inhibition of Macrophage Oxidative Stress Prevents the Reduction of ABCA-1 Transporter Induced by Advanced Glycated Albumin. *Lipids* 2012; 47: 443–450.
23. Wang AL, Li Z, Yuan M, Yu ACH, Zhu XA, Tso MOM. Sinomenine inhibits activation of rat retinal microglia induced by advanced glycation end products. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1552–1558.
24. Wong RK, Pettit AI, Davies JE, *et al.* Augmentation of the neutrophil respiratory burst through the action of advanced glycation end products: a potential contributor to vascular oxidant stress. *Diabetes*. 2002; 51: 2846–2853.
25. Wong RKM, MA MRCP, Andrew I. Pettit, BSc, MRCP; Quinn PA, Jennings, HNC; Joan E. Davies, PhD, FRCP; Leong L. Ng, MD, FRCP. Advanced Glycation End Products Stimulate an Enhanced Neutrophil Respiratory Burst Mediated Through the Activation of Cytosolic Phospholipase A2 and Generation of Arachidonic Acid. *Circulation* 2003; 108: 1858-1864.
26. Urata Y, Yamaguchi M, Higashiyama Y, Ihara, Y, Goto S, Kuwano M, Horiuchi S, Sumikawa K, Kondo T. Reactive Oxygen Species Accelerate Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Advanced Glycation End Products in RAW 264.7 Mouse Macrophages. *Free Rad Biol & Med* 2002; 32(8): 688–701.
27. Subramaniam R, Fan XJ, Scivittaro V, Yang J, Ha CE, Petersen CE, *et al.* Cellular Oxidant Stress and Advanced Glycation Endproducts of Albumin: Caveats of the Dichlorofluorescein Assay. *Arch of Bioch and Bioph* 2002; 400 (1): 15–25.
28. Stolzing A, Widmer R, Jung T, Voss P, Grune T. Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40: 1017 – 1027.
29. Kamijo R, Shapiro D, Le J, Huang S, Aguet M, Vilcek J. Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon γ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 6626-6630.
30. Masmacking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15: 323–350.
31. Guha M, N. Mackman. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal*. 2001; 13: 85.
32. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004; 75(2): 163-89.
33. Babior, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464–1476

34. Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280(5): E685–94.
35. Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 165–197.

4.2 EFFECT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ON THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND VIABILITY OF J774 MACROPHAGE.

1. INTRODUCTION

The advanced glycation end products (AGEs) are a heterogeneous group of compounds produced in food or biological systems by the non-enzymatic reaction involving reducing sugars and metabolites reactive with lipids or proteins or nucleic acids, known as Maillard reaction or glycation^{1,2}. The formation and accumulation of these substances is shown at an accelerated rate in diabetic conditions³.

The biological effects of AGEs are varied, and can modify the function of proteins triggering changes and consequent injury to tissues. These changes favor the formation of free radicals and induce inflammatory responses when these biomolecules bind to receptors for advanced glycation end products (RAGE) present in the plasma membrane of many cell types. Hyperglycemia and thermally processed food intake increase the production of biomolecules of this class, which participate in the complications of diabetes installation mechanism⁴⁻⁶.

The macrophages together with neutrophils represent the first line of host innate immune defense response after epithelial barrier. They are involved in many processes such as repair of tissue damage, removal of damaged cells, senescent or apoptotic neoplastic cell recognition⁷. Furthermore, the modified proteins remove AGEs through the RAGE receptor. This interaction of AGEs with RAGE in macrophages can induce a variety of response as chemotaxis, cell activation, secretion of cytokines and growth factors⁸.

Nitric oxide (NO), a highly labile and diffusible gas produced during activation of the classical pathway of macrophages. It is produced from L-arginine and oxygen

from the reaction catalyzed by the enzyme nitric oxide synthase (NOS)⁹. Its bactericidal function takes place in two ways: directly, inactivating enzymes present in the microorganisms, and indirect, producing oxidant molecules that interact with proteins causing toxic effect on the cells¹⁰. The high concentrations of NO produced by iNOS can play a role in the development of atherosclerosis¹¹.

Therefore, the present study was to evaluate the effect of advanced glycation end products of NO production and J774 macrophage viability.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 J774 Macrophages Cell culture

The J774 cells were provided by Prof. Paloma Lys de Medeiros Tissue Culture Laboratory of the Department of Histology and Embryology at the Federal University of Pernambuco (LCT / DHE / UFPE). Cells were preserved in liquid nitrogen (cryopreservation) with 10% of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) a cryoprotector, and 90% fetal calf serum (FCS - Invitrogen, Life Technologies of Brazil Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil) (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) (1 mL DMSO in 9 mL FBS).

For the realization of in vitro assays, cells were thawed in water bath at 37°C. On the verge of thawing, the material was transferred to sterile tissue culture bottles of 75 cm² (TPP, -Biosystem, PR, Brazil) containing DMEM culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma-Aldrich, SP, Brazil), already heated to 37°C, supplemented with 10% FBS, 2mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100µg / mL streptomycin, and taken to the incubator at a temperature of 37° C in 5% CO₂ to grow until they reached 80% confluence.

The suspension containing the cells was then collected and centrifuged at 1200 rpm for 10 min to separate the medium from the cells. After centrifugation, the supernatant was discarded and the precipitate resuspended in 10 mL DMEM supplemented with fetal calf serum at 10%, 2mM L-glutamine, 100 U / mL penicillin and 100 µg / mL streptomycin (Sigma-Aldrich, SP Brazil).

2.2 Cell culture and treatment with advanced glycation end products

The cells were distributed into 96 well culture plates (TPP, CULTILAB, SP, Brazil) and brought to adhere for 24 hours in an incubator of 5% CO₂ at 37° C. In each well 0.05 x 10⁶ or 0,025 x 10⁶ cells will be present in 100 µL of medium, for tests with 24 or 48 hours, respectively.

It was defined 01 negative control group consisting of untreated macrophages, 01 positive group, consisting of macrophages untreated and activated with LPS and 05 negative experimental groups, made up of macrophages treated with AGE in different concentrations and 05 positive experimental groups, made up of treated macrophages with AGE in different concentrations activated with LPS.

