KAROLLINE SANTANA DA SILVA

Albumina modificada por glicação avançada e resistência insulínica em ratos: foco no tecido adiposo periepídidimo e nas ações da N-acetilcisteína

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2016

KAROLLINE SANTANA DA SILVA

**Albumina modificada por glicação avançada e resistência insulínica em
ratos: foco no tecido adiposo periepídidimo e nas ações da N-acetilcisteína**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Karolline Santana da

Albumina modificada por glicação avançada e resistência insulínica em ratos : foco no tecido adiposo periepídimal e nas ações da N-acetilcisteína / Karolline Santana da Silva. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Produutos finais de glicosilação avançada 2.Albuminas 3.Tecido adiposo 4.Macrófagos 5.Resistência à insulina 6.N-acetilcisteína

USP/FM/DBD-452/16

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM10), em colaboração com o Laboratório de Radioimunoensaio (LIM18) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e com o Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (002/14).

Apoio Financeiro FAPESP - #2012/04831-1 (Projeto Temático) e #2012/18724-2 (Bolsa de Doutorado).

Dedicatória

Aos Meus Primeiros e Melhores
Amigos, **José Carlos** e **Veraildes...**
àqueles que me deram asas para voar
e condições para acreditar que o
horizonte é do tamanho dos meus
sonhos.

Agradecimentos

À **Dra. Marisa Passarelli**, porque eu soube, desde o início, que as nossas diferenças nos completariam e as nossas igualdades nos levariam para muito longe. Respeito e gratidão por quem me ajudou a amadurecer na vida acadêmica, a enxergar que os desafios nos impulsionam e que a curiosidade não é um defeito para aqueles que questionam a ciência. Para finalizar, “(...) vejo flores em você!”

À **Dra. Maria Lúcia Corrêa-Giannella**, dona de uma positividade indiscutível e uma mente que se abre a cada resultado. Obrigada pela partilha de conhecimentos e por contribuir muito à minha formação.

Ao **Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado**, responsável pelo projeto temático, pelas reuniões inspiradoras e cheias de expressões visuais que nos faziam questionar a possibilidade de novos caminhos.

Ao **Dr. Sergio Catanozi**, pois, embora ele não saiba, sempre existiu uma co-orientação. Trabalhar com animais, os quais muitas vezes eu dei nomes e sobrenomes, foi uma excelente oportunidade para compartilhar grandes momentos, horas de cirurgia, conversas à fio sobre os medos e papers que porventura surgiam e apoio indiscutível aos rumos da vida.

À **Dra. Edna Regina Nakandakare**, que nos recebe todos os dias, faça chuva ou faça sol, com um sorriso no rosto e pronta para discutir, principalmente, as estatísticas com $p > 0,05$. Àquela que em nossas reuniões científicas semanais senta com o seu caderno preto e aprende conosco o mesmo tanto que aprendemos com ela.

Ao **Prof. Dr. Éder Quintão**, por nos apresentar um mundo que vai além dos Lípides e das calorosas discussões sobre as famosas partículas de HDL, quer sejam elas maiores ou menores. Muito obrigada por nos deixar extasiados diante da cor, do tom e da poesia que é viver.

À **Dra. Walcy Teodoro**, por me receber tão bem em seu laboratório para que as análises histológicas fossem realizadas e discutidas com todo o suporte necessário. E, pouco a pouco, conseguimos sanar dúvidas, buscar novas formas de interpretá-las. Obrigada pelos finais de tarde e noites embaladas pelas melodias da Alfa ou Nova Brasil FM.

À **Dra. Vera Capelozi**, pela maneira atenciosa na qual nos apresentou ao famoso retículo acoplado ao microscópio. Muito obrigada pela oportunidade e segurança em discutir conosco sobre as formas de análise histológica.

Às **Dra. Maristela Okamoto, Maria Heloísa Shimizu, Suely Kazue Marie** no auxílio com importantes metodologias. Obrigada pela disponibilidade,

prontidão e por tantos ensinamentos. Acrescento aqui o meu agradecimento à **Vanessa Galdeno** que, de maneira tão animada, compartilhou o seu conhecimento sobre as TOP 10 vias enriquecidas após RNA-seq.

Ao **Dr. Isaac de Castro**, pela imprescindível contribuição nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos colegas, **Dr. Danilo Corrêa**, **Dra. Karina Thieme** e **Ms. Nelly Takashima**, por vivenciarem comigo o mundo dos ratos, glicação e N-acetilcisteína, durante os exaustivos períodos de tratamento. Pelas discussões calorosas, “entre músculos, rins, fígado, macrófagos e tecido adiposo”, acredito que todos se salvaram.

À **Claudia Souza**, pois sem a sua paciência com tantas proformas, pedidos que se estendem em chegar ou são “perdidos” nas nuvens, auxílio nas prestações de conta, submissões de relatórios, as nossas vidas no laboratório seriam um pouco bagunçadas. Obrigada pelo afeto, conversas e preocupação diárias. Ainda bem que a temos por perto.

Ao **Dr. Diego Gomes**, que me disse, dentre tantas coisas, algumas que nem de longe esquecerei. “Vai, eu injeto nos animais no domingo”, “Eu te ensino, nega”, “Vamos fazer cDNA juntos amanhã?”, “Skype para treinar o intramuros?” Porque me sinto amparada e aquelas dúvidas de ontem serão todas resolvidas e musicadas na sua companhia. Solta o som...

À **Ms. Fernanda Fusco**, nossa “Super-Fofa”, pelos dias em que se mostrou ser uma fortaleza, exemplo de prestatividade, companheirismo e dedicação. O Sistema renina-angiotensina-aldosterona ganhou um tom lilás e uma identidade tão suave quanto a sua.

À **Ms. Juliana Tironi**, por compartilhar a bancada, os protocolos, dias de experimentos que, muitas vezes, se misturavam a noite e por tantos “Meu”, quando tudo chegava ao fim. Aos ratos Wistar e a N-acetilcisteína que nos uniram, as cores quentes e frias dos gráficos e a sua coragem em trilhar novos caminhos.

À **Ms. Maria Sílvia Lavrador**, por dividir seus comportamentos tão ímpares, como clamar a todos os santos quando não encontra o seu pendrive ou por simplesmente vibrar pela banda da proteína que custou a aparecer no Western-blot. A minha trajetória, sem as nossas discussões sobre adipócitos iguais aos livros de histologia, polarização M1/M2, precisaria ser urgentemente reescrita e ganhar um novo sentido.

À **Dra. Milessa Afonso** ou Tchura, sintam-se à vontade. Nossa empatia se deu no primeiro momento e soou como se já nos conhecêssemos. Isso é mágico! Não importa se São Paulo fica um pouco distante de New York, as nossas conquistas são diárias, nossas ligações são demoradas e a nossa

amizade perdurará. Meu muito obrigada por estar sempre “aqui”, filosofando sobre os macrófagos, reinventando protocolos e inspirando a todos ao seu redor.

À **Ms. Paula Ramos**, que consegue agregar mais apelidos à minha coleção, por questionar meu paladar infantil nos dias em que a farinha láctea me alimenta entre os experimentos. À minha “amiga não secreta” entre tantos amigos secretos e que não mede esforços para que tudo ocorra de maneira sublime. Obrigada por escrever no meu caderno de protocolos, ou nas páginas em branco que a vida me presenteou, e ainda se preocupar com o nosso jeito organizado de ser.

À **Ms. Tatiana Venâncio**, que discursa sobre ciência e vida, paixões e devaneios, independente de lugar, e de maneira tão corajosa. Obrigada por me encontrar sem planejarmos, por dividir as sessões de um filme qualquer e, até mesmo, alguns episódios de Gilmore Girls, depois de um dia agitado no nosso laboratório.

À **Dra. Adriana Machado**, responsável pelo jargão “vamos que vamos” o qual se tornou um mantra no decorrer das nossas experiências. Seu altruísmo me faz acreditar que somos capazes de ir além e, juntos, mais ainda. Obrigada pelas tardes de glicação, discussões sobre RNA e bom gosto pelas sonecas depois de um dia de congresso.

À **Dra. Gabriela Castilho**, uma entusiasta nata, obrigada por me ensinar as primeiras notas dos lípides, com tanta facilidade e destreza, lá em 2012, período em que uma nova oportunidade surgia a minha frente.

À **Dra. Ligia Okuda**, pela disponibilidade incansável em ajudar, quer seja nos protocolos que finalizavam altas horas da noite em datas especiais ou na leitura compartilhada de um paper. Agradeço pelas conversas que acalmam, em momentos agitados, e por mostrar soluções e oportunidades de um recomeço.

Ao **Dr. Rodrigo Iborra**, pois, o que seria de mim para alcançar os tubos falcon do laboratório se não fosse pela sua altura? Altura essa que não se restringe a estrutura física, mas ao excelente profissional, “Rei do Western-blot”, amigo e parceiro de viagens.

Ao **Guilherme Ferreira**, pela sua incessante curiosidade e determinação que nos mantém em alerta e dispostos a reaprender. Obrigada por personificar tão bem, em nossas discussões acadêmicas, a “Base de Schiff”, o “Produto Amadori” e os “oxoaldeídos”.

À **Monique Mello**, cuja dedicação e interesse são emblemáticas. Temos muito em comum e acredito que valha a pena continuar a seguir aquilo que faz seu coração palpitar.

Aos colegas de glicação, **Aécio Lira** e **Carlos Minani**, por estarem dispostos a “compensar” os pacientes DM, pelas conversas na bancada ao som da centrífuga e pelas novas ideias trazidas ao nosso laboratório.

À **Dra. Ana Maria Lottenberg**, pelo chocolate quente na Antuérpia, pelo passeio de barco em Bruges, pelo pôr do sol em Gent, pelas histórias em Amsterdam, pelas flores em Giethoorn e por todas as memórias fotografadas em meu coração ao longo desses anos no LIM10.

À **Lis Mie**, que nos apresenta, em reuniões, os firmicutes e bacteroidetes com tanta facilidade. Obrigada por distribuir abraços cantados de “Bom Dia” no nosso laboratório e, em conversas informais, versar sobre a família e a fé.

À **Bruna Lacerda**, nossa eterna “Nutri Jr” e desbravadora da Bandeira Científica, por encher nosso laboratório de sorrisos, bochechas rosadas e bolo de chocolate Sem chocolate da Casa Jaya. E o que falar sobre **Eliton Silva** e **Simone Batista**, cujas passagens no laboratório nos deixou saudades? Torço para que, muito em breve, vocês retornem ao “nosso lugar”.

À **Talita Miguel, Marina Demasi, Letícia Celestino** e **Renata Torres**, as novas “nutris”, pela energia da juventude que se encanta pela pesquisa, porque o aprender é cíclico e os desafios são meros detalhes. Estendo os meus agradecimentos à **Letícia Rodrigues, Sari Ronqui** e **Elda Dantas**, das mais diversas áreas, mas com desejo similar em aprender.

Às **Dras. Valéria Nunes** e **Patrícia Cazita**, uma dupla de profissionais que se debruça sobre os dados da cromatografia e da CETP, pelo aprendizado nas horas de discussão e sugestões para que tudo pudesse ser solucionado da melhor maneira possível.

À **Kelly Gomes**, companheira de bancada e de conversas durante as horas em que aguardávamos o resultado dos ELISA, possibilidades sobre enxaquecas e tantas outras coisas que temos em comum na vida.

À **Fabiana Ferreira**, por estar sempre disposta a ajudar, principalmente quando anima as nossas manhãs com os famosos pães portugueses; pela gentileza em ouvir nossos desabafos tão cedo, por aprender e compartilhar suas experiências frente aos novos protocolos na nossa “menina dos olhos”, mais conhecida como sala da cultura de células.

À **Jussara Rocha**, por contar sobre os antigos experimentos na sala de cirurgia e que nos fazem entrar numa mistura de passado e presente tão bonitos. Não desistiremos!

À **Rosibel Sileide**, pelos puxões de orelha quando, por algum descuido, esquecemos de separar as vidrarias dos animais. Ou mesmo pelos momentos, durante os ensaios de Biologia Molecular, em que não podemos conversar muito, mas nos tornamos excelentes ouvintes.

Às nossas “vets” **Ana Paula Lembo** e **Vanessa Del Bianco**, por compartilharem dos momentos que incluem desde às coletas de sangue em dias de frio, o que sempre é uma vitória, aos pães de queijo, risadas e perguntas como: “você entendeu aquilo tudo, Karol?”

À **Ms Dani Santos** e **Dra Maria Beatriz Monteiro**, pela formação do nosso grupo 1025, um grupo que deu certo porque, afinal, somos “MARA” e falamos muito bem, obrigada, o espanhol que deixaria qualquer cidadão de Guanajuato boquiaberto. Obrigada pela leveza e doces que tanto alegraram os meus dias no laboratório.

À **Ms. Aritania Santos**, pela confiança em nós depositada para que pudéssemos adentrar no mundo do *BioAnalyzer* e *StepOne*. Esse foi um passo importante para que, a partir de então, as nossas conversas saíssem do mundo científico e se enveredasse em discussões filosóficas, conselhos e risadas.

À **Dona Ana**, sempre cantante pelos corredores da FMUSP e por desejar sempre um Bom Dia cheio de vida e determinação.

À **Maria Aparecida** e **Senária**, secretárias da pós-graduação, pelos desejos de boa sorte, respostas quase imediatas aos e-mails e auxílios em todas as etapas do meu doutorado.

Ao **Biotério da Reumatologia**, em especial aos senhores **Antonio Filho**, **Valter Silva** e **Valdeci Silva**, que pacientemente nos auxiliaram no decorrer dos experimentos com os animais. Obrigada por nos passarem fundamentos básicos, mas não menos importantes, sobre as condutas a serem realizadas aos finais de semana, principalmente em situações de emergência.

Às minhas meninas Marias, **Ms. Carolina Romão** e **Ms. Viviane Faustino**, por tantas histórias, nascimentos e recomeços. Aqui estamos, juntas mais uma vez, lado a lado, a espera de mais alguns desafios. Agradeço também aos colegas do Departamento de Nefrologia pelas conversas, troca de figurinhas e selfies clicadas a caminho dos famosos restaurantes, vulgo, “bandecos”.

À **Sra Amália**, docemente chamada de vó, voinha. Àquela que é dona dos olhos verdes mais lindos que os meus olhos conseguem enxergar, acreditem! Obrigada por se sentar no sofá, me chamar de “Karen”, contar histórias de vida que nenhum livro ilustraria tão bem. Por saber que eu

cheguei, mesmo com os olhos fechados, e se despedir com a famosa pergunta “Quando você volta?”

