

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO FISIOLÓGICA E DE CONCENTRAÇÕES PATOLÓGICAS DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS ATIVADOS

Fernanda Priscila Barbosa Ribeiro¹; Wylla Tatiana Ferreira e Silva²

¹Estudante do Curso de Nutrição – CAV - UFPE; E-mail: fernandapriscula24@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Nutrição – CAV – UFPE. E-mail: wyllatfs@hotmail.com.

Sumário: Os produtos finais de glicação avançada são produzidos nos alimentos ou em sistemas biológicos a partir de um processo químico não enzimático denominado reação de Maillard ou glicação. Sua produção é acelerada sob condições de hiperglicemia ou estresse oxidativo, estando envolvidos nas complicações do diabetes. O estudo investigou as consequências da concentração fisiológica e de concentrações patológicas dos produtos finais de glicação avançada sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular de macrófagos J774 ativados ou não por LPS. As células foram incubadas com AGE-BSA nas concentrações 15µg, 30µg, 60µg, 120µg, 240µg e em seguida foram expostas com LPS por 24h. Para mensurar a produção de óxido nítrico utilizou-se o método de Griess e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. As células submetidas ao tratamento com AGE apresentaram alterações na produção de NO e na viabilidade celular. O AGE estimula a produção de NO por macrófagos quando estes são ativados por LPS e há uma queda progressiva e discreta da viabilidade celular que pode ser consequência do aumento da produção de NO.

Palavras-chave: macrófago; óxido nítrico; produtos finais de glicosilação.

INTRODUÇÃO

Os produtos finais de glicação avançadas ou AGEs (Advanced Glycation End Products) são um grupo de compostos químicos distintos com ampla variação no peso molecular. São produzidos nos alimentos ou em sistemas biológicos a partir de um processo químico não enzimático denominado reação de Maillard ou glicação (MONNIER, 2003 apud BARBOSA, 2009). Esse processo envolve grupos carbonila de açúcares redutores ou lipídeos oxidados que reagem com grupo amina de um aminoácido livre ou de proteínas ou ácidos nucleicos. A glicação, evento que acontece in vivo, é desencadeada pela oxidação de lipídeos e da glicose, formando biomoléculas intermediárias altamente reativas (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). Os efeitos biológicos dos produtos de glicação avançada são variados, e podem modificar a função de proteínas desencadeando, assim, alterações e consequentes lesões em tecidos. Essas alterações favorecem a formação de radicais livres, e, conseqüentemente, induzem respostas inflamatórias quando essas moléculas se ligam a receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) presentes na membrana plasmática de vários tipos celulares. A hiperglicemia e a ingestão de alimentos termicamente processados aumentam a produção dessa classe de biomoléculas, as quais participam do mecanismo de instalação de complicações decorrentes do diabetes (TAN et al., 2002; JAKUS, 2009; BAYNES, 2002 apud BARBOSA, 2009, pag 3). Essas biomoléculas se ligam a receptores do tipo RAGE, que são proteínas transmembranares presentes em macrófagos, monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e astrócitos. O aumento da concentração de AGEs estimula a