The J774 macrophages were incubated with AGE-BSA (MERCK-MILLIPORE, SP, Brazil) prepared in medium containing DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma-Aldrich, SP, Brazil) supplemented with 2mM L-glutamine, 100 U / mL penicillin and 100 µg / mL streptomycin (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) at concentrations of 15, 30, 60, 120 or 240µg / mL for 24 to 48 hours. Each group consisted of 6 wells with macrophages by treatment in three independent experiments. After each incubation period, the supernatant was discarded and the cell monolayer was stimulated with 100 µg / mL lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli O55: B5 (Sigma-Aldrich, SP, Brazil) prepared in distilled water. For control and negative experimental groups was

added medium containing DMEM supplemented with 2mM L-glutamine, 100 U / mL penicillin and 100 µg / mL streptomycin (Sigma-Aldrich, SP, Brazil).

2.3 NO Measurement

In the quantitative colorimetric method based on the Griess reaction¹³, aliquots were used in 100µL of incubated culture supernatants at room temperature for 10 minutes with 100 µL of immediately prepared Griess reagent (50 µL of sulphanilamide the 1% and 50 µL naphthyl ethylene 0.1% in 5% orthophosphoric acid). The absorbance was measured at 540 nm by microplate reader. The concentration of nitrite was determined from a standard curve constructed with sodium nitrate in concentrations from 0-100 uM. All samples were evaluated against a blank corresponding to DMEM incubated for 24 h on plates of the same samples, but in the absence of cells.

2.4 Analysis of cell viability

The viability of macrophages was assessed by mitochondrial reduction of 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazam as described in Mossman (1983). Cells were incubated with 10 µL of MTT / ml (5 mg / ml) and culture medium (90 µL) in each well for 4 h in an incubator at 37°C and 5% CO₂. The resulting formazam was solubilized with 100 µL per well of sodium dodecyl sulphate at 10% (SDS), incubated for 12 h at room temperature. Quantitation of solubilized formazam was performed by microplate reader at 550 nm. The results were expressed as absorbance formazam.

2.5 Statistics Analysis Method

Were used for data analysis parameters: mean ± standard error. In order to verify differences in mean values between the groups, we used the statistical test two Way

ANOVA followed by Sidak test, through Sigma Stat version 6 software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). All results were considered significant at $P < 0.05$.

3. Results and Discussion

The result of the Griess assay showed that 24 hours of incubation with AGE at the highest concentrations (120 and 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$) potentiated the increase of NO production (nitrite) by J774 cells stimulated with LPS (Figure 1). The treatment for 24 hours also showed that AGE was able to increase NO production in macrophages not stimulated at concentrations of 60, 120 and 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Figure 1). Treatments with different concentrations (15, 30, 60, 120 or 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$) and BSA-AGE for 48 hours activated NO production in J774 cells without stimulation (Figure 1).

The MTT assay showed that 24 hours of incubation with AGE, except for the highest concentration (240 $\mu\text{g} / \text{ml}$, which showed a reduced viability) did not affect cell viability in J774 macrophages stimulated with LPS (Figure 2). In unstimulated cells, even at the highest concentration, no toxic effect of 24h treatment with AGE was seen on cell viability (Figure 2). The treatment of macrophages for 48 hours with AGE in the concentrations of 120 and 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$, without stimulation, showed a significant reduction in viability (Figure 2).

AGEs formed by high amounts of reducing sugars and proteins found mainly in the blood of diabetic patients, and the elderly can lead to dysfunction of several physiological functions¹⁵. The concentrations used in this study are close to those found in blood: patients with normal physiological functions (15 $\mu\text{g} / \text{ml}$), diabetic patients without complications (30 $\mu\text{g} / \text{ml}$), non-diabetic compensatory neuropathy (60 $\mu\text{g} / \text{ml}$) diabetic patients on hemodialysis (120 $\mu\text{g} / \text{ml}$)¹². Our data showed that AGE concentration as that found in diabetic patients using hemodialysis treatment may be subject to the effect of this substance both in increased NO production, as well as

significant reduction in the viability of macrophages. According to data from the US Renal Data System (USRDS), diabetics with ESRD suffer from higher mortality if treated by dialysis, and the impact of persistent toxicity of AGE, plays a crucial role in this mortality. Studies have shown that AGEs accumulated by dialysis patients can be toxic, and contributes to death from vascular complications of accelerated atherosclerosis¹⁶.

Our study demonstrated that the dose and the time when macrophages were exposed only to AGEs significantly influenced the increase in NO production. Studies show that AGEs activate specific pro-inflammatory pathways, resulting in upregulation of IL-1, IL-6, TNF- α , and expression of iNOS and consequent production of NO¹⁷⁻¹⁹. Similar to our studies Wu et al (2002) and Wu et al (2003) showed that nitrite production was increased in a dose and time dependent manner when RAW 264.7 cells were incubated with various concentrations of AGE-BSA. Moreover, these two studies demonstrated that it was through pathways such as nuclear factor kappa B (NF- κ B), and Protein Kinase C (PKC) which AGEs induce the expression of iNOS. Chang et al. (2004), mesangial cells also showed that increased NO production when incubated with the same concentrations found in AGEs study of Wu et al. (2002). These three studies have observed that iNOS expression was mediated through AGEs via that triggers the phosphorylation of protein tyrosine kinase p38 MAPK.

LPS is a wall component of gram negative bacteria known to stimulate macrophages to produce cytokines, and chemokines as well as NO²³. It was found in the current study that the highest concentrations of AGEs can enhance NO levels when J774 cells are stimulated by LPS. Ratifying with our results, Milenkovic et al. (2003) found that microglia had their production of NO amplified when they were stimulated with LPS for 24 hours in the presence of beta amyloid plaques and AGE (AGE-A β).

Studies confirm that one of the crucial factors for amplification of immunoinflammatory response of diabetics in front of a microbial infection in periodontal disease is the increase in AGEs and its relationship with its receptors^{25,26}.

In their study Rojas et al. (1996) confirms that the AGEs potentialize dependent of doses (50-250 $\mu\text{g} / \text{ml}$) NO production in murine macrophages when incubated for 48 hours and stimulated with LPS and IFN- γ . These data are contradictory to our findings, our treatment with AGE in various doses for 48 hours showed no significant increase of NO production in macrophages activated by LPS. Possible differences in results may be related to different types of AGE (manufacture) and cells as well as the addition of another stimulus such as IFN- γ .