Aos meus pontos de equilíbrio, **José Carlos e Veraildes**, por alimentarem a minha alma e os meus sonhos cercados por girassóis. Pela escolha feita, em me chamar de filha caçula, durante a nossa caminhada por tantas vidas. Minha infinita gratidão!

Aos meus irmãos, **Hugo e Vanessa**, que aguardam as minhas chegadas nas madrugadas, fazem planos durante a minha estadia e sentem no meu retorno. Junto a eles, **Malu, Itainã e Eloah**, que me enchem de sorrisos, enquanto lutam contra o sono, pois querem ver o avião que levará tia Kaká.

Às minhas companheiras de morada, **Nadia Ranal e Lucineide Santana**, que não entendiam quando, durante as conversas e em noite de pizza com tantos tipos de queijo gratinado, surgiam os assuntos ratos e AGE. À “embaixada ilheense”, **Claiton Guedes, Angela Souza e Joaquim Neto**, por me oferecerem, aos finais de semana, a energia do dendê em São Paulo.

Aos meus, sempre SED, **Lucas Mendonça, Dida Korontai e Tiago Rozário**, por acreditarem tanto na minha trajetória, às vezes muito mais do que eu mesma. As resenhas, “shelps”, planos, realizações e, principalmente, os abraços apertados, desde o Cilion até o Alto do Corcovado, nos uniram, conservaram e abençoaram.

À **Fapesp**, pela concessão da bolsa de doutorado que tornou possível a realização desse projeto.

“Muitas coisas começam bem pequenas. É um jeito bom de começar porque ninguém nota. Você é só uma coisinha perambulando, cuidando da própria vida. Aí você cresce!” Faço uso essas belas palavras para externar àqueles, embora aqui não mencionados, meu muito obrigada por existirem e fazerem parte dessa minha conquista.

*“Todo jardim começa com um sonho de amor.
Antes que qualquer árvore seja plantada
ou qualquer lago seja construído, é preciso que
as árvores e os lagos
tenham nascido dentro da alma.*

*Quem não tem jardins por dentro, não planta
jardins por fora
e nem passeia por eles...”*

Rubem Alves

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Diabetes melito e produtos de glicação avançada (AGE).....	1
1.2. Albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE).....	7
1.3. Tecido adiposo e produtos de glicação avançada	10
1.4. N-acetilcisteína	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVO.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Preparo de albumina glicada in vitro	20
4.2. Determinação do conteúdo de AGE	21
4.3. Protocolo experimental	21
4.4. Dosagens bioquímicas.....	23
4.5. Teste de tolerância à insulina (ITT).....	24
4.6. Coleta de urina.....	24
4.7. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	25
4.8. Medida da pressão arterial sistólica caudal (PAS).....	25
4.9. Obtenção de células e tecidos dos animais	26
4.10. Obtenção de macrófagos peritoneais	26
4.11 Obtenção do tecido adiposo periepididimal	27
4.11.1. Histomorfometria	27
4.11.2. Imuno-histoquímica e quantificação de marcadores.....	28
4.12. Análise da expressão gênica	30
4.12.1. Extração de RNA	30

4.12.2. Síntese do DNA complementar (cDNA) e Análises quantitativas por PCR em tempo real (RT-qPCR).....	32
4.12.3. Sequenciamento e análise do transcriptoma no tecido adiposo periepididimal.....	35
4.13. Análise estatística	37
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO.....	71
7. CONCLUSÃO.....	86
8. REFERÊNCIAS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1	Transportador cassete de ligação de ATP A1
ABCG-1	Transportador cassete de ligação de ATP G1
Actb	Beta actina
Adipoq	Gene que codifica a Adiponectina
AGE	Produto de glicação avançada
AGER-1	Receptor tipo 1 para produto de glicação avançada
AGL	Ácidos graxos livres
Apo-AI	Apolipoproteína A-I
Arg1	Gene: Arginase 1
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CD-36	Cluster de diferenciação 36
CML	Carboximetil-lisina
Col4a1	Colágeno tipo IV cadeia alfa 1
Col4a2	Colágeno tipo IV cadeia alfa 2
Col5a1	Colágeno tipo V cadeia alfa 1
Col5a3	Colágeno tipo V cadeia alfa 3
Col12a1	Colágeno tipo XII cadeia alfa 1
CT	Colesterol total
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DM	Diabete melito
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAFA	Albumina bovina isenta em ácidos graxos
GLUT-2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
Grp78	Proteína regulada pela glicose 78 kDA
Grp94	Proteína regulada pela glicose 94 kDA
HDL	Lipoproteína de densidade alta
HE	Hematoxilina-eosina
HPRT1	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase 1
ICAM	Molécula de adesão intercelular

IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
Itgb8	Gene: Integrina subunidade beta-8
Itgam	Gene: Integrina subunidade alfa-M
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
mM	Milimolar
NAC	N-acetilcisteína
NF-κB	Fator nuclear kappa B
nm	Nanômetro
PBS	Solução tampão fosfato
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RAGE	Receptor do produto de glicação avançada
Mrc1	Gene: Receptor de manose tipo 1
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Nos2	Gene: Óxido nítrico sintase 2
PPARα	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo alfa
PYR	Pirralina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Retn	Gene: Resistina
SFB	Soro fetal bovino
Slc2a4	Gene: Família carreadora de soluto tipo 2 membro 4 (GLUT4)
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicérides
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de glicação, Maillard ou escurecimento.....	3
Figura 2. Pool corporal de AGE	4
Figura 3. Polarização dos macrófagos.....	14
Figura 4. Reação de glicação <i>in vitro</i>	20
Figura 5. Desenho experimental.....	23
Figura 6. Método de contagem estereológica	28
Figura 7. Método de contagem estereológica do infiltrado de macrófagos..	30
Figura 8. Análise da integridade do mRNA.....	31
Figura 9. Seleção de genes normalizadores.....	33
Figura 10. Sequenciamento do mRNA do tecido adiposo periepididimal	36
Figura 11. Concentração de AGE total na albumina de rato.....	39
Figura 12. Conteúdo de carboximetil-lisina (CML) e pirralina (PYR) na albumina de rato.	40
Figura 13. Consumo diário de ração.....	41
Figura 14. Evolução ponderal dos animais tratados com albumina C ou albumina AGE na presença ou ausência de N-acetilcisteína	42
Figura 15. Pressão arterial sistólica	43
Figura 16. Concentração urinária de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	45
Figura 17. Análise da constante de decaimento da glicose	46
Figura 18. Caracterização do tecido adiposo periepididimal.....	47
Figura 19. Imuno-histoquímica para F4/80 no tecido adiposo periepididimal	49
Figura 20. Imuno-histoquímica para CD11b no tecido adiposo periepididimal	51
Figura 21. Imuno-histoquímica para CD206 no tecido adiposo periepididimal.	52

Figura 22. Expressão relativa de genes do eixo AGE-RAGE no tecido adiposo periepididimal	53
Figura 23. Expressão relativa de genes do eixo inflamatório no tecido adiposo periepididimal..	55
Figura 24. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M1) infiltrados no tecido adiposo periepididimal.	56
Figura 25. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M2) no tecido adiposo periepididimal.....	58
Figura 26. Expressão relativa de genes associados à sensibilidade insulínica no tecido adiposo periepididimal.....	60
Figura 27. Rede de interações formada por genes/proteínas diferencialmente expressos em amostras do tecido adiposo periepididimal.....	61
Figura 28. Validação do mRNA de componentes de matriz extracelular no tecido adiposo periepididimal.....	63
Figura 29. Expressão relativa de genes do eixo AGE-RAGE em macrófagos peritoneais.	65
Figura 30. Expressão relativa de genes do eixo inflamatório em macrófagos peritoneais.	67
Figura 31. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M1) peritoneais.	68
Figura 32. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M2) peritoneais.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes e respectivas sondas utilizadas para análise de expressão gênica	34
Tabela 2. Perfil bioquímico dos animais tratados com albumina C ou albumina AGE concomitante ou não a administração de N-acetilcisteína após 90 dias de tratamento.....	44

RESUMO

Silva KS. ***Albumina modificada por glicação avançada e resistência insulínica em ratos: foco no tecido adiposo periepídidimo e nas ações da N-acetilcisteína*** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2016.

Produtos de glicação avançada (AGE) contribuem para o estresse oxidativo e inflamatório, os quais constituem as bases celulares para as complicações a longo prazo do diabetes melito (DM). A albumina é a principal proteína sérica modificada por AGE e afeta adversamente o metabolismo de lipídeos e a resposta inflamatória em macrófagos, a função das ilhotas pancreáticas e a sensibilidade insulínica no músculo. Neste estudo, avaliamos o efeito da administração crônica de albumina AGE, associada ou não ao tratamento com N-acetilcisteína (NAC), sobre a sensibilidade periférica à insulina, infiltrado total e perfil de macrófagos, transcriptoma do tecido adiposo periepídidimo e padrão de diferenciação de macrófagos peritoneais em ratos saudáveis. Albumina AGE foi produzida pela incubação de albumina de rato com glicolaldeído 10 mM, durante 4 dias a 37 °C, em agitação, no escuro. Albumina controle (C) foi preparada na presença de PBS apenas. Ratos Wistar com 4 semanas de idade foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n = 7-8), os quais receberam injeção intraperitoneal diária de albumina C ou albumina AGE (20 mg/Kg/dia) concomitantemente ou não a administração da NAC (600mg/L de água) (grupos albumina C + NAC e albumina AGE + NAC), durante 90 dias consecutivos. Parâmetros bioquímicos foram determinados por técnicas enzimáticas, peroxidação lipídica, pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na urina, expressão gênica, por RT-qPCR, e conteúdo proteico, por imuno-histoquímica. AGE total foi determinado por ELISA, carboximetil-lisina (CML) e pirralina (PYR), por cromatografia líquida/espectrometria de massa. O tecido adiposo periepídidimo foi analisado por estereologia. A concentração de AGE total, CML e PYR foi, respectivamente, 9,2, 7000 e 235 vezes maior na albumina AGE em comparação à C. Consumo de ração, massa corporal, pressão arterial sistólica e concentração plasmática de colesterol total, triglicérides, ácidos graxos livres, glicose, insulina, ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e excreção urinária de proteínas (24 h) foram semelhantes entre os grupos. A NAC reduziu em 1,4 e 1,6 vezes a concentração urinária de TBARS nos animais tratados com albumina AGE + NAC, em comparação aos grupos AGE e C+NAC, respectivamente. A albumina AGE reduziu em, aproximadamente, 1,4 vezes a sensibilidade à insulina em comparação ao C, o que foi prevenido pela NAC. O peso relativo do tecido adiposo periepídidimo, a

fração de área e o volume dos adipócitos foram semelhantes entre os grupos experimentais. Maior infiltrado macrófago, (células F4/80 positivas), foi observado nos animais tratados com albumina AGE (1,3 x), o que também foi prevenido pela NAC. CD11b e CD206 permaneceram inalterados. O tratamento com albumina AGE também não alterou a expressão do mRNA de *Ager* (RAGE), *Ddost* (AGE-R1), *Cd36*, *Nfkb1*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Nos2*, *Il12*. No entanto, *Itgam* (CD11b - M1) e *Mrc* foram reduzidos no grupo AGE + NAC em comparação a C + NAC (2 e 1,9 x) e AGE (1,8 e 1,5 x, respectivamente). Aumento do mRNA de *Slc2a4* (GLUT-4) e *Ppara* foi observado nos animais tratados com albumina AGE + NAC em comparação a C + NAC (*Slc2a4*: 1,6; *Ppara* 2,2 x) e AGE (2,3; 3,3 x). A albumina AGE contribuiu para maior expressão do *Col12a1* (3,1 x) em relação ao C. Análise de macrófagos isolados da cavidade peritoneal apontaram elevação no mRNA de *Il6* (2,6 x) e *Ddost* (1,4 x) no grupo AGE em relação ao C. *Ddost* também foi aumentado (1,2 x) no grupo AGE + NAC quando comparado ao C+NAC. Além disso, a NAC favoreceu o aumento do *Arg1* (arginase 1) nos grupos albumina C + NAC (2,5 x) e AGE + NAC (2,6 x) quando comparados aos seus respectivos controles. Em conclusão, a albumina AGE favorece o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo o que evidencia a sensibilização deste território à ação dos AGE e pode, a longo prazo, contribuir para piora na resistência à insulina, observada neste modelo animal. A NAC antagoniza os efeitos da albumina AGE e exerce, por si, efeitos benéficos sobre o perfil de diferenciação de macrófagos no tecido adiposo e peritônio, resposta inflamatória, peroxidação lipídica e resistência insulínica. A NAC pode ser uma ferramenta útil na prevenção das ações dos AGE sobre o desenvolvimento de resistência insulínica e complicações do DM.

Descritores: Produtos finais de glicosilação avançada (AGE); albumina; tecido adiposo; macrófagos; resistência à insulina; N-acetilcisteína.

SUMMARY

Silva KS. ***Advanced glycated albumin and insulin resistance in rats: focus on periepididimal adipose tissue and N-acetylcysteine actions*** [Thesis].

São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2016".