expressão de RAGE. Esse complexo AGE-RAGE desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que leva a um aumento na transdução de citocinas pró-inflamatórias, promovendo inflamação aguda e crônica. Dessa forma, a ativação do RAGE tem implicação nos processos de envelhecimento, aterosclerose, neurodegeneração, artrite, diabetes e câncer (GOLDIN et al., 2006). O sistema imunológico está envolvido na iniciação e manutenção desses processos, e dentre as células do sistema imune inato, os macrófagos desempenham um papel fundamental. Os macrófagos representam, juntamente com os neutrófilos, a primeira linha de defesa do hospedeiro depois da barreira epitelial. Estão envolvidos nos mais diversos processos, tais como reparo de lesões teciduais, remoção de células lesadas, senescentes ou apoptóticas e reconhecimento de células neoplásicas. Outras funções dos macrófagos são formar de uma linha de defesa contra invasão microbiana e crescimento tumoral. Podem efetuar isto de maneira direta, envolvendo a liberação de produtos como radicais de oxigênio e fatores de necrose tumoral, que são utilizados no combate a microorganismos (MURPHY; BITTAR; NEVILLE, 1996; DELVES; ROITT, 2004). Um dos parâmetros avaliados durante a ativação de macrófagos é a produção de óxido nítrico (NO), um gás difusível produzido durante a ativação da via clássica. O NO é produzido a partir da L-arginina e do oxigênio em reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (ROITT; DELVES, 2004). Os AGEs estimulam a expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) quando se ligam nos receptores RAGE presentes nos macrófagos levando a um aumento na produção de NO. A liberação aumentada de óxido nítrico tem sido implicada em complicações diabéticas, pois em excesso, o NO tem ação citotóxica. O NO produzido por macrófagos tem ação citotóxica e citostática sobre agentes invasores, constituindo uma das mais importantes moléculas reguladoras do sistema imunológico. Sua atividade bactericida se dá de forma direta, quando este gás inativa enzimas presentes nos microorganismos, e de forma indireta, produzindo moléculas oxidantes que interagem com proteínas causando efeito tóxico sobre as células (DUSSE, 2003).

MATERIAS E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa experimental e comparativa com cultura de células do tipo macrófagos murinos J774.1, esta linhagem produz IL-1, elas foram incubadas com produtos finais de glicação avançada. Para estudar os efeitos do AGE sobre a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular, foram definidos 01 grupo controle, constituído de macrófagos não tratados e ativados com LPS e 05 grupos experimentais, constituídos de macrófagos tratados com AGE em concentrações 15mg, 30 mg, 60 mg, 120mg e 240 mg por 24h. Imediatamente após serem tratados com AGE, os macrófagos foram ativados através da adição de 1 microg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) preparado em PBS (PhosphateBuffered Saline; Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e foram incubados em estufa a 37°C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 24h para a mensuração da produção de óxido nítrico e da viabilidade celular. Para controle negativo, foi adicionado meio de cultura em alguns poços. A produção de NO será avaliada pelo método de Griess (Ding et al, 1998), o qual se baseia na mensuração de NO através da determinação de nitritos acumulados durante o período de incubação das células em cultura. Após 24 h de incubação das células, o sobrenadante (50 µL) foi misturado com volume igual do reagente de Griess (mistura de sulfanilamida a 1% e naftiletieno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%; Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Seguidos 10 min de reação à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada a 550 nm em leitor de microplacas. A concentração de nitrito foi calculada a partir dos dados de uma curva padrão de nitrito de sódio e os resultados de produção de NO foram expressos em nmol de nitrito/5x10⁶ células. Todas as amostras foram comparadas a um branco correspondente a DMEM incubado por

24h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT (brometo de tiazoliltetrazólio) (Mossman, 1993), o qual se baseia na mensuração da atividade das células vivas através da redução do MTT a cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais. O formazan é solubilizado e mensurado por espectrofotometria. Após 24 h de incubação, as células receberam 5µL de MTT (Sigma-Aldrich, SP, Brasil)/poço (0,5 mg/ml de PBS - Sigma-Aldrich, SP, Brasil) e 50µL de DMEM (Sigma-Aldrich, SP, Brasil)/poço e foram incubadas por 4h em temperatura ambiente. A seguir, os cristais de formazan resultantes foram solubilizados pela adição de 50 µL/poço de dodecil sulfato de sódio (SDS - Sigma-Aldrich, SP, Brasil). Seguida 12h de solubilização à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada a 550 nm em leitor de microplacas. Os dados foram representados em média \pm desvio padrão. As diferenças entre as médias dos grupos controle e expostos ao AGE nas diferentes concentrações serão analisadas pelo One-Way ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey, através do programa SigmaStat versão 6 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Todos os resultados serão considerados significantes com $P < 0,05$.