The viability of cells that are treated with AGE may be dependent on parameters such as the type of AGE, the cell line, the conditions used for the tests, and also the viability assay used to detect²⁷⁻²⁸. Data from this study demonstrated that macrophages which were incubated with AGEs in concentrations of 120 and 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for 48 h without stimulation, as well as the concentration of 240 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for 24h stimulated by LPS, caused cell death in J774 macrophages. In accordance with our results, Mahali et al. (2011) saw U937 monocytes and U373astroglia when incubated in HSA-AGE for 48h caused cell death by apoptosis and that this took place through signaling cascades that involve the release of interleukin-8, activation of calcineurin, the translocation of NF -AT and FasL expression. Loske et al. (1998) showed that several types of AGEs in various concentrations incubated with BHK 21 (fibroblast) cells and SH-SY5Y (human neuroblastoma) causing cell death significantly and dose-dependently using the MTT assay, LDH, Neutral Red. Other studies have shown that AGEs, at even higher concentration did not affect cell viability when used the MTT test^{24,31}. They corroborate

our findings to which the cells treated by AGE (24h without LPS; 48 h with LPS) also did not change the viability of J774 macrophages.

The increased release of NO by macrophages may be associated with the cytotoxic effects and can cause death of producing cells and neighboring cells¹⁰. In neutrophils AGEs cause increased synthesis of NO and O₂⁻ generating other reactive radicals that may lead to oxidative damage in diabetic patients, and this may be one of the critical pathways in the pathology induced by AGE¹⁵. It has been suggested that ROS and RNS, can contribute to cytotoxicity mediated AGE³⁰. In degenerative diseases, the implications for cells exposed to high levels of NO, or when associated with ROS, may vary from cell death by apoptosis, alterations in the morphology and function of them in chronic conditions³². Our findings show that excessive increase of NO caused by AGE could be one of the pathways that lead to cell death or even damage that may result in decreased growth and cell functions.

We conclude from these results that the advanced glycation end products of may cause the increase in production of NO and reducing the viability of J774 macrophages. The high levels of concentration of AGE (120 and 240 µg / ml) and longer exposure time (48h) to these substances can influence the cytotoxicity. Thus, these results therefore support the relationship between AGE uptake and intracellular oxidative stress.

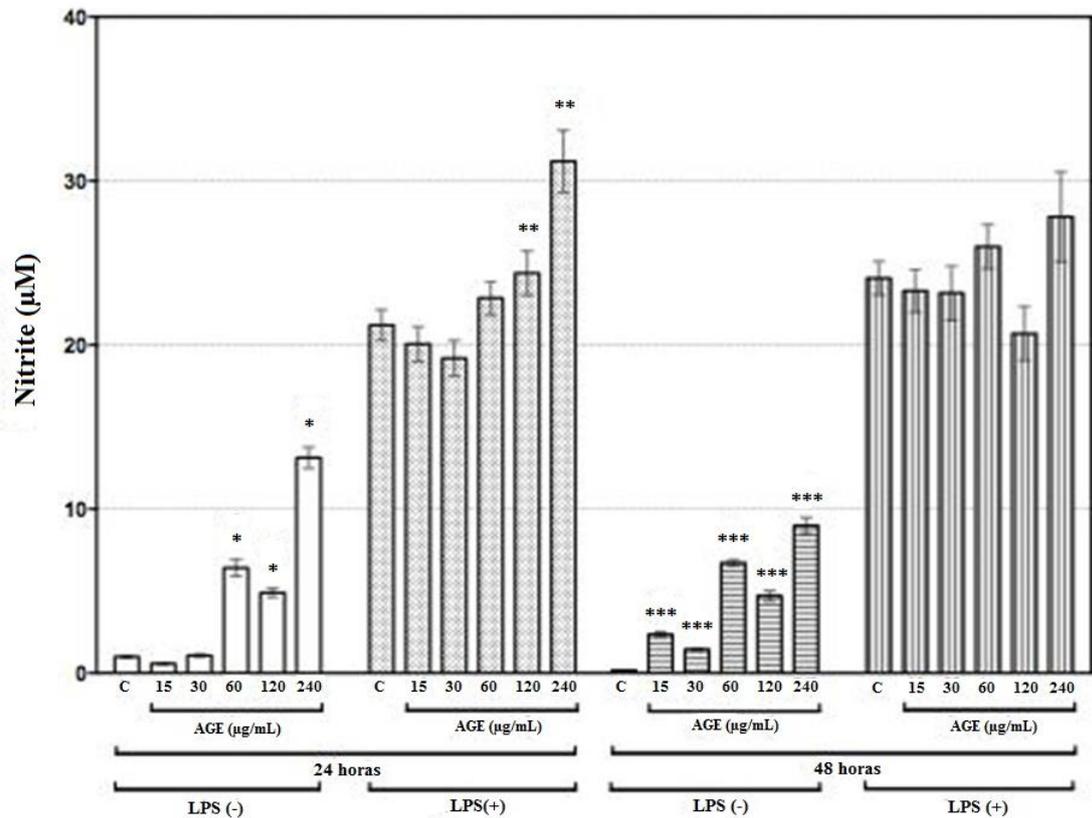


Figure 1. Effect of treatment with J774 macrophage AGE in varying concentrations for 24h or 48h on nitric oxide production in the absence or presence of stimulation by LPS. Cells were cultured in 96 well plates to 80% confluence, then were treated with AGE concentrations of 15, 30, 60, 120 or 240 µg / ml for 24 hours or 48 hours, and were then stimulated (or not) with LPS (100ng / ml). The production of NO was measured in the supernatant of cell cultures by the Griess reaction. Values are expressed as mean \pm standard error of three independent experiments. * $p < 0.05$ LPS without AGE 24h versus Control no LPS 24h; ** $p < 0.05$, AGE 24h LPS *versus* control 24h with LPS; *** $p < 0.05$, AGE 48 hours without LPS *versus* control 48 hours without LPS. Statistical differences among the experimental groups were determined by Two-way ANOVA followed by Sidak test.