Advanced glycation end-products (AGE) contribute to oxidative and inflammatory stress, which constitute the cellular basis for long-term complications of diabetes mellitus (DM). Albumin is the major serum protein modified by AGE and adversely affects macrophage lipid metabolism and inflammatory response, pancreatic islet function and muscle insulin sensitivity. We investigated the effect of chronic administration of AGE-albumin, associated or not with N-acetylcysteine (NAC) treatment, in peripheral insulin sensitivity, macrophage infiltration and polarization and transcriptome of periepididimal adipose tissue and peritoneal macrophage differentiation in healthy rats. AGE-albumin was prepared by incubating rat albumin with 10 mM glycolaldehyde for 4 days, 37 °C, under shaker, in the dark. Control albumin (C) was incubated with PBS alone. Four-weeks old male Wistar rats (n = 7-8/group) were randomized into four groups receiving daily intraperitoneal injections of C or AGE albumin (20 mg/kg/day) alone or together with NAC (600mg/L drinking water) (C + NAC albumin and AGE + NAC albumin), for 90 consecutive days. Biochemical parameters were determined by enzymatic techniques, lipid peroxidation by the measurement of urinary thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), gene expression by RT-qPCR and protein content by immunohistochemistry. Total AGE was determined by ELISA and carboxymethyllysine (CML) and pyrraline (PYR) by liquid chromatography/mass spectrometry. Periepididimal adipose tissue was analyzed by stereology. Total AGE concentration, CML and PYR were, respectively, 9.2, 7000 and 235 times higher in AGE albumin as compared to C. Food consumption, body weight, systolic blood pressure and plasma total cholesterol, triglycerides, free fatty acids, glucose, insulin, urea, creatinine, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and urinary protein excretion (24 h) were similar among groups. NAC reduced urinary TBARS in AGE + NAC group as compared to AGE (1.4 x) and C + NAC (1.6 x), respectively. AGE albumin reduced 1.4 times the insulin sensitivity as compared to C albumin; this was prevented by NAC. Adipose tissue relative weight, adipocyte area fraction and volume were similar among groups. A higher (1.3 x) macrophage infiltrate (F4/80 positive cells) was observed in AGE albumin treated animals in comparison to those treated with C albumin and this was prevented by NAC. CD11b and CD206 were unchanged as well as mRNA de *Ager* (RAGE), *Ddost* (AGE-R1), *Cd36*, *Nfkb1*, *Il6*, *Il10*, *Tnf*, *Nos2* and *Il12*. *Itgam* (CD11b - M1) and *Mrc* (CD206 - M2) were reduced in AGE + NAC group in comparison to C + NAC (2 and 1.9 x, respectively) and AGE (1.8 and 1.5 x, respectively). Increased *Slc2a4* (GLUT-4) and *Ppara* mRNA were observed in AGE + NAC group in comparison to C + NAC (*Slc2a4*: 1.6 x; *Ppara*: 2.2 x) and to AGE (*Slc2a4*: 2.3 x; *Ppara*: 3.3 x). AGE albumin increased the expression of *Col12a1* in 3.1 times as compared to C albumin. In peritoneal macrophages

there was an increase in *Il6* (2.6 x) and *Ddost* (1.4 x) in AGE group as compared to C. *Ddost* was also 1.2 times increased in AGE + NAC as compared to C+NAC. NAC increased *Arg1* (arginase 1) in C + NAC (2.5 x) and AGE + NAC (2.6 x) as compared to their respective controls. In conclusion, AGE albumin favors macrophage infiltration in adipose tissue promoting over time tissue sensitization to AGE that may contribute to worsening insulin resistance in this animal model. NAC antagonizes the effects of AGE albumin and by itself has beneficial effects in macrophage differentiation in adipose tissue and peritoneal cavity, inflammatory response, lipid peroxidation and insulin sensitivity. NAC may be a useful tool in the prevention of AGE actions on the development of insulin resistance and long-term complications of DM.

Descriptors: Advanced glycation end products (AGE); albumin; adipose tissue; macrophages; insulin resistance; N-acetylcystein

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes melito e produtos de glicação avançada (AGE)

O diabetes melito tipo 2 (DM 2) corresponde a um conjunto heterogêneo de condições, sendo a resistência insulínica, em grande parte associada à obesidade visceral, um importante fator contribuinte (Ibrahim, 2010; Esser et al., 2014). Associam-se ainda outros componentes da síndrome metabólica, como dislipidemias, hipertensão arterial, hiperinsulinemia, disfunção endotelial e inflamação, que agravam o risco de complicações macrovasculares no DM 2. De fato, a doença aterosclerótica contribui como principal causa de morbidade e mortalidade nesta população (Chawla et al., 2012; Osborn et al., 2012; Goyal et al., 2014).

No DM, a hiperglicemia é o principal fator etiopatogênico das complicações micro e macrovasculares. Isto se deve, em parte, ao aumento da metabolização da glicose ao longo das vias glicolítica, das hexosaminas, dos polióis, ativação da proteína cinase C (PKC) e formação dos produtos de glicação avançada (AGE), com consequente aumento do estresse oxidativo e inflamatório tecidual que constituem a base fisiopatológica dessas complicações. Essas vias compartilham a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em decorrência da hiperglicemia crônica ou intermitente (Brownlee, 2001; Yamagishi et al., 2012; Furlan, 2013).

Os produtos de glicação avançada (AGE) são formados a partir da reação de glicação ou Maillard, caracterizada pela ligação covalente, não

enzimática entre a glicose ou outros açúcares redutores com a porção aminoterminal de lípidos, ácidos nucleicos e resíduos de lisina e arginina das proteínas (Magalhães et al., 2008; Vlassara et al., 2011; 2014). Inicialmente, há a formação de um composto instável, denominado Base de Schiff, que após sofrer rearranjos moleculares progride para um produto mais estável, o Produto Amadori. A autooxidação da glicose, a fragmentação da Base de Schiff e os rearranjos inter e intramoleculares do Produto Amadori favorecem a formação de oxoaldeídos, tais como glioxal (GO), metilglioxal (MGO), glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona (3-DG). Por sua vez, esses compostos mais reativos do que a glicose, propagam de maneira rápida e irreversível à formação dos produtos de glicação avançada (AGE) (Barlovic et al., 2011; Vistoli et al., 2013; Vlassara, Uribarri, 2014) (**Figura 1**). Dentre uma gama de moléculas complexas e heterogêneas obtidas, destacam-se carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), pirralina, pentosidina, dímeros de GO e MGO (Vlassara, Striker, 2013; Hanssen et al., 2014).

Em indivíduos portadores de DM, a formação dos AGE encontra-se acelerada devido ao aumento da concentração circulante de glicose, precursores de AGE e estresse oxidativo, condições que se correlacionam com as complicações diabéticas (Brownlee, 2001; Peppas et al., 2003; Nowotny et al., 2015). Entretanto, vale ressaltar que, independentemente de hiperglicemia, os AGE também são prevalentes em estados inflamatórios e dislipidemias, onde há um aumento da geração de GAD e outros oxoaldeídos (Godwin et al., 2013; Furusyo, Hayashi, 2013; Vlassara, Uribarri, 2014; Gomes et al., 2016). Além disso, na doença renal crônica, a falha na destoxificação de

intermediários da reação de glicação e o aumento do insulto oxidativo, condicionam uma maior geração de AGE (Himmelfarb et al., 2002; Malipattu, Uribarri, 2014; Machado et al., 2014).

Figura 1. Reação de glicação, Maillard ou escurecimento. Reação não enzimática entre macromoléculas (lípidos, proteínas e ácidos nucleicos) e um açúcar redutor (glicose) cursam à formação reversível da Base de Schiff. Esta base progride para um composto mais estável, o Produto Amadori, que após rearranjos inter e intramoleculares contribui para a geração rápida e irreversível dos produtos de glicação avançada (AGE).

Embora a formação dos AGE seja predominantemente endógena, a dieta, em virtude da forma e tempo de cocção, contribui como fonte exógena desses compostos. Em geral, alimentos ricos em gorduras, seguidos dos mais enriquecidos em carboidratos, favorecem o aumento da concentração circulante de AGE (Uribarri et al., 2010; Vlassara, Striker, 2011; Uribarri et al., 2015; Gupta, Uribarri, 2016). Aproximadamente 10% dos AGE ingeridos são

absorvidos, sendo apenas 2/3 retidos pelo corpo e 1/3 excretado na urina (Koschinsky et al., 1997; Uribarri et al., 2005; 2010, Vlassara et al., 2011). Além da dieta, o fumo também é considerado importante fonte exógena de AGE (Peppas et al., 2003; Gupta, Uribarri, 2016) (**Figura 2**).

Figura 2. Pool corporal de AGE. O pool de AGE no organismo é determinado pelo balanço entre as vias de síntese e eliminação. Fontes endógenas são representadas pelo estresse carbonila ou de substrato (hiperglicemia), estresse oxidativo e inflamatório; fontes exógenas, por dieta e tabaco. As vias de detoxificação são representadas pelo catabolismo tecidual, por meio da ação de amadorias, e pelo metabolismo renal que contribui para a eliminação de intermediários reativos da reação. Figura adaptada: Uribarri et al., 2015.

Os AGE são reconhecidos por múltiplos receptores de superfície celular, como o receptor para produto de glicação avançada (RAGE), receptores de glicação avançada AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3 e por receptores *scavenger* da família CD-36, entre outros (Barlovic et al., 2011; Vlassara, Striker, 2011; Davis et al., 2014a).

O RAGE é uma proteína transmembrânica multiligante de 45-50 kDA cuja via de transdução de sinal, suscitada pela interação com AGE, culmina na indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). Como consequência, é ativada a transcrição de genes pró-inflamatórios que incluem a interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF α), expressão de moléculas de adesão [ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*)] e receptores *scavenger* associados à fisiopatologia das complicações do DM, além do próprio RAGE, criando assim um ciclo vicioso (Basta, 2008; Tan et al., 2011; Kierdorf et al., 2013; Rojas et al., 2013; Vlassara, Uribarri, 2014). Este receptor, em condições de excesso de AGE, é altamente expresso em monócitos, macrófagos, células musculares lisas e endoteliais (Rojas et al., 2013; Vlassara, Uribarri, 2014). Ueno et al. (2010) demonstraram, pela primeira vez, que o RAGE está associado à adiposidade desvinculada do DM, além de contribuir na progressão da aterosclerose.

Estudos recentes sugerem a localização intracelular do RAGE em compartimentos endossomais, onde o mesmo poderia mediar a ação dos AGE formados no interior da célula (Alexiou et al., 2010; Vetter et al., 2015).

O gene *Ager*, o qual codifica o RAGE, encontra-se localizado no cromossomo 6 e compreende 11 éxons intercalados por 10 íntrons, região enriquecida por mediadores da regulação imune (Alexiou et al., 2010; Rojas et al., 2013; Wautier et al., 2016). Estudo em modelo animal com deleção do *Ager* aponta uma redução no desenvolvimento das complicações macrovasculares

do DM e, consideravelmente, no conteúdo de macrófagos por área de lesão aterosclerótica (Soro-Paavonen et al., 2008). Em paralelo, Song et al. (2014) observaram, nesse mesmo modelo animal e mediante adição de dieta rica em gordura, consistente melhora das respostas metabólica e inflamatória.

Variantes funcionais do RAGE têm sido caracterizadas, com destaque a duas formas solúveis distintas, ambas encontradas na circulação e que atuam de modo a impedir a sinalização intracelular. O RAGE solúvel (sRAGE) resulta primariamente da clivagem, por ação proteolítica, dos domínios intra e extracelulares; ao passo que a segunda forma, nomeada RAGE endogenamente secretada - esRAGE -, corresponde a 20% do total de sRAGE e origina-se a partir de *splicing* alternativo do gene *Ager* (Schmidt, 2015; Wautier et al., 2016). Trabalhos recentes demonstram uma relação inversa entre as concentrações de sRAGE e/ou esRAGE e disfunções metabólicas além de enfatizar o potencial terapêutico dessas formas (Davis et al., 2014b; Di Pino et al., 2016).

O AGE-R1, codificado pelo gene *Ddost*, consiste numa proteína localizada na membrana plasmática e em compartimentos subcelulares, e responsável por promover a regulação de ROS, a endocitose e a degradação dos AGE. Deste modo, este receptor antagoniza a via de sinalização do eixo AGE-RAGE, por regular negativamente o insulto oxidativo e inflamatório, favorecendo mecanismos de defesa antioxidante (Cai et al., 2008; Vlassara et al., 2009; Vlassara, Striker, 2011; Vlassara, Uribarri, 2014).

O receptor *scavenger* CD-36 também se liga aos AGE e desempenha papel preponderante na indução do estresse oxidativo e gênese da resistência

periférica insulínica por facilitar a captação de ácidos graxos livres e, conseqüentemente, a geração de derivados metabólicos que interferem na sinalização do receptor de insulina (Kuniyasu et al., 2003; Unno et al., 2005; Boyer et al., 2015).

Além dos mecanismos elencados a estes receptores, tais como degradação e depuração, destaca-se ainda o sistema de enzimas glioxalase, representado pela glioxalase 1 e 2, ambas de caráter intracelular e antioxidante, que contribuem à supressão dos AGE e restauro do balanço oxidativo (Uribarri et al., 2015; López-Díez et al., 2016).

1.2. Albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE)

Os AGE conduzem às complicações diabéticas por vias que se vinculam, principalmente, à modificação de proteínas, com perda de função e promoção do estresse oxidativo (Brownlee, 2001; Vlassara, Uribarri, 2014).

A albumina, proteína de 66,7 kDa é a macromolécula circulante mais abundante e perfaz cerca de 55-60% do total de proteínas séricas. Dentre uma variedade de funções biológicas desempenhadas pela albumina, destacam-se a manutenção do volume plasmático e equilíbrio ácido-básico, controle da pressão coloidosmótica, transporte não-específico de substâncias e medicamentos e atividade antioxidante (Cohen, 2003; Anguizola et al., 2013).

Alterações na estrutura da albumina resultam no prejuízo das suas funções. Sintetizada no fígado e com meia-vida de, aproximadamente, 21 dias, esta proteína encontra-se suscetível as modificações químicas e estruturais,

principalmente no DM e doença renal crônica (Baraka-Vidot et al., 2013; Raghav et al., 2014). Relação direta entre a concentração sérica de albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE) e as complicações micro e macrovasculares do DM é descrita em diversos estudos (Song et al., 2012; Furusyo, Hayashi, 2013; Neelofar et al., 2016).

O tratamento de macrófagos, células intimamente envolvidas no desenvolvimento da aterosclerose, com albumina AGE altera a homeostase intracelular de lípidos (Traldi et al., 2015). Macrófagos expostos à albumina AGE produzida *in vitro* apresentam maior geração de ROS, pela ativação dos sistemas NADPH oxidase e mitocondrial (de Souza Pinto et al., 2012), de marcadores do estresse do retículo endoplasmático e da resposta a proteínas mal enoveladas (Castilho et al., 2012). Estes eventos vinculam-se ao prejuízo no conteúdo proteico de ABCA-1 e consequente redução no efluxo de colesterol, o que favorece o acúmulo intracelular de lípidos, em especial do 7-cetocolesterol (Iborra et al., 2011). O tratamento concomitante com aminoguanidina, antioxidante e inibidor da geração de AGE, previne o estresse oxidativo intracelular (de Souza Pinto et al., 2012), restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de lípidos. Além disso, a inibição do estresse de retículo pelo uso de chaperona química (ácido 4-fenil butírico) reduz o prejuízo no efluxo de colesterol induzido pela albumina AGE (Castilho et al., 2012). A redução no conteúdo de ABCA-1 não decorre da modificação na taxa de transcrição do *Abca-1* nem das etapas iniciais da sua tradução (Passarelli et al., 2005).