RESULTADOS

A maior parte das células submetidas ao tratamento com AGE e LPS sobreviveram aos experimentos e apresentaram produção de NO. Em relação a viabilidade celular houve uma tendência na diminuição à medida que as concentrações de AGE-BSA foram aumentando. Não houve diferença significativa ao comparar os resultados dos grupos tratados apenas com AGE e os grupos estimulados com AGE e LPS, com exceção das células incubadas com doses de 240µg de AGE e LPS. A produção de NO foi maior no grupo controle positivo (tratado com LPS por 24 horas) em comparação com o grupo controle negativo. O grupo que foi tratado com AGE-BSA e LPS na concentração 240µg apresentou uma tendência à maior produção de NO em comparação aos outros grupos que também foram tratados com AGE-BSA e LPS. O controle negativo é formado apenas por macrófagos e meio de cultura, neste grupo foi verificada a produção basal e fisiológica de NO. Os grupos com concentrações de 15µg e 30µg de AGE não apresentaram produção significativa de NO. As doses 60µg, 120µg, 240µg de AGE produziram uma elevação na produção de NO. Ao comparar os grupos que foram tratados com LPS e sem LPS nota-se que o LPS contribuiu para aumentar a produção de NO.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que diferentes concentrações de AGE-BSA podem aumentar a liberação de NO por macrófagos e diminuir sua viabilidade celular. A viabilidade celular foi verificada em todos os grupos experimentais, mas apenas o grupo que foi incubado com AGE-BSA na concentração 240µg apresentou queda significativa em sua população. Apesar do grupo controle positivo apresentar um aumento importante na síntese de NO as suas células não apresentaram queda significativa em sua viabilidade. A produção de NO por macrófagos quando estes são tratados com AGE e a diminuição da viabilidade celular encontradas no presente trabalho corroboram com os achados na literatura. As concentrações de AGE escolhidas para o presente estudo se basearam no estudo de Heltianu et al. (2008), o qual comparou os níveis sanguíneos de AGE de pacientes diabéticos tipo 1 que apresentavam neuropatia compensatória e grau avançado de nefropatia em estágio final da doença renal. As concentrações de AGE desses grupos foram comparadas com o grupo controle, que não apresentava a patologia. O estudo mostrou que pacientes com neuropatia compensatória apresentam concentrações acima de 60µg de AGE e diabéticos em hemodiálise possuíam um nível superior a 120 µg de AGE. Os diabéticos que não apresentavam nenhuma dessas complicações exibiram uma

concentração aproximada de 30 µg de AGE, já o grupo controle apresentou nível plasmático em torno de 15 µg de AGE. Rojas et al. (1996) em seu trabalho avaliou os efeitos dos Produtos Finais de Glicação na indução de NO por macrófagos murinos e constatou que diferentes concentrações de AGE-BSA foram capazes de regular a liberação de nitrito induzida por LPS com uma relação dose dependente. Os macrófagos tratados apenas com o soro (controle negativo) não apresentaram nenhum efeito sobre a síntese de NO. Estes achados confirmam os resultados encontrados no presente trabalho. O estudo de Rojas et al. (1996) também demonstrou que os níveis de NO não se elevam quando os macrófagos são tratados com AGE-BSA e/ou BSA até uma concentração de 250 µg e sem o estímulo do LPS, refutando nossos achados, onde houve aumento de NO pelo grupo que foi incubado apenas com 240mg, entretanto deve-se levar em consideração que os tipos de macrófagos utilizados nos experimentos foram diferentes e o AGE usado no experimento de Rojas não foi adquirido pronto. A diminuição da viabilidade celular decorreu de forma significativa quando se aumentou as concentrações de AGE, isto pode ter acontecido pelo aumento da liberação de NO pelos macrófagos. O NO é citotóxico e pode causar a morte das células produtoras e de células vizinhas (DUSSE, 2003).