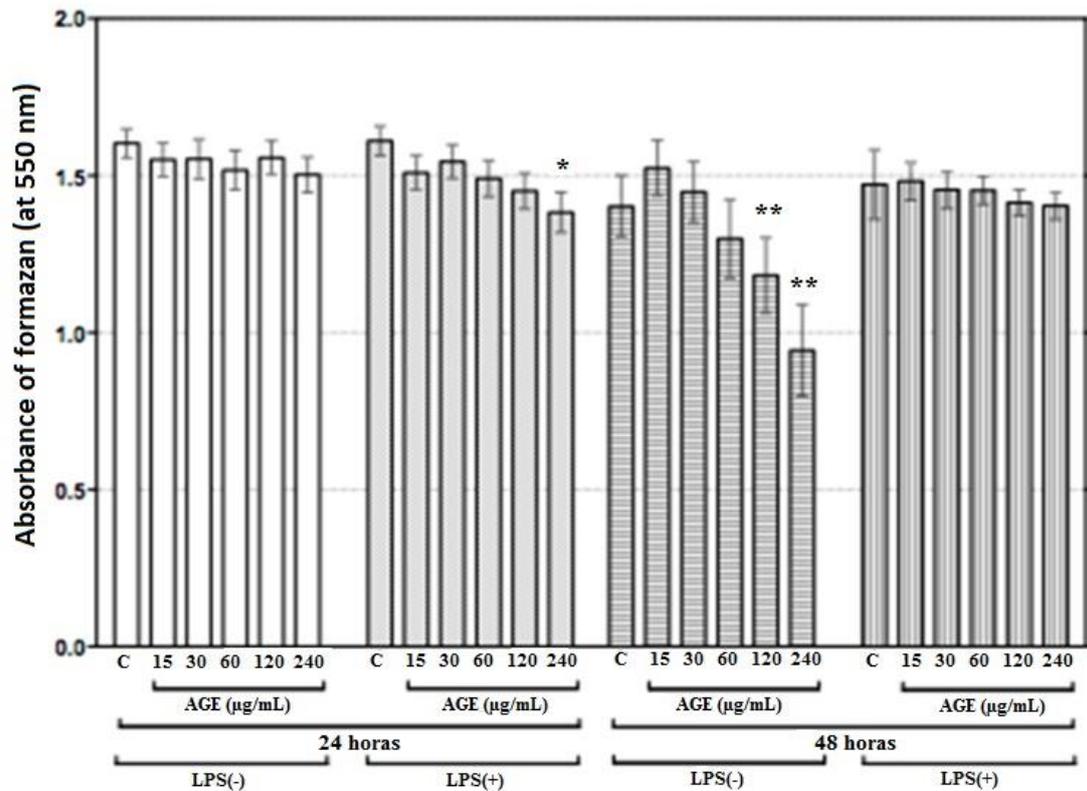


Figure 2. Effect of treatment with J774 macrophage AGE at different concentrations for 24h or 48h on cell viability in the absence or presence of LPS stimulation. Cells were cultured in 96 well plates to 80% confluence, then were treated with AGE concentrations of 15, 30, 60, 120 or 240 µg / ml for 24 hours or 48 hours, and were then stimulated (or not) with LPS (100ng / ml). Cell viability was assessed by the MTT method. Values are expressed as mean \pm standard error of three independent experiments. * $p < 0.05$, AGE 24 LPS versus control 24 with LPS; ** $p < 0.05$, AGE 48 hours without LPS versus control 48 hours without LPS. Statistical differences among the experimental groups were determined by Two-way ANOVA followed by Sidak test.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the technical assistance of Clovis Jose Cavalcanti Lapa Neto. This research was supported by the Higher Education Personnel Improvement Coordination—Brazil (CAPES). The authors certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

REFERENCES

1. Zhang X, Song Y, Han X, Feng L, Wang R, Zhang M, Zhu M, Jia X, Hu S. Licoiritin attenuates advanced glycation end products-induced endothelial dysfunction via RAGE/NF-kappa B pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2013; 374:191–201.
2. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, v. 419, n. 1, p. 1-15.
3. Xue J, Rai V, Singer D, Chabierski S, Xie J, Reverdatto S, Burz DS, Schmidt AM, Hoffmann R, Shekhtman A. Advanced glycation end product recognition by the receptor for AGEs. *Structure* 2011, 19:722–732.
4. Tan KCB, Chow WS, Lam, JCM, Lam, B, Bucala R, Betteridge J, Mary S.M. Advanced Glycation Endproducts in Nondiabetic Patients With Obstructive Sleep Apnea. *SLEEP* 2006, v. 29, n. 3
5. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiological Research*, v. 53, n. 2, p.131-142, 2004.
6. Jay D, Hitomi H, Griending KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(2):183-92.
7. Murphy PM, Bittar EE, Neville B. Phagocytes in immunity and inflammation, *Principles of Medical Biology*, 1996: 11. v. 6, p. 197-229.
8. Urata Y, Yamaguchi M, Higashiyama Y, Ihara Y, Goto S, Kuwano M, Horiuchi S, Sumikawa K, Kondo T. Reactive Oxygen Species accelerate production of Vascular Endothelial Growth Factor by Advanced Glycation End Products in RAW 264.7 Mouse Macrophages. *Free Radical Biology & Medicine* 2002., v. 32, No. 8, p. 688–701.
9. Roitt, I. M. & Delves, P. J. *Fundamentos de Imunologia*, 10^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010.

10. Dusse, LMS; Vieira, LM; Carvalho, MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Lab.* v. 39. N. 4. P. 343-350, 2003.
11. Sumi, D. & Ignarro, L.J. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Advanced Glycation End Product–Stimulated RAW 264.7 Cells. *Diabetes* 2004, v. 53, p. 1841- 1850.
12. Heltianu C, Manea SA, Guja C, Mihai C, Tirgoviste CI. Correlation of low molecular weight advanced glycation end products and nitric oxide metabolites with chronic complications in type 1 diabetic patients. *Cent. Eur. J. Biol.* 2008, v. 3, n. 3, p. 243–249. DOI: 10.2478/s11535-008-0019-4
13. Ding AH, Nathan, CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology* 1988, v.141, n.7, 1, p.2407-12.
14. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, v.65, p.55-63, 1983.
15. Bansal S, Siddarth M, Chawla D, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. Advanced glycation end products enhance reactive oxygen and nitrogen species generation in neutrophils in vitro. *Mol Cell Biochem* 2012; 361:289–296.
16. Friedman, EAMD. Advanced Glycosylated End Products and Hyperglycemia in the Pathogenesis of Diabetic Complications. *Diabetes Care* 22 (Suppl. 2) 1999: B65-B71.
17. Neumann A, Schizzel R, Palm, D, Riederer P, Munch G. High molecular weight hyaluronic acid inhibits advanced glycation endproduct-induced NF-kappa B activation and cytokine expression. *FEBS Lett.* 1999, 453, 283-287.