Okuda et al. (2012) evidenciaram que a albumina AGE sensibiliza macrófagos à estimulação inflamatória induzida por lipopolissacarídeo (LPS) ou calgranulina S100B. Em primeira instância, observou-se aumento na secreção de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF α) e moléculas de adesão (MCP-1, ICAM-1, VCAM-1) em macrófagos pré-tratados com albumina AGE, o que se vincula à redução no efluxo de colesterol mediado pela lipoproteína de densidade alta (HDL) e apolipoproteína A-I (apo-AI) para os receptores ABCG-1 (*ATP binding cassette transporter G1*) e ABCA-1 (*ATP binding cassette transporter A1*), respectivamente.

A incubação de macrófago J774 com albumina isolada de pacientes DM 2 com controle glicêmico inadequado reduz o conteúdo do ABCA-1 na membrana plasmática e aumenta a degradação deste transportador, mediado pelo RAGE e por uma via independente da calpaína, a qual envolve os sistemas proteasomal e lisossomal (Iborra et al., 2016).

Machado-Lima et al. (2015b) reforçam que a ação deletéria da albumina AGE em macrófagos é intermediada pelo RAGE. O silenciamento gênico do receptor ou o uso de macrófagos *knockout* para RAGE impede o acúmulo intracelular de lípidos induzido pela albumina AGE. Ainda, o prejuízo no efluxo de colesterol é prevenido frente ao ajuste do controle glicêmico em portadores de DM (Machado-Lima et al., 2015a).

1.3. Tecido adiposo e produtos de glicação avançada

Além de ser a principal reserva de energia em eucariontes superiores, por armazenar triglicérides e prover sua mobilização durante períodos de privação, o tecido adiposo secreta moléculas biologicamente ativas conhecidas como adipocitocinas. Essas moléculas participam do metabolismo da glicose e de lípidos, processo inflamatório, regulação da pressão sanguínea, coagulação, controle alimentar, entre outros (Hajer et al., 2008; Chawla et al., 2012; Samad, Ruf, 2013).

A identificação do tecido adiposo como órgão que se apresenta em estado de hipertrofia nos indivíduos obesos recebeu notável atenção, uma vez que atrelado a este fato observou-se o aumento do número de células, principalmente de macrófagos (Hajer et al., 2008), os quais participam da gênese e perpetuação da resposta inflamatória e resistência insulínica (Odegaard, Chawla, 2011; Lanthier, Leclercq, 2014). Nesse contexto, confirma-se uma relação intrínseca entre obesidade, inflamação, resistência insulínica e diabetes melito (Lumeng, Saltiel, 2011; Chawla et al., 2012).

Desde que os macrófagos foram encontrados e observados no tecido adiposo branco, surgiram especulações sobre a correlação positiva entre o número de macrófagos e a obesidade (Lumeng, Saltiel, 2011; Boyer et al., 2015). A hipertrofia tecidual e, conseqüente, hipóxia local, promove a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF). Este, por sua vez, leva à produção de quimiocinas que atraem monócitos ao tecido. Ainda, ácidos

graxos contribuem para o infiltrado celular no tecido adiposo (Esser et al., 2014; Castoldi et al., 2016).

Acredita-se que a exposição às citocinas produzidas no microambiente, componentes da matriz extracelular e outros fatores contribuam para alteração na distribuição e perfil funcional destas células (Olefsky, Glass, 2010; Chawla et al., 2012; Lanthier, Leclercq, 2014).

Com base nos padrões de expressão gênica, secreção de proteínas e função, os macrófagos podem ser diferenciados, na presença de interferon gama (IFN γ) ou lipopolissacarídeo (LPS), em classicamente ativados, referido como M1 (fenótipo F4/80+ CD11b+ CD11c+) que coincidem com a obesidade e circundam as células adiposas em estruturas tipo coroa (*crown-like structures*), além de promoverem a fagocitose dos lípidos remanescentes (Murano et al., 2008; Lumeng, Saltiel, 2011; Tabas, Bornfeldt, 2016). Os macrófagos M1 respondem pelo surgimento da necrose de adipócitos, aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e MCP-1) e, conseqüentemente, da resistência insulínica (Lumeng, Saltiel, 2011; Becker et al., 2012). Este fenótipo encontra-se associado à inflamação devido atividade microbicida e capacidade de degradação tecidual (Mantovani et al., 2013). Além disso, estudo recente também demonstrou que macrófagos polarizam em torno do fenótipo pró-inflamatório M1, após estímulo com diferentes concentrações de AGE, por ativar a via de transdução do AGE/RAGE/NF- κ B (Jin et al., 2015).

O fenótipo inflamatório de macrófagos no tecido adiposo vincula-se também à ativação dos adipócitos durante a hipertrofia na obesidade, bem

como ao estabelecimento do estresse do retículo endoplasmático e aumento da geração de ROS (Chawla et al., 2012). Estas duas últimas condições favorecem a ativação do inflamassoma, complexo multiproteico citosólico que consiste de NLRP (*NOD-like receptors*) e a proteína adaptadora ASC e que culmina na ativação de IL-1 β e IL-18 e piora da sensibilidade à insulina (Gordon, Martinez, 2010; Chawla et al., 2012).

O aumento do fluxo de ácidos graxos ao tecido muscular, bem como de citocinas inflamatórias, ambos provenientes do tecido adiposo, contribui para a resistência insulínica no leito muscular. A base molecular para estes eventos reside na formação de derivados de ácidos graxos, como acil-CoA, ceramidas e diacilglicerol que, graças ao estímulo da proteína cinase teta, promovem a fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em resíduos de serina, ao invés de tirosina. Isto bloqueia a sinalização do receptor de insulina, a despeito da hiperinsulinemia (Savage et al., 2007; Shulman, 2004). Sendo assim, o conteúdo inter e intramuscular de lípidos, acessado por ressonância magnética, é apontado como marcador de resistência insulínica. Por outro lado, a capacidade oxidativa da fibra muscular parece determinar seu potencial de utilização de ácidos graxos, como fonte de acetil-CoA e metabolismo ao longo do ciclo de Krebs, minimizando as ações deletérias dos ácidos graxos sobre a resistência insulínica (Goodpaster et al., 2001).

O aumento do estresse inflamatório crônico, promovido pela elevação de ácidos graxos e pela maior geração de citocinas por macrófagos do subtipo M1 que infiltram o tecido adiposo ou ativação do sistema renina angiotensina também perpetua a redução do sinal insulínico (Waki et al., 2007). A ativação

de janus cinase durante a condição inflamatória promove a fosforilação de IRS-1 em resíduos de serina, comprometendo a sinalização insulínica. No fígado, o aumento no fluxo de ácidos graxos e citocinas também favorece a resistência insulínica e a maior secreção de triglicérides nas VLDL. A dislipidemia da resistência insulínica favorece um perfil pró-aterogênico (Patel et al., 2016).

A incubação de adipócitos da linhagem 3T3-L1 com a albumina AGE promove a carbonilação de várias proteínas intracelulares, incluindo proteínas mitocondriais, o que associado à inibição do sistema proteasomal, parece promover alterações no balanço redox intracelular (Singh et al., 2007; Unoki et al., 2007; Wu et al., 2011). Em adipócitos, a interação AGE-RAGE aumenta a geração de ROS, vinculando-se à menor captação de glicose basal estimulada por insulina. Estes eventos parecem depender da cronicidade do estímulo pelos AGE e são corrigidos pelo bloqueio imunológico do RAGE e por antioxidantes, tais como N-acetilcisteína (NAC) (Unoki et al., 2007; Wu et al., 2011).

Em tecidos magros há prevalência de macrófagos alternativamente ativados, ou M2 (fenótipo F4/80+ CD11b+ CD11c-), distribuídos uniformemente pelo tecido adiposo e com perfil menos inflamatório, face à maior secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-13), aumento da expressão de arginase, proteinases e fatores imunossupressores (Wu et al., 2011; Becker et al., 2012). Este cenário contribui para angiogênese, remodelamento tecidual após injúria e melhora a sensibilidade insulínica (Gordon, Martinez, 2010; Makki et al., 2013). O estado de ativação M2 encontra-se intrinsecamente ligado à atividade do receptor ativado por

proliferador de peroxissoma (PPAR α e PPAR γ), fator de transcrição ligante dependente conhecido por regular o metabolismo lipídico e atividade mitocondrial (Odegaard, Chawla, 2011), promover a expressão de arginase e secreção de interleucinas pró-inflamatórias (Gordon, Martinez, 2010; Tabas, Bornfeldt, 2016). Assim, o efeito anti-inflamatório de macrófagos M2, aliado à secreção de sensibilizadores de insulina, parece contribuir para o melhor metabolismo glicídico no tecido adiposo (Tan et al., 2011; Chawla et al., 2012) (**Figura 3**).

Figura 3. Polarização dos macrófagos. Os macrófagos exibem perfis fenotípicos (classicamente ativado: M1 e alternativamente ativado: M2) representados pela expressão diferencial de marcadores inflamatórios e gênese da resistência insulínica. No entanto, essas células assumem capacidade de polarizarem, em amplo espectro fenotípico de transição, em resposta aos estímulos externos tais como fatores transcricionais, humorais, moléculas de sinalização, dentre outros. *In vivo*, há um perfil gradual de

diferenciação de macrófagos entre os dois subtipos, o que dificulta a caracterização exata dos tipos M1 e M2.

Os macrófagos e adipócitos não só contribuem independentemente para inflamação local como estimulam sinergicamente a atividade inflamatória (Becker et al., 2012; Hill et al., 2014). Entretanto, observa-se que a variação da resposta inflamatória em modelo experimental *in vitro* ou a influência do tratamento *in vivo* com AGE sobre o perfil fenotípico de macrófagos infiltrados em diferentes tecidos, ainda carece de maiores investigações (Boyer et al., 2015).

1.4. N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC), antioxidante derivado da cisteína, é um composto tiol formado por grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio ($C_5H_9NO_3S$) e possui peso molecular de 163,2 g/mol (Samuni et al., 2013, Lasram et al., 2015).

O crescente interesse sobre os potenciais terapêuticos da NAC deriva da sua capacidade em estimular a síntese de glutatona reduzida, que juntamente com a glutatona peroxidase, antagoniza a geração intracelular de ROS e contribui para a depuração de radicais livres (Radomska-Lesniewska et al., 2012; Samuni et al., 2013). Administrado via oral, a NAC é rápida e completamente absorvida no estômago e transportada ao fígado (Prescott, 2005; Lasram et al., 2015). Como agente mucolítico, a NAC modifica a conformação estrutural de proteínas funcionais e estado redox ao reduzir

pontes dissulfeto. Ainda, compromete a interação de proteínas aos seus receptores, observado na angiotensina II (ANGII) com receptor de Angiotensina I (AT1), uma vez que a NAC compete pelo mesmo sítio de ligação (Ullian et al., 2005; Samuni et al., 2013).

Somada à baixa toxicidade, a NAC também está associada à redução dos processos inflamatórios, disfunção endotelial, insuficiência renal crônica, injúria hepática, infarto do miocárdio, além da regulação do ciclo celular e apoptose, estresse de retículo endoplasmático, modulação de vias de sinalização, fatores transcricionais e genes, entre outros (Calzadilla et al., 2013; Shimizu et al., 2013; Machado et al., 2014; Wang et al., 2014, Liu et al., 2015).

Sendo assim, os estudos mostram o valor terapêutico promissor da NAC frente às desregulações metabólicas, principalmente quando associadas ao estresse oxidativo e inflamatório (Samuni et al., 2013; Lasram et al., 2015). No entanto, os mecanismos pelos quais a N-acetilcisteína exerce seus efeitos ainda são complexos, uma vez que este composto interage com inúmeras vias bioquímicas (Lasram et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Produtos de glicação avançada contribuem para a gênese e progressão das complicações crônicas do DM. Em macrófagos, os AGE promovem o acúmulo de esteróis o que favorece a evolução da aterosclerose. Isto se deve ao aumento da captação de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e à redução do efluxo de lípidos para as apolipoproteínas A-I (apo-AI) e lipoproteínas de densidade alta (HDL). Esses eventos vinculam-se ao aumento do estresse oxidativo e de retículo endoplasmático e à sensibilização destas células ao estresse inflamatório. No tecido adiposo, os AGE também promovem oxidação e inflamação, embora pouco seja conhecido sobre a contribuição de macrófagos infiltrados neste tecido e seu perfil de diferenciação. Em modelos animais de DM, evidencia-se aumento do estresse inflamatório em macrófagos da cavidade peritoneal (Passarelli et al., 2005; Iborra et al., 2011; Okuda et al., 2012; Castilho et al., 2012; de Souza Pinto et al., 2012; Machado-Lima et al., 2013). Entretanto, é difícil extrapolar no contexto geral do DM quais componentes, incluindo hiperglicemia, estresse oxidativo, dislipidemia, *background* genético, AGE, entre outros, contribuem para as alterações observadas. Nossa hipótese é que a administração crônica de albumina AGE, independentemente da presença de DM e vias bioquímicas suscitadas pela hiperglicemia crônica, altere o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo periepídídimo e seu perfil de diferenciação neste tecido e na cavidade peritoneal. Isto poderia modular a resistência insulínica e a progressão da aterosclerose uma vez que macrófagos podem exacerbar a

resposta inflamatória e oxidativa local e o metabolismo anormal de lípides. Inibidores da formação de AGE e/ou de sua sinalização são capazes de reagir com intermediários da reação de glicação, favorecer sua destoxificação ou reduzir o estresse oxidativo vinculado à gênese dos AGE. A N-acetilcisteína (NAC) reduz a concentração plasmática de AGE e, devido ao seu baixo custo e eficiente utilização prática clínica, poderia minimizar os efeitos deletérios dos AGE sobre o infiltrado e diferenciação de macrófagos.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito da administração crônica de albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE) em ratos saudáveis sobre: a) a sensibilidade periférica à insulina; b) o infiltrado total e o perfil de macrófagos no tecido adiposo periepídídimo; c) o transcriptoma do tecido adiposo; d) o perfil de diferenciação de macrófagos da cavidade peritoneal e e) o efeito do tratamento concomitante com N-acetilcisteína sobre os parâmetros descritos acima.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo de albumina glicada *in vitro*

Albumina de rato (A6414; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) foi modificada por glicação avançada por meio da incubação com 10 mM de glicolaldeído (Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha) dissolvido em tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; K₂PO₄ 1mmol/L) contendo EDTA (pH = 7,4). Albumina controle (albumina C) foi preparada apenas na presença de PBS/EDTA. As incubações foram realizadas sob condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37 °C, com agitação por 4 dias (**Figura 4**). A seguir, as albuminas glicada (albumina AGE) e controle (albumina C) foram dialisadas contra PBS/EDTA e esterilizadas em filtro 0,22 µm.