CONCLUSÕES

Os produtos finais da glicação avançada aumentam a produção de óxido nítrico em macrófagos tratados com LPS e sua viabilidade decresce a medida que este gás se eleva. Macrófagos incubados com AGE em altas concentrações liberam mais óxido nítrico e este pode ser citotóxico acarreta morte celular. Isto implica em possíveis desordens na saúde relacionadas com o acúmulo de AGE em pacientes diabéticos. Diante dos resultados e dos achados na literatura se faz necessário mais estudos para compreender os mecanismos e as vias metabólicas utilizadas pelo AGE para a produção de óxido nítrico e sua relação na inviabilidade celular.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ/UFPE, Departamento de Nutrição da UFPE/Recife, a minha orientadora, Dra. Wylla Tatiana Ferreira e Silva e minha co-orientadora Dra. Sueli Sena e aos colegas do nosso grupo de pesquisa, pela oportunidade e incentivo a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, Júnia Helena Porto; OLIVEIRA, Suzana Lima; SEARA, Lua Tojal. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. *Rev. Nutri.*, v.22 , n. 1, p. 113-124, jan/fev., 2009. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732009000100011> Acessado em: 2 jun. 2015.
- BIERHAUS, Angelika et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovasc. Res.* v. 37, n. 3, p.586-600, 1998. Disponível em:<<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/cardiovascres/37/3/586.full.pdf>> Acessado em: 28 jun., 2015.
- CHANG, Po-Chiao et al. 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.
- DUSSE, Luci Maria Sant’Ana; VIEIRA, Lauro Melo; CARVALHO, Maria das Graças. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Lab.* v. 39. N. 4. P. 343-350, 2003.
- FINOT P. A. Historical perspective of the Maillard reaction in food science. *Ann NY Acad Sci.* V. 1043, p. 1-8, 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16037216>> Acessado em: 7 jun. 2015.
- GOLDIN, Alison et al. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* V. 114, n. 6, p. 597-605, 2006. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/content/114/6/597.full?hc_location=ufi> Acessado em: 14 jun. 2015.

HELTIANU et al. 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.* v. 3, n. 3, p. 243–249, 2008.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 12ª edição, 2013

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.* v. 78, p. 927-30, 1994. Disponível em: < Marletta, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-30, 1994> Acessado em: 4 Jul. 2015

MILENKOVIC, Jovana Gasic et al. 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.* v. 17, p. 813–821, 2003.

MURPHY, P. M.; BITTAR, E. E.; NEVILLE, B. Phagocytes in immunity and inflammation, *Principles of Medical Biology*, Cap 11. Vol. 6, p. 197-229. 1996.

NUNES, Carlos Simões; BAPTISTA, António Oliveira. Implicações da reação de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* v. 96, n. 538, p. 53-59, 2001.

OETTERER, Marília. Escurecimento não enzimático. Departamento de ciência e tecnologia agroindustrial. 20_?. Disponível em: < <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Quimica%20de%20Alimentos%20-%20Escurecimento%20nao%20enzimatico.pdf>> Acessado em: 9 maio 2015.

RALPH P. et. Al. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity., *Journal of Immunology*, 114(2 pt 2), 898-905, 1975.

RALPH P.; NAKOINZ I. Direct toxic effects of immunopotentiators on monocytic, myelomonocytic, and histiocytic or macrophage tumor cells in culture., *Cancer Research*, 37(2), 546-550, 1977.

ROITT, Ivan M.; DELVES, Peter J. *Fundamentos de Imunologia*, décima edição, editora médica panamericana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª edição, 201.

ROJAS, Armando et al. Effect of Advanced Glycosylation End Products on the induction of Nitric Oxide Synthase in Murine macrophages. *Biochemical and biophysical Research Communications.* v. 225. p. 358-362, 1996.

SHIBAO Juliana; BASTOS, Deborah Helena Markowicz. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde, *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 24, n. 6, p. 895-904, Nov./dez., 2011. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rn/v24n6/09v24n6.pdf>> Acessado em: 15 jun. 2015.

SU, Kang-Yi et al. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF- κ B signaling. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* p. 14-21, 2014.

THORNALLEY P.J. The enzymatic defence against glycation in health, disease and therapeutics: a symposium to examine the concept. *Biochem Soc trans.* v. 6, p. 1341-2, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14641059>> Acessado em: 3 jul. 2015.

TAN, Kathryn C.B.; CHOW, Wing-Sun; LAM, Jamie C.M.; LAM, Bing; BUCALA Richard; BETTERIDGE John; Mary S.M. Advanced Glycation Endproducts in Nondiabetic Patients With Obstructive Sleep Apnea. *SLEEP*, v. 29, n. 3, 2006. Disponível em:< <http://www.journalsleep.org/Articles/290308.pdf>> Acessado em 2 jun.2015.