18. Akama, K.T. & Van Eldik, L.J. Beta-amyloid stimulation of inducible nitric oxide synthase in astrocytes is interleukin-1 β - and tumor necrosis factor- α (TNF- α) -dependant, and involves a TNF- α receptor-associated factor- and Nf kappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 7918–792.
19. Rojas A, Caveda I, Romay C, Lopez E, Valdes S, Padron J, Gllaria L, Martinez O, Delgado R. Effects of advanced glycation end products on the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *BiochemBiophys Res Commun.* 1996; 225(2): 358-62.
20. Wu CMH, Chien HL, Yuan SH, Chien MC, Horng ML. Advanced glycosylation end products induce NF- κ B dependent iNOS expression in RAW 264.7 cells. *Mol CellEndocrinol.*2002; 194(1-2): 9 – 17.
21. Wu,CMH, Chien HL, Yuan SH, Chien MC, Horng ML. Role of protein kinase C in BSA-AGE-mediated inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages.*BiochemPharmacol.* 2003; 66(2): 203–12.
22. Chang PC, Chen TH, Chang CJ, Hou CC, Chan P, Lee HM. Advanced glycosylation end products induce inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via a p38 MAPK-dependent pathway. *Kidney International* 2004, v. 65, p. 1664–1675.
23. Cruz-Machado, SS. Lipopolissacarídeo (lps): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF- κ B. *Revista da Biologia* 2010, v. 4 , p. 40-43.
24. Milenkovic JV, Stefanovic SD; Conrad WD, Gartner U, Munc HG. b-Amyloid peptide potentiates inflammatory responses induced by lipopolysaccharide, interferon - γ and ‘advanced glycation endproducts’ in a murine microglia cell line. *European Journal of Neuroscience* 2003; v.17, 813–821.

25. Lalla E, Lamster IB, Stern DM, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: Mechanisms and insight therapeutic modalities. *Ann Periodontol* 2001; 6(1):113-118;
26. Nassar H, Kantarci A, Van Dyke TE. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution in inflammation. *Periodontology* 2000 2007; 43: 233-244Mahali et al (2011).
27. Hoffmann, S., Friedrichs, U., Eichler, W., Rosenthal, A., Wiedemann, P., 2002. Advanced glycation end products induce choroidal endothelial cell proliferation, matrix metalloproteinase-2 and VEGF upregulation in vitro. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 240, 996–1002.
28. Bigl C, Schmitt A, Meiners I, Münch G, Arendt T. Comparison of results of the CellTiter Blue, the tetrazolium (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), and the lactate dehydrogenase assay applied in brain cells after exposure to advanced glycation endproducts.
29. Mahali S, Raviprakash N, Raghavendra PB, Manna SK. Advanced Glycation End Products (AGEs) induce apoptosis via a novel pathway involvement of Ca²⁺ mediated by Interleukin-8 protein. *J Biol Chem*. 2011; 286(40): 34903–34913.
30. Loske C, Neumann A, Cunningham AM, Nichol K, Schinzel R, Riederer P, Münch G. Cytotoxicity of advanced glycation end-products is mediated by oxidative stress. *J Neural Transm*. 1998;105(8-9):1005-15.
31. Schmitt, A., Bigl, K., Meiners, I., Schmitt, J. Induction of reactive oxygen species and cell survival in the presence of advanced glycation end products and similar structures. *Biochemica et Biophysica Acta – Cell Experimental Research* 2006; 1763: 927–936.

32. Wei, T., Chen, C., Hou, J., Xin, W. & Mori, A. Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1498, 72–79.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo os produtos finais de glicação avançada levaram ao aumento da produção de NO, e, além disso, causaram morte celular em macrófagos J774. As maiores concentrações de AGE (120 e 240 µg/mL) e um maior tempo de exposição (48h) a essas substâncias foram citotóxicas a essas células com alterações morfológicas consideráveis. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer outros mecanismos e possíveis terapias que eliminem os efeitos maléficos desses produtos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. & JANEWAY, C. A. JR. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. **Cell**, v. 100, p. 129-138, 2000.

AHMED N. Advanced glycation end-products-role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

ALBERTS, B. et al. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre: Artmed, p.866, 2006.

AMORE, A.; CIRINA, P.; MITOLS, S.; PERUZZI, L.; GIANOLIO, B.; RABBONE, I.; SACCHETTI, C.; CERUTI, F.; GRILLO, C.; COPPO, R. Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. **Kidney International**. v. 51, p.27–35, 1997.

ASO, Y. ; INUKAI, T. ; TAYAMA, K. ; TAKEMURA, Y . Serum concentrations of advanced glycation endproducts are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes . **Acta Diabetologica**, v. 37, p. 87 – 92, 2000.

BANSAL, S. ; CHAWLA, D. ; SIDDARTH, M. ; BANERJEE, B.D. ; MADHU, S.V. ; TRIPATHI, A.K . A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 109 – 114, 2013.

BAR, K.J.; FRANKE, S.; WENDA, B.; MULLER, S.; KIENTSCH-ENGEL, R.; STEIN, G.; SAUER, H. Pentosidine and *N*(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. **Neurobiology of Aging**, v. 24, p. 333-338, 2003.

BARBOSA JHP, OLIVEIRA SL.; SEARA LT. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do

Diabetes. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940-950, 2008.

BASSI, N. ; GHIRARDELLO A, IACCARINO L, ZAMPIERIA S, RAMPUDDA ME, ATZENI F, SARZI-PUTTINIB P, SHOENFELD Y, Dori A. OxLDL/ β 2GPI-anti-oxLDL/ β 2GPI complex and atherosclerosis in SLE patients. **Autoimmunity Reviews**, v.7, 1, p. 52–58, 2007

BASTA, G.; LAZZERINI, G.; DEL, T.S.; RATTO, G.M.; SCHMIDT, A.M.; DE, C.R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 1401-1407, 2005.

BASTA, G . Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications. **Atherosclerosis**; 196 : 9 – 21, 2008.

BECKMAN, J.S. & KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 1424-1437, 1996.

BIERHAUS, A.; HOFMAN, M. A.; ZIEGLER, R.; NAUROTH, P. P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v. 37, n. 3, p. 586-600, 1998.

BIERHAUS, A.; CHEVION, S.; CHEVION, M. et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappa B is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. **Diabetes**, v. 46, p. 1481–1490, 1997.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-820, 2001.