A concentração final de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e todas as amostras foram congeladas a -80 °C até o seu uso.

Figura 4. Reação de glicação *in vitro*. Albumina controle (albumina C) (esquerda) e Albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE) (direita) após incubação com PBS/EDTA ou glicolaldeído 10 mM,

respectivamente. A coloração evidencia a reação de escurecimento ou glicação promovida pela ligação de oxoaldeído reativo glicolaldeído com a albumina.

4.2. Determinação do conteúdo de AGE

O conteúdo de AGE total foi determinado nas amostras de albumina C e albumina AGE por método de imunoensaio enzimático ELISA (Estuche de ELISA para la cuantificación de Productos Finales de Glicación Avanzada, Lamider SA, México DF., México), de acordo com instruções do fabricante.

As mesmas amostras também foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massa (LC-MS/MS) para avaliação das concentrações de pirralina e carboximetil-lisina (CML) (Rabbani et al., 2014).

4.3. Protocolo experimental

Os protocolos experimentais encontram-se de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 002/14).

Ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com um mês de idade e peso corporal de aproximadamente 200 g, foram obtidos do Departamento Técnico de Apoio ao Ensino e Pesquisa (DTAEP) e mantidos em biotério convencional com ciclo claro-escuro (12/12 h) e temperatura entre 22 ± 2 °C, com livre acesso à água e ração convencional (*ad libitum*).

Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais e receberam injeções intraperitoneais diárias de 20 mg/Kg de peso corporal (Coughlan et al., 2011) de albumina controle (albumina C) ou albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE), concomitante ou não à administração de N-acetilcisteína (NAC), albumina C + NAC e albumina AGE + NAC. O tratamento efetuou-se durante 90 dias consecutivos com a correção semanal, em relação ao ganho de peso corporal, do volume de albumina C ou albumina AGE injetado nos animais. A N-acetilcisteína (Sigma A7250; Sto Louis, Missouri, USA) foi administrada na concentração 600 mg/L de água fornecida *ad libitum* (**Figura 5**).

Foram monitorados a massa corporal, consumo alimentar, concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, glicose, insulina, ácidos graxos livres, marcadores de lesão renal (ureia, creatinina e proteinúria) e hepática (alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase) e parâmetros urinários oxidativos (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS). O teste de tolerância à insulina (ITT) e a medida da pressão arterial sistólica (PAS) foram realizados apenas ao final do protocolo experimental.

Figura 5. Desenho experimental. Ratos da linhagem Wistar com 1 mês de idade foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais, os quais receberam injeção intraperitoneal diária de albumina controle (C) ou albumina AGE (20 mg/Kg/dia), concomitante ou não a administração de NAC (600mg/L de água), durante 90 dias.

4.4. Dosagens bioquímicas

Após período de 12 h em jejum, amostras de sangue total (500 μ L) foram coletadas da veia caudal, centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 min, a 4°C para obtenção de soro ou plasma e estocadas a -20 °C até o momento da dosagem. Colesterol total (CT), triglicérides (TG), ácidos graxos livres, ureia, creatinina, proteinúria, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase foram avaliados utilizando-se *kits* comerciais colorimétricos (Labtest, Brasil e Randox, UK), de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de glicose e de insulina foram determinadas por meio de glicosímetro *Accu Check*

Performa (Roche, São Paulo, Brasil) e ensaio imunoenzimático – ELISA (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), respectivamente.

4.5. Teste de tolerância à insulina (ITT)

Ao término das 12 sem do protocolo, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (60 mg/Kg de peso corporal - Cristália, São Paulo, Brasil) e amostras de sangue total obtidas previamente e a cada 4 minutos (0, 4, 8, 12 e 16 min) após a administração intravenosa (veia peniana) de insulina (0,075 U/Kg - Biobras S.A, Montes Claros, MG, Brasil).

A constante de decaimento da glicose no sangue durante o ensaio (kITT), baseia-se na regressão linear do logaritmo neperiano das concentrações de glicose obtidas entre os tempos 0 e 16 min. Ressalta-se que os valores referentes ao tempo 0 correspondem aos valores de glicose de animais alimentados há 2 h (Campello et al., 2012).

4.6. Coleta de urina

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, apropriadas para ratos, onde foram mantidos durante 24 h com livre acesso à água, água + NAC e ração. Após este período, amostras de urina foram coletadas e centrifugadas a 2500 rpm, por 15 min, para determinação de proteinúria e concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcador de peroxidação lipídica.

4.7. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As concentrações urinárias de TBARS foram determinadas conforme Ohkawa et al. (1979), onde se diluiu 200 µL de urina em 0,8 mL de água destilada, 1 mL de ácido tricloroacético (TCA 17,5%) e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBARS 0,6%; pH = 2). No primeiro momento, as amostras permaneceram em banho de água fervente, por 15 min, e em seguida resfriadas. Acrescentou-se 1 mL de TCA 70% e foram incubadas por 20 min. As amostras foram centrifugadas por 15 min, a 2000 rpm e a densidade óptica do sobrenadante lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 534 nm contra um branco reagente. A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada pelo coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em nmol/24 h.

4.8. Medida da pressão arterial sistólica caudal (PAS)

A pressão arterial foi medida pelo método oscilométrico e os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. A medida foi realizada em equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2045 – Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, EUA), o qual fornece um sinal analógico. Este sinal foi convertido, digitalizado e registrado utilizando-se o programa *DASYLab 7.0* (DASYTec, National Instruments Company, Amherst, New Hampshire, EUA).

Foram consideradas apenas as medidas de pressão arterial sistólica obtidas na ausência de movimentação do animal, por meio da média de seis aferições durante dois dias consecutivos.

4.9. Obtenção de células e tecidos dos animais

Após 12 sem de tratamento, foram coletados sangue, macrófagos peritoneais e tecido adiposo periepídimal para a realização das análises, além de rins, fígado, pâncreas, músculo sóleo e coração como parte do projeto temático. Para este objetivo, realizou-se analgesia preventiva, utilizando-se cloridrato de tramadol (12,5 mg/kg de peso corporal - Teuto, São Paulo, Brasil), via subcutânea, 1 hora antes da administração do anestésico. Em seguida, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (60 mg/Kg de peso corporal - Cristália, São Paulo, Brasil).

4.10. Obtenção de macrófagos peritoneais

Macrófagos foram isolados da cavidade peritoneal após lavagem com 120 mL de PBS estéril (pH = 7,4), acrescido com penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As células foram centrifugadas 1500 rpm por 2 min para obtenção do botão celular (Iborra et al., 2011; Castilho et al., 2012; de Souza Pinto et al., 2012; Okuda et al., 2012; Machado-Lima et al., 2013), o qual foi apropriadamente mantido em solução de

Trizol™ (Invitrogen, Life Technologies, EUA) para posterior análises de expressão gênica.

4.11 Obtenção do tecido adiposo periepididimal

O tecido adiposo periepididimal, modelo de gordura visceral, foi removido, lavado em solução fisiológica, pesado em balança analítica e fracionado para as análises de histomorfometria, imunohistoquímica e expressão gênica. O peso do tecido foi registrado e os resultados expressos em relação ao peso corporal.

4.11.1. Histomorfometria

Amostras de tecido adiposo periepididimal foram imersas em solução fixadora de formol tamponado (10 %) por 24 h. Após esse período, transferidas para solução de etanol 70 % por 48 h, emblocadas em parafina, seccionadas transversalmente (cortes com 3-4 μm de espessura) e coradas com Hematoxilina & Eosina (HE). As medidas de fração de área e volume dos adipócitos foram estimadas a partir de imagens microscópicas obtidas randomicamente de 10 campos em aumento de 400X.

Análises quantitativas foram realizadas por método estereológico de contagem de pontos, que consiste num retículo formado por 100 pontos e 50 retas (área: 1250 μm^2), sobreposto às imagens e acoplado a um microscópio óptico (Olympus BX 51, EUA) (Gundersen et al., 1988) (**Figura 6**).

Figura 6. Método de contagem estereológica. Imagem representativa do método de contagem de pontos e retas por meio do retículo adaptado ao microscópio óptico. A fração de área e volume dos adipócitos podem ser determinados a partir de pontos e retas, respectivamente, que incidem sobre essas células.

4.11.2. Imuno-histoquímica e quantificação de marcadores

Cortes histológicos foram submetidos à desparafinização com xilol aquecido a 60 °C durante 15 min, seguido por mais três banhos de 10 min, à temperatura ambiente. Após esse processo, realizou-se a hidratação dos mesmos por meio de lavagens com álcool etílico em diferentes concentrações (70 a 100 %), ácido fórmico e água. A recuperação dos sítios antigênicos foi obtida com auxílio de Citrato 10 mM, pH = 6, 125 °C por 1 min. Em seguida, realizou-se bloqueio da peroxidase e imunomarcção com anticorpos específicos para determinação do infiltrado de macrófagos (F4/80; 1:100) e

perfil de diferenciação dessas células em M1 (CD11b; 1:200) e M2 (CD206; 1:1250) (Abcam, Cambridge, UK), de acordo com instruções do fabricante.

Posteriormente, imagens digitais foram obtidas, estimadas pelo software *Image Pro-Plus 6.0* (Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) e analisadas por observador, às cegas, em 20 campos randomizados com aumento de 400X. A quantificação dos marcadores foi realizada por método estereológico de contagem de pontos em retículo formado por 100 pontos (área: 62,500 μm^2) (**Figura 7**). A porcentagem (P) de pontos marcados no compartimento de referência para cada anticorpo foi expressa de acordo com a fórmula: $P = (P_i \times 100)/P_t$, onde **P_i** corresponde ao número de pontos que incide sobre a marcação positiva por imunohistoquímica e **P_t** ao número total de pontos analisados. Considerou-se a porcentagem (P) de cada anticorpo a soma dos resultados de todos os campos analisados para cada amostra (Gundersen et al., 1988).

Figura 7. Método de contagem estereológica do infiltrado de macrófagos. Imagem representativa da análise de macrófagos infiltrados no tecido adiposo periepididimal por método estereológico de contagem de pontos por meio de retículo.

4.12. Análise da expressão gênica

4.12.1. Extração de RNA

O RNA total dos macrófagos peritoneais e do tecido adiposo periepididimal foi isolado utilizando-se 1 mL de Trizol™ (Invitrogen, Life Technologies, EUA). Amostras foram precipitadas com 200 µL de cloróformio (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), seguida de agitação por 15 s e centrifugação 14800 rpm por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para tubos isentos de RNase. Volume de 400-500 µL de etanol 70 % foi adicionado às amostras e transferidas para as colunas de

purificação *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e extraídas de acordo com as instruções do fabricante. Este estojo comercial permite extrair moléculas de RNA por meio de sua adesão à membrana de sílica da coluna e dispensa o tratamento com DNase, pois a membrana remove eficientemente a maior parte do DNA contaminante.

Ao final do protocolo, análises quantitativas e qualitativas do RNA foram realizadas simultaneamente utilizando-se o *kit RNA 6000 Nano Bioanalyzer* (Agilent Technologies, EUA). A **Figura 8** representa o padrão de bandas formado após ensaio e a concentração de RNA até 50 ng/μL.

Figura 8. Análise da integridade do mRNA. Amostras de mRNA do tecido adiposo periepididimal **(A)** e de macrófagos peritoneais **(B)** foram avaliadas por meio do sistema *Bioanalyzer*. A presença das bandas 18S e 28S, correspondentes ao RNA ribossomal, indicam a integridade do material. Foram selecionadas as amostras que apresentaram RIN (*RNA integrity number*) acima de 7.

4.12.2. Síntese do DNA complementar (cDNA) e Análises quantitativas por PCR em tempo real (RT-qPCR)

A partir da concentração de 100 ng do RNA total de macrófagos peritoneais e do tecido adiposo periepididimal, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada segundo instruções de *kit* comercial *Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O cDNA obtido foi utilizado para avaliar o padrão quantitativo de expressão gênica em tempo real por meio do sistema de detecção *Taqman* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que consiste no uso de sondas fluorescentes que se ligam especificamente a uma região interna do produto da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Inicialmente, realizou-se a seleção de genes normalizadores que atuam como controles internos em reações de RT-qPCR. Estes genes removem ou reduzem as diferenças da amostragem relacionadas à quantidade e qualidade do RNA extraído (Cai et al., 2007; Elakovic et al. 2012). Foram selecionados os genes *Hprt1* e *Actb* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), empregados, respectivamente, para análise do tecido adiposo periepididimal e de macrófagos peritoneais. A fim de avaliar a estabilidade da expressão desses genes utilizou-se o programa *Leonxie* (**Figura 9**).

Figura 9. Seleção de genes normalizadores. A expressão dos genes *Actb*, *Gapdh*, *Hprt1* e *Tbp* foi avaliada quanto a estabilidade em amostras de mRNA de tecido adiposo periepídido e macrófagos. Os genes *Hprt1* (A) e *Actb* (B) apresentaram menor variação e maior índice de estabilidade.

As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* e submetidas aos seguintes ciclos: (1) um ciclo de 2 min a 50 °C; (2) um ciclo de 10 min a 95°C; (3) quarenta ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados pelo software *StepOne versão 2.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), o qual fornece o valor de Ct (*Threshold cycle*, número do ciclo no qual o produto da PCR atinge um limiar de detecção). A eficiência de amplificação dos genes-alvo e dos normalizadores permitiu a utilização do modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene normalizador}$ (Livak et al., 2001). Determinou-se a expressão relativa do mRNA de genes-alvo associados ao eixo AGE-RAGE e inflamatórios além dos normalizadores (*Actb* e *Hprt1*) de acordo com o grupo albumina C, o qual foi utilizado como calibrador.

Na tabela 1 encontram-se listadas as sondas utilizadas nos ensaios de expressão gênica. Foram selecionadas aquelas que amplificam junções exônicas a fim de reduzir o impacto de contaminação por DNA.

Tabela 1. Genes e respectivas sondas utilizadas na análise de expressão gênica

Genes	Sondas (Applied Biosystem)
Ager (advanced glycosylation end product-specific receptor)	Rn01525753_g1
Ddost (dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase)	Rn01518759_m1
Nfkb1 (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells)	Rn01399583_m1
Tnf (tumor necrosis fator)	Rn01525859_g1
Il6 (interleukin 6)	Rn01410330_m1
Il10 (interleukin 10)	Rn00563409_m1
Il12 (interleukin 12)	Rn00584538_m1
Ppara (peroxisome proliferator activated receptor alpha)	Rn00566193_m1
Slc2a4 (solute carrier family 2 - facilitated glucose transporter- member 4)	Rn00562597_m1
Adipoq (adiponectin, C1Q and collagen domain containing)	Rn00595250_m1
Cd36 (CD36 molecule - thrombospondin receptor)	Rn00580728_m1
Retn (resistin)	Rn00595224_m1
Itgam (integrin, alpha M)	Rn00709342_m1
Mrc1 (mannose receptor, C type 1)	Rn01487342_m1
Arg1 (arginase 1)	Rn00691090_m1

continua

<i>Nos2</i> (nitric oxide synthase 2, inducible)	Rn00561646_m1
<i>Col4a1</i> (collagen, type IV, alpha 1)	Rn01482927_m1
<i>Col4a2</i> (collagen, type IV, alpha 2)	Rn01482133_m1
<i>Col5a1</i> (collagen, type IV, alpha 2)	Rn00593170_m1
<i>Col12a1</i> (collagen, type XII, alpha 1)	Rn01521220_m1
<i>Itg8</i> (Integrin, beta 8)	Rn02106015_u1
<i>Actb</i> (actin, beta)	Rn00667869_m1
<i>Hprt1</i> (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1)	Rn01527840_m1

4.12.3. Sequenciamento e análise do transcriptoma no tecido adiposo periepididimal

A análise do transcriptoma do tecido adiposo periepididimal foi realizada como tentativa de exploração em maior escala dos efeitos dos AGE sobre a expressão gênica no tecido adiposo. Esta técnica contribui para a identificação do transcriptoma, conjunto completo de transcritos (RNA total codificante e não-codificante) de uma célula num estágio específico do desenvolvimento ou condição fisiológica (Wang et al., 2009; Nagalakshimi et al., 2010).

A partir do mRNA dessas mesmas amostras, uma biblioteca formada por fragmentos de cDNA, acoplados a adaptadores (bases de DNA), foi construída com auxílio de *kit* comercial *TruSeq® Stranded Total RNA with Ribo Zero Gold* (Illumina) e sequenciada em larga escala no aparelho *HiSeq® 2500 Sequencing System* (Illumina). Por fim, gerou-se uma

sequência de leituras as quais foram alinhadas ao genoma de referência HG38, criando-se um mapa em escala genômica (Wang et al., 2009) (**Figura 10**).

Figura 10. Sequenciamento do mRNA do tecido adiposo periepididimal. Método de detecção do transcriptoma de amostras do tecido adiposo periepididimal dos animais tratados com albumina controle (C) ou albumina AGE, concomitante ou não ao tratamento com NAC, por meio da técnica RNA-seq. Figura adaptada: Wang et al., 2009.

Posteriormente, utilizou-se o *DESeq2* para analisar a expressão dos genes diferencialmente expressos entre os grupos C e AGE. Segundo a lista

total de genes obtidos ($n = 19.000$), ajustou-se o sinal de significância por *fold-change* na escala 0,4.

Para avaliação global e de vias metabólicas utilizou-se o *software WebGestalt (WEB-based Gene Set Analysis Toolkit)*, o qual inclui o banco de dados *Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – 2011)*. Esse por sua vez, relaciona as enzimas e os compostos envolvidos nas principais vias metabólicas (Top 10). A partir destas vias, realizou-se o enriquecimento das mesmas por meio do *software GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)* a fim de se obter mapas de expressão gênica.

Para corroborar os dados, utilizou-se o banco de dados *STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes)*, o qual determina possíveis interações proteicas (Szklarczyk et al., 2015). Nessa análise foram excluídos micro-RNAs, pseudogenes e genes com sinal de *p-value* acima de 0,1. Desse modo, destacaram-se apenas genes hipo ou hiperexpressos em comum entre os grupos experimentais, os quais foram subsequentemente validados por RT-qPCR.

4.13. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *GraphPad Prism*, versão 5 (*GraphPad Software, EUA*), utilizando a análise de variância de um fator (*one way-ANOVA*) seguida do teste de Newman-Keuls para comparação entre todos grupos. A análise de variância de dois fatores (*two way-ANOVA*) foi empregada para avaliar a evolução ponderal. Dados não

paramétricos foram determinados a partir do teste Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunns. Os resultados encontram-se expressos como média $\pm$ erro padrão (EP) e foram considerados significantes quando o nível descritivo de significância foi inferior a 5 % ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

A concentração total de AGE na albumina de rato modificada *in vitro* por glicolaldeído (albumina AGE) foi 9,2 vezes maior (62,8 mU de AGE/ μ g de albumina) em comparação à albumina C (6,8 mU de AGE/ μ g de albumina) (Figura 11).

Figura 11. Concentração de AGE total na albumina de rato. O conteúdo total de AGE foi mensurado na albumina submetida à glicação avançada *in vitro*, por meio da incubação com glicolaldeído 10 mM (albumina AGE) e albumina controle (albumina C), incubada apenas na presença de PBS, conforme descrito em Material e Métodos. Utilizou-se ensaio imunoenzimático (Estuche de ELISA para la cuantificación de Productos Finales de Glicación Avanzada, Lamider SA, Mexico DF., Mexico) conforme instruções do fabricante.

O conteúdo de carboximetil-lisina (CML; nmol/mmol de lisina), determinado por espectrometria de massa, foi aproximadamente 7000 vezes maior na albumina AGE ($7395 \pm 98,4$; $p < 0,0001$) em comparação à albumina C (Figura 12A). De modo semelhante, o conteúdo de pirralina (nmol/mmol de

lisina) foi 235 vezes maior na albumina AGE ($3016 \pm 79,7$; $p < 0,0001$) em comparação à albumina C ($12 \pm 5,9$) (**Figura 12B**).

Figura 12. Conteúdo de carboximetil-lisina (CML) e pirralina (PYR) na albumina de rato. O conteúdo de CML (**A**) e pirralina (**B**) foi mensurado na albumina submetida à glicação avançada *in vitro*, por meio da incubação com glicolaldeído 10 mM (albumina AGE) e albumina controle (albumina C), incubada apenas na presença de PBS, conforme descrito em Material e Métodos. Após diálise, as albuminas C e AGE foram digeridas e analisadas por espectrometria de massa (LC-MS/MS). Resultados expressos em nmol de AGE/mmol de lisina foram comparados pelo teste t de *Student* não pareado ($n = 3$).

A média do consumo diário de ração não diferiu entre os grupos experimentais (**Figura 13**).

Figura 13. Consumo diário de ração. O consumo alimentar dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC foi determinado semanalmente e obtida a diferença entre a quantidade de ração oferecida e a ração excedente. Em seguida, dividiu-se o valor obtido pelo número de animais alocados por gaiola. Resultados expressos como média $\pm$ EP foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

A evolução ponderal dos animais que receberam albumina C e albumina AGE foi semelhante ao longo do estudo, conforme evidenciado na **Figura 14**.

Figura 14. Evolução ponderal dos animais tratados com albumina C ou albumina AGE na presença ou ausência de N-acetilcisteína. A massa dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC foi monitorado semanalmente durante o protocolo experimental. Resultados expressos como média $\pm$ EP foram comparados por ANOVA de dois fatores com pós-teste Bonferroni.

A pressão arterial sistólica caudal, aferida apenas no final do protocolo, foi semelhante entre todos os grupos experimentais (**Figura 15**).

Figura 15. Pressão arterial sistólica. A medida da pressão arterial sistólica (mmHg) foi aferida na cauda dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC, previamente aquecidos 37 °C durante 10-15 min, pelo método oscilométrico em equipamento acoplado a um transdutor de pressão. Resultados expressos como média $\pm$ EP foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

As concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicérides, glicose, insulina, ácidos graxos livres, ureia, creatinina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e concentração urinária de proteína em 24 h foram semelhantes entre os grupos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Perfil bioquímico dos animais tratados com albumina C ou albumina AGE concomitante ou não a administração de N-acetilcisteína após 90 dias de tratamento.

	albumina C (n = 8)	albumina C + NAC (n = 7)	albumina AGE (n = 8)	albumina AGE+NAC (n = 7)
Colesterol Total (mg/dL)	69 (61-77)	73 (63-97)	69 (49-101)	71 (51-83)
Triglicérides (mg/dL)	41 (27-80)	41 (25-70)	36 (29-68)	26 (23-42)
Glicose (mg/dL)	114 ± 5,0	115 ± 3,0	112 ± 3,8	117 ± 4,2
Insulina (ng/dL)	1,2 (0,3-3,0)	1,8 (1,1-2,5)	1,3 (0,9-2,9)	1,4 (0,9-2,9)
Ácidos graxos livres (mg/dL)	0,3 (0,1-0,5)	0,4 (0,1-0,6)	0,3 (0,1-0,4)	0,4 (0,1-0,4)
Ureia (mg/dL)	44 ± 2,7	43 ± 1,4	49 ± 3,5	44 ± 2,3
Creatinina (mg/dL)	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,05	0,3 ± 0,05	0,3 ± 0,05
Alanina aminotransferase (U/L)	38 (28-67)	30 (26-54)	42 (33-55)	35 (30-65)
Aspartato aminotransferase (U/L)	88 (65-124)	96 (61-123)	84 (63-146)	107 (57-133)
Proteinúria (mg/24h)	8,0 ± 0,8	9,0 ± 1,6	9,0 ± 1,1	9,0 ± 1,5

Os resultados expressos como média ± EP ou mediana (intervalo) foram comparados por ANOVA de um fator seguido do pós-teste Newman-Keuls ou Kruskal-Wallis seguido do pós-teste Dunns, respectivamente.

A concentração urinária de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/24h), indicativa de peroxidação lipídica, foi semelhante entre os animais do grupo albumina C e albumina AGE. Entretanto, foi menor nos animais tratados com albumina AGE + NAC ($72,8 \pm 4,9$; $p = 0,04$ em comparação aqueles tratados com albumina AGE ($102 \pm 10,4$) e albumina C+NAC (**Figura 16**).

Figura 16. Concentração urinária de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol/24 h) foi determinada na urina dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC, por meio da incubação com os ácidos tricloroacético e tiobarbitúrico em diferentes concentrações e leitura por espectrometria com comprimento de onda em 534 nm. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP e comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

Por meio do teste de tolerância à insulina, observou-se menor taxa de decaimento da glicose nos animais tratados com albumina AGE ($2,55 \pm 0,27$) em comparação à albumina C ($3,48 \pm 0,29$; $p < 0,05$). Este evento foi prevenido

pela administração de NAC no grupo AGE+NAC ($3,79 \pm 0,22$), o qual foi semelhante ao seu respectivo grupo controle (C + NAC) e maior em comparação ao grupo albumina AGE (**Figura 17**).

Figura 17. Análise da constante de decaimento da glicose. O teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado nos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC, como a porcentagem de decaimento da glicose por minuto (kITT; %/min), após administração intravenosa (veia peniana) de insulina na concentração de 0,075 U/Kg. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EP, foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

Não se observou diferença no peso do tecido adiposo periepididimal entre os grupos experimentais (**Figura 18A**). Comportamento similar foi verificado nas medidas de fração de área e volume dos adipócitos, ambas realizadas por estereologia (**Figura 18B-C**).

Figura 18. Caracterização do tecido adiposo periepididimal. Em (A), a massa do tecido adiposo periepididimal, obtida dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC, foi determinada em relação a massa corporal. Em (B), a análise dos adipócitos, fração de área (%) e (C) volume (μm^3), foi estimada a partir de imagens microscópicas em aumento de 400X com auxílio de retículo de 100 pontos e 50

retas sobreposto às mesmas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP e comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

Maior porcentagem de células com imunomarcção positiva para F4/80 foi observada no tecido adiposo dos animais tratados com albumina AGE (76,1 $\pm$ 5,0) em relação ao grupo C (60 $\pm$ 3,7; $p = 0,03$), o que foi reduzido nos animais tratados com albumina AGE + NAC (57,3 $\pm$ 4,3; $p = 0,03$) (**Figura 19A-B**).

A

B

Figura 19. Imuno-histoquímica para F4/80 no tecido adiposo periepididimal. Secções do tecido adiposo periepididimal foram avaliadas por imuno-histoquímica com anticorpo F4/80 (Abcam, 1:100), conforme descrito em Materiais e Métodos, para determinação do infiltrado de macrófagos. Em (A), imagens representativas da imunomarcacão para F4/80, com destaque as setas que indicam a positividade da reacção. Aumento 400X. Em (B), representação gráfica da percentagem da imunomarcacão, determinada por estereologia de contagem de pontos, dos animais tratados com albumina C, albumina C+NAC, albumina AGE e albumina AGE+NAC. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP e comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

A expressão dos marcadores CD11b (**Figura 20A-B**) e CD206 (**Figura 21A-B**) não diferiu entre os grupos experimentais.

A **B**

Figura 20. Imuno-histoquímica para CD11b no tecido adiposo periepídidimo. Secções do tecido adiposo periepídidimo foram avaliadas por imuno-histoquímica com anticorpo CD11b (Abcam, 1:200), conforme descrito em Materiais e Métodos, para determinação de macrófagos do tipo M1. Em (A), imagens representativas da imunomarcagem para CD11b, com destaque as setas que indicam a positividade da reação. Aumento 400X. Em (B), representação gráfica da percentagem da imunomarcagem, determinada por estereologia de contagem de pontos, dos animais tratados com albumina C, albumina C+NAC, albumina AGE e albumina AGE+NAC. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP e comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

A

B

Figura 21. Imuno-histoquímica para CD206 no tecido adiposo periepídidimo. Secções do tecido adiposo periepídidimo foram avaliadas por imuno-histoquímica com anticorpo CD206 (Abcam, 1:1250), conforme descrito em Materiais e Métodos, para determinação de macrófagos do tipo M2. Em (A), imagens representativas da imunomarcagem para CD206, com destaque as setas que indicam a positividade da reação. Aumento 400X. Em (B), representação gráfica da porcentagem da imunomarcagem, determinada por estereologia de contagem de pontos, dos animais tratados com albumina C, albumina C+NAC, albumina AGE e albumina AGE+NAC. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EP e comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls.