BUCALA, R. ; TRACEY, K. J. ; CERAMI, A . Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium- dependent vasodilatation in experimental diabetes . **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, p. 432 – 438, 1991.

BUCALA, R. ; MAKITA, Z. ; VEGA, G. ; GRUNDY, S .; KOSCHINSKY, T. ; CERAMI, A. *et al.* Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 9, p. 9441-9445, 1994.

BUCALA, R. ; MITCHELL, R. ; ARNOLD, K. ; INNERARITY, T. ; VLASSARA, H. ; CERAMI, A.. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 10828 – 10832, 1995.

CAI, Z. ; ZHAO, B. ; RATKA, A . Oxidative stress and β –amyloid protein in Alzheimer's Disease . **NeuroMolecular Medicine**, v. 13, p. 223 – 250, 2011 .

CARRANO, A. ; HOOZEMANS, J.J. ; VAN DER VIES, S.M. ; ROZEMULLER, A.J. ; VAN HORSSSEN, J. ; DE VRIES, H.J . Amyloid beta induces oxidative stress-mediated blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 1167– 1178, 2011.

CERAMI, C.; FOUNDS, H.; NICHOLL, I.; MITSUHASHI, T.; GIORDANO, D.; VANAPATTEN, S. *et al.* Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 25, p. 13915-13920, 1997.

CIPOLLONE, F.; IEZZI, A.; FAZIA, M. *et al.* The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: Role of glycemic control. **Circulation**, v. 108, p. 1070– 1077, 2003.

CHANG, P.C.; CHEN, T.H.; CHANG, C.J.; HOU, C.C. ; CHAN, P.; LEE, H.M. Advanced glycosylation end products induce inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via a p38 MAPK-dependent pathway. **Kidney International**, v. 65, p. 1664–1675, 2004.

CONTRERAS, C. L. & NOVAKOFSKI, K. C. Dietary advanced glycation end products and aging. **Nutrients**, v. 2, p. 1247-1265, 2010.

COOPER, G. M. & HAUSMAN, R. E. A célula – uma abordagem molecular. Porto Alegre: Artmed. p. 736, 2007.

DING, A. H.; NATHAN, C. F. *et al.* Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FLORA FILHO, R. & ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FORBES, J. M. ; SOLDATOS, G. ; THOMAS, M. C. Below the radar: advanced glycation end products that detour “around the side”. Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **Clinical Biochemist Reviews**, v. 26, n. 4, p.123-34, 2005.

FORSTERMANN, U. ; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 352, p. 351-64, 1995.

FURCHGOTT, R. F. ; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373, 1980.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHIMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p.597-605, 2006.

GORDON, S. Macrophage Function Disorders. Encyclopedia of Life Sciences 1: I-II, 2001.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 9–17, 2007.

GU, L.; HAGIWARA, S.; FAN, Q.; TANIMOTO, M.; KOBATA, M. ; YAMASHITA, M. ; *et al.* Role of receptor for advanced glycation endproducts and signalling events in advanced glycation end-product-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in differentiated mouse podocytes. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 299-313, 2006.

GUGLIUCCI, A.; BENDAYAN, M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. **Diabetologia**, v. 39, n. 2, p.149-160, 1996.

HELTIANU, C.; MANEA, S. A.; GUJA, C.; MIHAI, C.; TIRGOVISTE, C. I. Correlation of low molecular weight advanced glycation end products and nitric oxide metabolites with chronic complications in type 1 diabetic patients. **Central European Journal of Biology**, v. 3, n. 3, p. 243–249, 2008.

HENLE, T. AGEs in food: do they play a role in uremia? **Kidney International Supplements**, v. 63, n. 84, p.145-147, 2003.

HOFF, C. Immoral and moral uses of animals. **The New England Journal of Medicine**, v. 302, p. 115-118, 1980.

HUEBSCHMANN, A. G.; REGENSTEINER, J.G.; VLASSARA, H.; REUSCH, J. E. Diabetes and glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420-32, 2006.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.*, 59(4): 533-47, 1995.

JANEWAY, C. A. JR. & MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.

JAY, D.; HITOMI, H.; GRIENGLING, K. K. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 2, p. 183-192, 2006.

KANAUCHI, M. ; TSUJIMOTO, N. ; HASHIMOTO, T . Advanced glycation end products in nondiabetic patients with coronary artery disease . **Diabetes Care**, v. 24, p. 1620 – 1623, 2001.

KOIKE, A. ; MINAMIGUCHI, I. ; FUJIMORI, K. ; AMANO F. Nitric Oxide Is an Important Regulator of Heme Oxygenase-1 Expression in the Lipopolysaccharide and Interferon- γ -Treated Murine Macrophage-Like Cell Line J774.1/JA-4. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p. 7–16, 2015.

LAFFONT, I. ; SHUVAEV, V. V. , BRIAND O , LESTAVEL S , BARBIER A , TANIGUCHI N , et al . Early-glycation of apolipoprotein E: Effects on its binding to LDL receptor, scavenger receptor A and heparin sulfate . **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1583, p. 99 – 107, 2002.

LAM, J. ; HERANT, M. ; DEMBO, M ; HEINRICH, V. Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages. **Biophysical Journal**, v. 96, p. 248–254, 2009.

LAPOLLA A.; FEDELE D.; TRALDI P. Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 357, n. 2, p. 236-250, 2005.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **The American Journal of Pathology**, v. 78, p. 71–100, 1975.

LESLIE, R.D.; BEYAN, H.; SAWTELL, P.; BOEHM, B. O.; SPECTOR, T. D.; SNIEDER, H. Level of an advanced glycated end product is genetically determined. A study of normal twins. **Diabetes**, v. 52, n. 9, p. 2441-2444, 2003.

LI, J. ; LIU, D. ; SUN, L. ; LU, Y. ; ZHANG, Z . Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: Mechanisms and perspective . **Journal of the Neurological Sciences**, v. 317, n. 1 – 5, 2012 .

LIMA, R. R. ; COSTA, A. M. R. ; SOUZA, R. D. ; GOMES-LEAL, W. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LIN, C.H.; LIN, Y. F.; CHANG, M. C., et al. Advanced glycosylation end products induce nitric oxide synthase expression in C6 glioma cells: Involvement of a p38 MAP kinase-dependent mechanism. **Life Sciences**, v. 69, p. 2503–2515, 2001.

LIN, L. RAGE on the toll road? **Cellular & Molecular Immunology**, v. 3, n. 5, p. 351-358, 2006.