Ainda no tecido adiposo periepídidimo avaliou-se a expressão de genes associados ao eixo AGE/RAGE, inflamação, polarização de macrófagos infiltrados e transporte de glicose. Não houve alteração na expressão de *Ager* (que codifica o receptor de AGE, RAGE) (**Figura 22A**), *Ddost* (receptor AGER-1) (**Figura 22B**) e *Cd36* (**Figura 22C**) no tecido adiposo de animais tratados com albumina AGE em comparação à albumina C.

Figura 22. Expressão relativa de genes do eixo AGE-RAGE no tecido adiposo periepididimal. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Ager*, *Ddost* e *Cd36*, corrigida pelo gene endógeno *Hprt1*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de tecido adiposo periepididimal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de

expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct$ gene alvo - Ct gene endógeno. Em (A) e (C), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP); Em (B), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

Comparando-se os animais tratados com albumina AGE e aqueles com albumina C, não se observou diferença na expressão gênica de *Nfkb1*, *Il6*, *Il10* e *Tnf* (Figura 23A-D).

Figura 23. Expressão relativa de genes do eixo inflamatório no tecido adiposo periepididimal. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Nfkb1*, *Il6*, *Il10* e *Tnf*, corrigida pelo gene endógeno *Hprt1*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de tecido adiposo periepididimal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A) e (D), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP); Em (B) e (C), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

O impacto dos AGE sobre os marcadores de polarização de macrófagos infiltrados no tecido adiposo periepididimal também foi analisado nos grupos experimentais. A expressão dos genes *Nos2* (óxido nítrico sintase 2) (**Figura 24A**) e *Il12* (interleucina 12) (**Figura 24B**), ambos marcadores de M1, foi semelhante entre os grupos. A expressão de mRNA do *Itgam* (Cd11b, marcador de M1) foi menor no grupo AGE + NAC ($0,40 \pm 0,01$) em comparação

aos grupos C + NAC ($0,82 \pm 0,1$; $p = 0,001$) e AGE ($0,74 \pm 0,1$; $p = 0,01$) (Figura 24C).

Figura 24. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M1) infiltrados no tecido adiposo periepididimal. A

quantificação relativa do mRNA dos genes *Itgam*, *Nos2* e *Il12*, corrigida pelo gene endógeno *Hprt1*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de tecido adiposo periepididimal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A) e (C), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP); Em (B), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

Aumento do conteúdo do mRNA do *Ppara* (PPAR alfa) foi observado nos animais tratados com albumina AGE + NAC ($2,16 \pm 0,2$; $p = 0,2$) em comparação aos grupos albumina AGE ($0,65 \pm 0,03$) e albumina C + NAC ($0,97 \pm 0,02$; $p = 0,03$) (**Figura 25A**). A expressão do mRNA de *Mrc1* (receptor de manose tipo 1 - marcador de M2) também diferiu entre os grupos experimentais albumina AGE ($1,08 \pm 0,1$) e AGE + NAC ($0,72 \pm 0,4$; $p = 0,001$) (**Figura 25B**). Além disso, o último grupo também apresentou menor expressão em relação aos animais tratados com albumina C + NAC. A expressão de *Arg1* (arginase - marcador de M2) não diferiu entre os grupos experimentais (**Figura 25C**).

Figura 25. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M2) no tecido adiposo periepídidimo. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Ppara*, *Mrc* e *Arg1*, corrigida pelo gene endógeno *Hprt1*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de tecido adiposo periepídidimo dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e

albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP).

O mRNA de *Adipoq* (adiponectina) (**Figura 26A**) e *Retn* (resistina) (**Figura 26B**) foi semelhante entre os grupos experimentais. Por outro lado, animais tratados com albumina AGE + NAC apresentaram aumento na expressão do gene *Slc2a4*, o qual codifica o transportador de glicose-4 (GLUT-4), quando comparados aos grupos AGE ($0,79 \pm 0,1$; $p = 0,005$) e C + NAC ($1,14 \pm 0,1$; $p = 0,03$) (**Figura 26C**).

Figura 26. Expressão relativa de genes associados à sensibilidade insulínica no tecido adiposo periepididimal. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Adipoq*, *Retn* e *Slc2a4*, corrigida pelo gene endógeno *Hprt1*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de tecido adiposo periepididimal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A) e (B), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP); Em (C), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

Na análise de vias realizada por *software* e banco de dados específico (*Webgestalt-Kegg*), a categoria funcional de maior enriquecimento refere-se à de componentes de matriz extracelular, predominantemente representadas pela família do colágeno e integrinas. Tal resultado foi simultaneamente avalizado pelo *software STRING* 9.0, cujo mapa de interações gênicas e proteicas encontra-se ilustrado na **Figura 27**.

Figura 27. Rede de interações formada por genes/proteínas diferencialmente expressos em amostras do tecido adiposo periepididimal. Identificação de redes de interações de genes e proteínas diferencialmente expressos ($p\text{-value} > 0,01$) nos grupos experimentais tratados apenas com as albuminas C ou AGE. Mapa de interação obtido a partir do software *STRING 9.0*.

As diferenças na expressão gênica observadas no estudo do transcriptoma foram validadas por RT-qPCR. A expressão do mRNA de *Irf10* (**Figura 23C**) e *Nos2* (**Figura 24A**) não foi alterada pelo tratamento com o AGE. Destaca-se que a quantificação destes genes já havia sido realizada. Também não houve alteração na expressão do *Col4a1* (colágeno tipo IV cadeia alfa 1) (**Figura 28A**) *Col4a2* (colágeno tipo IV cadeia alfa 2) (**Figura 28B**), *Col5a1* (colágeno tipo V cadeia alfa 1) (**Figura 28C**), *Col5a3* (colágeno tipo V cadeia alfa 3) (**Figura 28D**) e *Itg8* (integrina beta-8) (**Figura 28F**) entre os grupos albumina C e AGE. No entanto, o tratamento com albumina AGE ($3,10 \pm 0,4$; $p = 0,002$) aumentou o conteúdo do mRNA do *Col12a1* (colágeno tipo XII cadeia alfa 1) em relação à albumina C ($1,00 \pm 0,1$) (**Figura 28E**).

Figura 28. Validação do mRNA de componentes de matriz extracelular no tecido adiposo periepididimal. A quantificação relativa do mRNA de componentes de matriz extracelular (*Col4a1*, *Col4a2*, *Col5a1*, *Col5a3*, *Col12a1*, *Itg8*), corrigida pelo gene endógeno *Hprt1*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de tecido adiposo periepididimal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão

calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em **(A)**, os resultados foram comparados por Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)]; Em **(B-F)**, ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP).

O perfil de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos ratos também foi determinado, após tratamento com albumina AGE. Nesse sentido, avaliou-se a expressão de genes associados ao eixo AGE-RAGE, inflamatórios e de diferenciação em M1 e M2.

Não se observou diferença no conteúdo de mRNA de *Ager* entre os grupos experimentais **(Figura 29A)**. Em contrapartida, animais tratados com albumina AGE ($1,40 \pm 0,02$; $p = 0,01$) apresentaram maior expressão de *Ddost* (receptor AGE-R1) em comparação à albumina C ($1,00 \pm 0,002$). Resultado similar foi observado quando se comparam os grupos tratados com NAC, com maior expressão de *Ddost* nos animais AGE + NAC ($1,45 \pm 0,02$; $p = 0,02$) em comparação aos C + NAC ($1,18 \pm 0,02$) **(Figura 29B)**. A expressão do receptor *Cd36* não foi alterada mediante tratamento com AGE **(Figura 29C)**.

Figura 29. Expressão relativa de genes do eixo AGE-RAGE em macrófagos peritoneais. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Ager*, *Ddost* e *Cd36*, corrigida pelo gene endógeno *Actb*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde

$\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP); Em (B) e (C), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

A expressão de *Nfkb1* permaneceu inalterada nos animais tratados com ambas albuminas, C e AGE (Figura 30A). Quanto aos efetores de resposta inflamatória, observou-se aumento na expressão de *Il6* nos animais do grupo AGE ($2,58 \pm 0,06$; $p = 0,03$) em relação ao grupo C ($1,00 \pm 0,02$) (Figura 30B). Os genes *Il10* (Figura 30C) e *Tnf* (Figura 30D) não diferiram entre os grupos experimentais.

Figura 30. Expressão relativa de genes do eixo inflamatório em macrófagos peritoneais. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Nfkb1*, *Il6*, *Il10* e *Tnf*, corrigida pelo gene endógeno *Actb*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A) e (B), os resultados foram comparados por Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)]; Em (C) e (D), ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP).

O conteúdo do mRNA de genes associados à polarização de macrófagos para os subtipos M1 e M2 também foi determinado. A expressão de *Il12* (Figura 31A), *Nos2* (Figura 31B) e *Itgam* (Figura 31C), vinculados ao subtipo M1, não diferiu entre os grupos experimentais.

Figura 31. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M1) peritoneais. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Itgam*, *Nos2* e *It12*, corrigida pelo gene endógeno *Actb*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde

$\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$ EP); Em (B) e (C), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

Não se observou diferença na expressão do gene *Mrc1* entre os grupos experimentais (Figura 32 A). Por sua vez, a NAC contribuiu significativamente no aumento do conteúdo do *Arg1* em ambos grupos, C ($2,46 \pm 0,07$; $p = 0,04$) e AGE ($1,35 \pm 0,02$; $p = 0,02$) (Figura 32B).

Figura 32. Expressão relativa de genes associados à polarização de macrófagos (M2) peritoneais. A quantificação relativa do mRNA dos genes *Mrc* e *Arg1*, corrigida pelo gene endógeno *Actb*, foi determinada por Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para tanto, utilizou-se sondas Taqman (*Applied Biosystems*) nas amostras de macrófagos isolados da cavidade peiritoneal dos animais tratados com albumina C, albumina C + NAC, albumina AGE e albumina AGE + NAC. Valores de expressão calculados a partir de modelo matemático $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno}$. Em (A), os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste Newman-Keuls (média $\pm$

EP); Em (**B**), Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn [mediana (intervalo)].

6. DISCUSSÃO

Produtos de glicação avançada (AGE) associam-se, independentemente com o desenvolvimento e progressão das complicações ao longo prazo do DM (Brownlee, 2001, Ahmed, 2005; Peppas, Vlassara, 2005; Furusyo, Hayashi, 2013). A albumina consiste na principal proteína circulante no compartimento plasmático e encontra-se altamente suscetível à glicação, o que contribui para alterações estruturais e funcionais desta macromolécula. Sua modificação por glicação precoce - frutossamina - é utilizada como marcador de controle glicêmico a curto prazo (21 dias), enquanto sua alteração por glicação avançada associa-se com insulto oxidativo e inflamatório tecidual, prejuízo na função endotelial e risco cardiovascular (Baraka-Vidot, 2015; Neelofar et al., 2016).

Estresse inflamatório e oxidativo constituem a base celular das complicações do DM e resultam da ativação da via dos polióis, hexosaminas, proteína cinase C e geração de AGEs. Neste estudo, avaliamos o efeito da administração crônica de albumina modificada por glicação avançada (albumina AGE), independentemente da presença de hiperglicemia ou outras alterações metabólicas do DM, sobre o perfil histológico e inflamatório do tecido adiposo periepididimal, o infiltrado e diferenciação de macrófagos neste tecido e na cavidade peritoneal de ratos Wistar.

Albumina de rato obtida comercialmente, submetida à glicação avançada *in vitro* por meio da incubação com glicolaldeído, apresentou maior conteúdo total de AGE e, mais especificamente de CML e PYR. Ambos, CML e PYR,

representam importantes produtos da reação de Maillard e podem originar-se a partir da clivagem do Produto Amadori, peroxidação lipídica e atividade da mieloperoxidase. A CML é classicamente descrita como ligante do RAGE, o que deflagra a expressão de mediadores moleculares que contribuem para a resistência insulínica e complicações do DM (Vetter et al., 2015). Perfil semelhante de modificação por CML e PYR foi observado em albumina de camundongo, incubada com glicolaldeído. Esta promoveu o acúmulo de CML e de produtos de peroxidação lipídica na aorta de camundongos, após 1 mês de tratamento com injeções intraperitoneais diárias (Gomes, et al., 2016).

Considerando-se que a maior parte dos AGE são formados por reações conjuntas de oxidação, caracterizando a glico-oxidação, avaliamos a ação da N-acetilcisteína concomitantemente ao tratamento com albumina-AGE sobre os parâmetros descritos acima.

O tratamento com albumina C ou albumina AGE, isoladamente ou em associação a NAC, não alterou o consumo diário de ração, a massa corporal e a concentração plasmática de lípidos, glicose, insulina, marcadores de função hepática e renal. Estes dados corroboram com os estudos que também avaliaram, em animais hígidos, os possíveis efeitos deletérios da administração crônica de albumina modificada por glicação avançada *in vivo* seguida de terapia anti-glicação (Coughlan et al., 2011; Goodwin et al., 2013; Fukami et al., 2014; Gomes et al., 2016). Por outro lado, Dhar et al. (2011) verificaram aumento nas concentrações de glicose, CT, TG e AGL em ratos Sprague-Dawley, com 12 semanas de idade, após administração de metilglioxal (MGO) na concentração 60 mg/kg/dia.

Embora a NAC possa exercer pequeno efeito hipotensor, por sua capacidade de se ligar ao receptor de angiotensina 1 (AT-1 R) (Ullian et al., 2005; Samuni et al., 2013), não se observou alteração na pressão arterial nos grupos experimentais tratados com NAC. Além disso, o tratamento com albumina AGE não conferiu modificações na pressão arterial dos animais, a despeito do papel descrito dos AGE no sequestro de óxido nítrico e estímulo à endotelina-1.

A NAC reduziu a concentração urinária de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicador de peroxidação lipídica, nos animais que receberam albumina AGE. Tal achado reitera a capacidade deste composto em mitigar o estresse oxidativo induzido pela albumina AGE. Além disso, vale ressaltar que a avaliação de TBARS se correlaciona em ambos meios, urinários e plasmáticos (Shimizu et al., 2013).

Em animais com doença renal crônica, na qual também se observa maior insulto glico-oxidativo, a NAC (600 mg/dL) reduziu TBARS e, ainda, diminuiu a concentração plasmática de CML e AGE total (Machado et al., 2014). No presente estudo, devido à limitação na quantidade de amostras, não foi determinada a concentração plasmática de AGE.