LIN, L.; PARK, S.; LAKATTA, E.G. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 1403-1413, 2009.

LORENZI, T.F. Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

MCNULTY, M. ; MAHMUD, A. ; FEELY, J . Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension . **American Journal of Hypertension**, v. 20, p. 242 – 247, 2007.

MEADE, S. J.; MILLER, A.G.; GERRARD, J. A. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 853-862, 2003.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, p. 394–397, 1997.

MOHAMED, A. K.; BIERHAUS, A.; SCHIEKOFER, S.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P.P. The role of oxidative stress and NF-kappa B activation in late diabetic complications. **Biofactor**, v. 10, p. 157-167, 1999.

MURRAY, P. J. & WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 723–737, 2011.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONNIER, V. M.; SELL, D. R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1043, p. 567–581, 2005.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.

MORRIS, S. M. JR. & BILLIAR, T. R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 266, n.29, p. E829-E839, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAKAJOU, K.; WATANABE, H.; KRAGH-HANSEN, U.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1623, p. 88– 97, 2003.

NAKAMURA, S.; TOBITA, K.; TACHIKAWA, T.; AKAMATSU, S.; OHNO, Y.; KAN, A., et al. Immunohistochemical detection of an AGE, a ligand of macrophage receptor, in peritoneum of CAPD patients. **Kidney International Supplements**, v. 84, p.152-157, 2003.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2417, 1997.

NEDIC, O.; RATTAN, S. I. S. ; GRUNE, T. ; TROUGAKOS, I. P. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 47, p. 28–38, 2013.

NOVELINO, A.; CHIAPPALONE, M.; VATO, A.; BOVE, M.; TEDESCO, M. B.; MARTIONIA, S. Behaviors from an electrically stimulated spinal cord neuronal network cultured on microelectrode arrays. **Neurocomputing**, v. 52, p. 661-669, 2003.

PARK, S.; CHOI, Y. S.; PARK, S.H.; KIM, Y.R.; CHU, H.; HWANG, K. J.; PARK, M. Y. Lon Mutant of Brucella abortus Induces Tumor Necrosis Factor-Alpha in Murine J774.A1 Macrophage. **Osong Public Health and Research Perspectives**; v. 4, n. 6, p. 301-307, 2013.

PARSLOW, T. G. *Imunologia médica*. 10ª Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

PEPPA, M.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products and diabetic complications: A General overview. **Hormones**, v. 4, n. 1, p. 28-37, 2005.

RALPH, P.; PRICHARD, J.; COHN, M. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. **Journal of Immunology**, v. 114, n. 2, p. 898-905, 1975.

RIEHL, A.; NÉMETH, J.; ANGEL, P.; HESS, J. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. **Cell Communication and Signaling**, v. 7, n. 12, p. 1-7, 2009.

ROITT, I. M. & DELVES, P. J. Fundamentos de Imunologia, 10ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010.

ROJAS, A.; CAVEDA, I.; ROMAY, C.; LOPEZ, E.; VALDES, S.; PADRON, J.; GLARIA, L.; MARTINEZ, O.; DELGADO, R. Effects of advanced glycation end products on the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 225, p. 358-362, 1996.

SEBEKOVÁ, K.; BLAZÍČEK, P.; SYROVÁ, D.; KRIVOSÍKOVÁ, Z.; SPUSTOVÁ, V.; HEIDLAND, A.; SCHINZEL, R. Circulating advanced glycation end product levels in rats rapidly increase with acute renal failure. **Kidney International Supplements**, v. 78, p. S58 – S62, 2001.

SELL, D. R. & MONNIER, V.M. Molecular basis of arterial stiffening: Role of glycation – A mini-review. **Gerontology**, v. 58, p. 227 – 237, 2012.

SATTARAHMADY, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.; AHMAD, F.; HAKIMELAHI, G.; HABIBI-REZAEI, M.; SABOURY, A, et al. Formation of the molten globule-like state during prolonged glycation of human serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 933–42, 2007.

SATTARAHMADY, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.; HABIBI-REZAEI, M. A Biophysical comparison of human serum albumin to be glycated in vivo and in vitro. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 30, p. 5-10, 2011.

SCHULZ, J. B. ; LINDENAU, J. ; SEYFRIED J , DICHGANS J . Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration . **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 4904 – 4911, 2000.

SPARVERO, L.J. ; ASAFU-ADJEI, D. ; KANG, R. ; TANG, D. ; AMIN, N. ; IM, J. et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands and their role in Cancer and Inflammation . **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 17, 2009 .

SRIKANTH, V. ; MACZUREK, A. ; PHAN, T. ; STEELE, M. ; WESTCOTT, B. ; JUSKIW, D. ; MÜNCH, G . Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer ' s disease . **Neurobiology of Aging**, v. 32, p. 763 – 777, 2011.

STOLZING, A.; WIDMER, R.; JUNG, T.; VOSS, P.; GRUNE, T. Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 1017 – 1027, 2006.

SUMI, D.; IGNARRO, L.J. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Advanced Glycation End Product–Stimulated RAW 264.7 Cells. **Diabetes**, v. 53, p. 1841- 1850, 2004.

SUZUKI, C. ; AOKI-YOSHIDA, A. ; KIMOTO-NIRA, H. KOBAYASHI, M. ; SASAKI, K. MIZUMACHI, K. Effects of strains of *Lactococcus lactis* on the production of nitric oxide and cytokines in murine macrophages. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1728-1737, 2014.

TAKEUCHI, O. & AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805–820, 2010.

TAKINO, J. ; YAMAGISHI, S. ; TAKEUCHI, M . Glycer-AGEs-RAGE signaling enhances the angiogenic potential of hepatocellular carcinoma by upregulating VEGF expression . **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 1781 – 1788, 2012.

TANJI, N.; MARKOWITZ G. S.; FU, C. *et al.* Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 1656–1666, 2000.

TOUSKOVÁ, V. & HALUZÍK, M. Insulin resistance and nitric oxide: molecular mechanisms and pathophysiological associations. **Ceskoslovenska fysiologie**, v. 60, n. 2, p. 40-47, 2011.

TUROVSKAYA, O . ; FOELL, D. ; SINHA, P. ; VOGL,T. ; NEWLIN, R. ; NAYAK, J. *et al* . RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis . **Carcinogenesis**, v. 29, p. 2035 – 2043, 2008.

URATA, Y. ; YAMAGUCHI, M. ; HIGASHIYAMA,Y. ; IHARA, Y. ; GOTO,S. ;KUWANO,M. ; HORIUCHI, S. ; SUMIKAWA, K. ; KONDO, T. Reactive Oxygen Species accelerate production of Vascular Endothelial Growth Factor by Advanced Glycation End Products in RAW 264.7 Mouse Macrophages. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 32, n. 8, p. 688–701, 2002.

VLASSARA H. & PALACE MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. **Journal of Internal Medicine**, v. 251, n. 2, p. 87-101, 2002.

VLASSARA, H. & PALACE, M. R. Glycooxidation: the menace of diabetes and aging. **Mount Sinai Journal of Medicine**. v. 70, n. 4, p.232-241, 2003.

VLASSARA, H.; BROWNLEE, M.; CERAMI, A. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 160, p. 197–207, 1984.

WAUTIER, M.P.; CHAPPEY, O.; CORDA, S.; STERN, D.M.; SCHMIDT, A.M.; WAUTIER, J.L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. E685-E694, 2001.

WEBSTER, L.; ABORDO, E. A.; THORNALLEY, P. J.; LIMB, G. A. Induction of TNF and IL-1 β mRNA in monocytes by methylglyoxal- and advanced glycated end product-modified human serum albumin. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, p. 250, 1997.

WU, C. M. H.; CHIEN, H.L., YUAN, S. H.; CHIEN, M. C.; HORNG, M. L. Advanced glycosylation end products induce NF- κ B dependent iNOS expression in RAW 264.7 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 194, p. 9 – 17, 2002.

WU, C. M. H.; CHIEN, H.L., YUAN, S. H.; CHIEN, M. C.; HORNG, M. L. Role of protein kinase C in BSA-AGE-mediated inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 203–212, 2003.

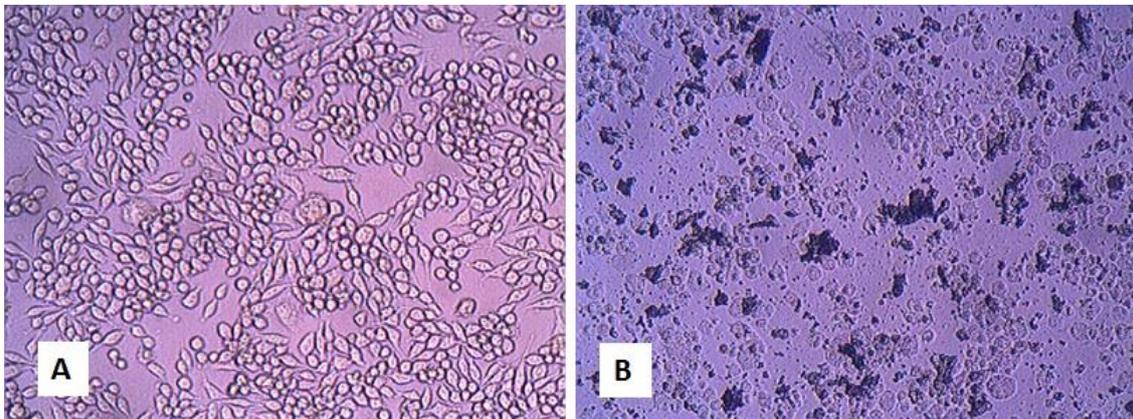
WYNN, T. A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 445–455, 2013.

YONEKURA, H.; YAMAMOTO, Y.; SAKURAI, S.; WATANABE, T.; YAMAMOTO, H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 97, n. 3, p. 305-311, 2005.

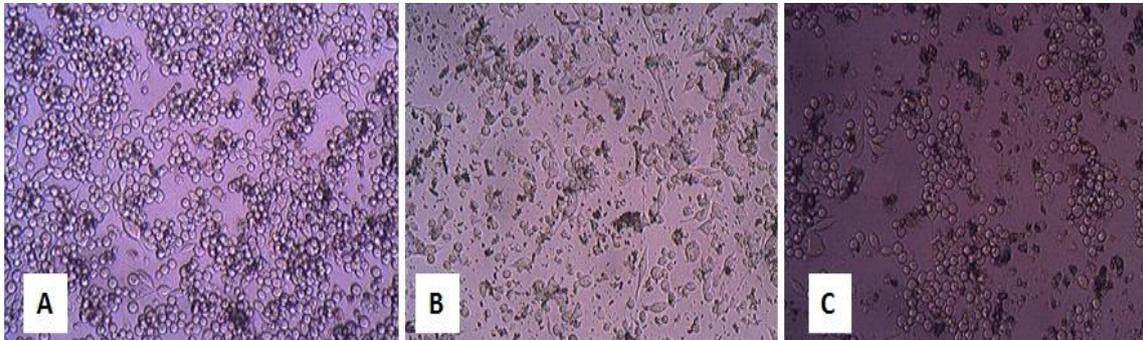
YOUNESSI, P.; YOONESSI, A. Advanced Glycation End-Products and Their Receptor-Mediated Roles: Inflammation and Oxidative Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 36, n. 3, p.154-166, 2011.

APÊNDICE

Apêndice 1. **A.** Células da linhagem J774 cultivados em DMEM + LPS por 24h. **B.** Células da linhagem J774 cultivados em DMEM + 240 µg/mL AGE + LPS por 24h. Aumento de 100 vezes.



Apêndice 2. **A.** Células da linhagem J774 cultivados em DMEM por 48h. **B.** Células da linhagem J774 cultivados em DMEM + 120 $\mu\text{g/mL}$ de AGE por 48h. **C** Células da linhagem J774 cultivados em DMEM + 240 $\mu\text{g/mL}$ AGE por 48h. Aumento de 100 vezes.



ANEXOS

Anexo A - Comprovante de submissão do artigo original à Revista *Archives of Endocrinology and Metabolism*

Archives of Endocrinology and Metabolism

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Archives of Endocrinology and Metabolism

Manuscript ID

AEM-2015-0269

Title

EFFECT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS ON THE PRODUCTION OF NITRIC OXIDE AND VIABILITY OF J774 MACROPHAGE

Authors

Rosas, Emanuela
Ribeiro, Fernanda
Oliveira, Erwelly
Medeiros, Paloma
Leandro, Carol
Lima, André
Senna, Sueli
Wylla, Wylla

Date Submitted

27-Aug-2015

[Author Dashboard](#)