A administração oral da NAC apresenta-se como forma mais eficiente e direta para síntese de glutathione que, em condições de estresse oxidativo, se encontra depletada. Além disso, por ser importante fonte de grupos sulfidríla, também promove a desintoxicação e neutralização de radicais livres devido à sua interação com as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Dodd et al., 2008; Elbini Dhouib et al., 2016).

Menor sensibilidade à insulina, refletida pelo teste de tolerância à insulina, foi observada nos animais tratados cronicamente com albumina AGE em comparação ao grupo albumina C. Este evento foi prevenido pelo tratamento com NAC e pode estar associado ao menor insulto oxidativo conferido pela NAC.

Observa-se crescente interesse no que concerne aos efeitos da NAC sobre os estágios precoces do DM (Samuni et al., 2013; Lasram et al., 2015; Elbini Dhouib et al., 2016). Estudos experimentais sugerem uma possível correlação entre a dose da NAC, quantidade de glutathione produzida pelo fígado e regulação do metabolismo da glicose. Entretanto, os mecanismos pelos quais este composto atua ainda permanecem sob investigação (Shimizu et al., 2013; Wang et al., 2013; Trewin et al., 2015). Segundo Wang et al. (2013) a administração oral da NAC (1,5 g/Kg/dia) acentua a fosforilação da AKT e da STAT3 em ratos com DM induzido por estreptozotocina. Ainda, Trewin et al. (2015) demonstraram que a infusão intravenosa de NAC (62,5 e 25 mg/Kg durante 15 e 80 min, respectivamente) melhora a sensibilidade insulínica no músculo esquelético de indivíduos submetidos ao treinamento físico, independentemente da AKT.

Castoldi et al. (2016) conceituam a resistência insulínica como mecanismo associado à redução da responsividade à insulina, principalmente, em órgãos como o fígado, músculo e tecido adiposo. Entretanto, a magnitude e manifestação tecido-específica da resistência pode variar de acordo com o modelo experimental e diversas condições em seres humanos.

Em particular, o tecido adiposo corresponde a um órgão complexo e que emergiu como importante regulador da resistência insulínica e inflamação (Goyal et al., 2014; Boyer et al., 2015). O aumento do fluxo de ácidos graxos, advindos da hidrólise de triglicérides armazenados no tecido adiposo visceral, vincula-se à instalação e perpetuação da resistência insulínica no leito muscular e hepático (Savage et al., 2007; Church et al., 2012). De modo semelhante, mediadores inflamatórios, produzidos por macrófagos infiltrados no tecido adiposo e que se diferenciam no subtipo 1 (M1), contribuem para o prejuízo na sinalização da insulina. Em ambos os casos, há estimulação da proteína cinase teta, com redução da fosforilação do receptor de insulina e substrato do receptor de insulina em resíduos de tirosina e aumento em treonina. Isto impede a sinalização da insulina e, conseqüentemente, seus efeitos biológicos (Savage et al., 2007; Castoldi et al., 2016).

O aumento do fluxo de ácidos graxos está, na maioria das condições, vinculado à presença de obesidade, a qual é condição clínica predisponente à resistência insulínica (Goyal et al., 2014). No presente estudo não observamos diferença no peso relativo do tecido adiposo periepididimal, fração de área e volume dos adipócitos, nos animais tratados com albumina AGE em comparação à albumina C. Tampouco houve alteração no peso corporal e na concentração circulante de ácidos graxos livres. Isto pode ter, em parte, limitado os achados referentes à expressão de genes que modulam a sensibilidade insulínica neste órgão. No entanto, verificou-se maior infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, o que aponta para papel

dos AGE em etapas iniciais que podem, a longo prazo, contribuir para a resistência insulínica.

O maior infiltrado de macrófagos, representados pela marcação positiva para F4/80, observado no tecido adiposo periepídídimo dos animais tratados com albumina AGE foi prevenido pela NAC. Estudos vinculam a presença desse marcador ao tecido adiposo de indivíduos magros e obesos, perfazendo 10 a 60 %, respectivamente, do total de macrófagos (Lumeng et al., 2007; Becker et al., 2012).

A ativação transiente de macrófagos infiltrados no tecido adiposo aos fenótipos M1 - classicamente ativados e associados à alteração do perfil glicolipídico, ou M2 - alternativamente ativados - também foi avaliada frente ao tratamento com AGE. Apesar do maior infiltrado de macrófagos observados nesse tecido, a imunomarcação para detecção dos subtipos M1 e M2 permaneceu inalterada entre os grupos. Patel et al. (2016) apontam para um espectro de diferenciação de macrófagos *in vivo*, ao longo de diferentes subpopulações, que não podem ser francamente ou exclusivamente caracterizadas como M1 ou M2. Isto decorre dos diferentes graus de obesidade, inflamação, influências dietéticas, entre outros. Além disso, distintas metodologias podem prover melhor capacidade de diferenciação dos fenótipos de macrófagos.

A albumina AGE, por si, não aumenta o estresse inflamatório em macrófagos cultivados. Entretanto, sensibiliza estas células à estimulação inflamatória por calgranulinas ou lipopolissacarídeos. Além disso, observa-se uma ação parácrina do meio advindo destas células - rico em citocinas -

sobre células não estimuladas (Okuda et al., 2012). Este evento, a longo prazo, poderia contribuir para o prejuízo na função dos adipócitos, criando um ciclo que agrave o insulto inflamatório local e sistêmico.

O tratamento com albumina AGE não alterou a expressão de genes vinculados ao eixo AGE-RAGE. Em divergência, estudo realizado por Gaens et al. (2014) demonstrou um importante acúmulo de CML e aumento do mRNA de RAGE no tecido adiposo de indivíduos obesos, situações que coordenam à desregulação de adipocinas e resistência insulínica associada à obesidade. Tais achados foram reforçados por análises em adipócitos 3T3-L1 e em modelo animal *knockout* para o receptor RAGE mediante condições associadas ao estresse oxidativo e inflamatório (Gaens et al., 2014).

Jin et al. (2015) discutem sobre o mecanismo, ainda não totalmente caracterizado, pelo qual os AGE medeiam a polarização dos macrófagos M1/M2. Entretanto, os autores defendem a atuação do eixo RAGE/NF- κ B em induzir a um fenótipo específico e, via de regra, pró-inflamatório ou M1.

Segundo Tabas, Bornfeldt (2016), a classificação M1 e M2 baseia-se em modelos *in vitro* mediante estímulos não invariavelmente encontrados isolada e especificamente no âmbito tecidual. Em tempo, torna-se necessário mais estudos, especialmente *in vivo*, considerando o ambiente local e sistêmico dessas células assim como sua cinética, plasticidade, reversibilidade e memória metabólica (Martinez, Gordon, 2014).

Além disso, a caracterização fenotípica e funcional em M1 e M2 tem sido determinada por uma gama de técnicas tais como a citometria fluxo e espectrometria de massa, as quais buscam inicialmente distinguir os

macrófagos dos demais tipos celulares que, por ventura, exibem padrão e marcadores de superfície similares (Becker et al., 2012). No presente estudo, devido à necessidade de congelamento imediato dos vários órgãos, optou-se pelas técnicas de imuno-histoquímica e RT-qPCR, ao invés da citometria de fluxo, a qual requer análise a fresco do tecido.

Lumeng et al. (2007) evidenciaram que o infiltrado de monócitos no tecido adiposo, na obesidade, favorece o tipo inflamatório M1. A proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) e seu receptor (receptor de quimiocina 2 - CCR2) exercem importante papel neste processo, embora outras vias também estejam envolvidas de maneira menos esclarecida, como leucotrienos e ácidos graxos (Meshkani, Vakili, 2016). Uma outra limitação do presente estudo foi a falta de determinação tecidual e plasmática de MCP-1, a qual poderia contribuir para caracterizar um maior perfil de quimiotaxia de monócitos ao tecido adiposo.

Não se observou efeito da albumina AGE sobre a expressão de genes inflamatórios e de polarização de macrófagos infiltrados no tecido adiposo. No entanto, a NAC contribuiu simultaneamente para o aumento do mRNA de *Ppara*, responsável pela adipogênese e homeostase energética frente à oxidação de ácidos graxos, e *Slc2a4*, que codifica o transportador de glicose GLUT-4, o que reforça os achados do teste de tolerância à insulina. Ainda, este composto diminuiu o mRNA de *Itgam* e *Mrc*, associados aos fenótipos M1 e M2, respectivamente. Sendo assim, vários efeitos foram atribuídos à NAC, independentemente dos AGE.

Ainda no tecido adiposo periepídídimal abordamos, de modo exploratório, por sequenciamento do transcriptoma em larga escala (RNA-seq), genes diferencialmente expressos, assim como categorias funcionais representadas por estes mesmos genes, frente ao tratamento com albumina AGE. Comparada às outras técnicas da biologia molecular, o RNA-seq consiste numa abordagem eficiente e permite, além de investigar o perfil molecular de uma dada amostra, prospectar novos biomarcadores e moduladores dos processos celulares (Sánchez-Pla et al., 2012). Assim, por esta análise, destacaram-se os componentes de matriz extracelular representados, principalmente, pela família do colágeno.

Após validação por qPCR, apenas o *Col12a1* diferiu entre os animais tratados com albumina AGE em relação ao grupo C. Este subtipo de colágeno encontra-se associado às fibrilas e responde pela integridade óssea e muscular (Ricard-Blum et al., 2011; Chiquet et al., 2014). Embora sejam escassas as informações sobre AGE e colágeno XII, acredita-se que por esta ser uma proteína de meia-vida longa e abundante no organismo de mamíferos, tal como a albumina, também seja passível de modificação por glicação.

Citocinas inflamatórias produzidas por macrófagos do tecido adiposo, atingem o fígado, via circulação portal, desencadeando aumento da resposta inflamatória pelas células de Kupffer e prejuízo na sinalização insulínica neste órgão (Gómez-Hernández et al., 2016). A ausência de alteração morfológica e inflamatória observada no tecido adiposo, na presente investigação, vai ao encontro dos achados no tecido hepático, nestes mesmos animais.

A análise do fígado dos animais tratados com albumina AGE evidenciou capacidade de contrabalançar os efeitos dos AGE, por meio de defesas antioxidantes e antiapoptóticas, que se refletem na manutenção da sensibilidade insulínica. Neste sentido, verificou-se maior fosforilação da AKT, inativação da glicogênio sintase cinase (GSK3) e aumento do glicogênio hepático e do fator nuclear NFR2, cuja ação citoprotetora se correlaciona ao seu potencial antioxidante (Fabre, 2016). Neste mesmo órgão, a expressão dos genes *Ddost* (AGE-R1), *Slc2a2* (GLUT-2), *Pck1*, *G6pc* (gliconeogênese), *Acaca*, *Fasn* (lipogênese) *Nfkb1*, *Il6*, *Tnf* (pró-inflamatórios), *Foxa2* e razão *Bax/Bcl2* mostrou-se reduzida no grupo albumina AGE comparado a albumina C. *Ager* (RAGE), *Sod1*(superóxido dismutase), *Cat* (catalase), *Srebf1* (SREBP-1) e *Mttp* (MTP) não foram alteradas. Estes achados refletem menor síntese de lípidos, o que de fato foi sustentado pela menor área de gotículas lipídicas no fígado dos animais tratados com albumina AGE. Assim, embora os AGE exerçam efeitos potencialmente deletérios bem estabelecidos na literatura (Lorenzi et al., 2011; Cai et al., 2012; Godwin et al., 2013; Leung et al., 2016), no fígado de animais tratados cronicamente, esses componentes assumem um efeito hormético (Fabre, 2016).

No músculo sóleo dos animais tratados com albumina AGE observou-se redução no mRNA de *Ddost* e *Slc2a4*, sem modificar, no entanto, o conteúdo proteico do GLUT-4. A expressão de *Ager* e o grau de fosforilação de inibidores do NF- κ B (IKKA e IKKB) foram similares entre ambos os grupos, C e AGE. Além disso, albumina AGE promoveu aumento de 40 % no conteúdo de NFKB1

no compartimento nuclear e 20% na expressão de proteína marcadora de estresse do retículo endoplasmático, Grp78, em relação ao C (Pinto Jr, 2016).

Em paralelo, Pinto Jr (2016) demonstraram *in vitro* que a incubação de músculo sóleo intacto, por 150 min com albumina AGE, reduz o mRNA de *Slc2a4* também sem alterar o conteúdo proteico do GLUT-4 em comparação a albumina C. Em incubações por períodos prolongados (350 e 450 min) ambos, mRNA e proteína desse mesmo transportador de glicose, foram reduzidos nos músculos tratados com albumina AGE. Ainda, a albumina AGE induziu maior expressão de *Ager* e de proteínas marcadoras de estresse de retículo endoplasmático, como Grp78 e Grp94, dado esse igualmente observado por Adamopoulos et al. (2016).

Aumento do conteúdo de NFkB1 e RELA (p65) no extrato nuclear, com maior atividade de ligação do NFkB, avaliada por ensaio de mobilidade eletroforética, EMSA, ao promotor do gene *Slc2a4*, também foi verificada nesse modelo (Pinto Jr et al., 2016). Estes eventos já foram previamente descritos como associados à menor expressão de *Glut4* e piora da sensibilidade insulínica (Polleto et al., 2015). Sendo assim, a alteração observada no teste de tolerância à insulina nos animais tratados com albumina C ou AGE deve estar vinculada ao prejuízo na sinalização/sensibilidade insulínica no leito muscular.

No rim dos animais tratados com albumina AGE, em comparação à albumina C, observou-se aumento na área glomerular total (hipertrofia glomerular), maior infiltrado macrofágico e expressão de *Tgf1b* (TGF beta) e *Col4a1* (colágeno IV), o que contribui para um perfil pró-fibrótico. A albumina

AGE também promoveu aumento da expressão de *Ager*, *Nfkb* além do conteúdo do mRNA de *Agt* (angiotensinogênio) e *Ren* (renina), sem afetar a expressão de *Ace* (enzima conversora de angiotensinogênio). Apenas a expressão de renina foi reduzida pelo tratamento com NAC. A expressão de mRNA de *Nox4* (NADPH oxidase 4) foi similar entre os grupos, mas a expressão de *Txnip* (TXNIP) e a razão *Bax/Bcl2* foi maior nos animais tratados com albumina AGE, o que se vincula a um perfil oxidativo e apoptótico (Thieme et al., 2016).

Em conjunto, as respostas observadas são território-específicas e podem estar condicionadas ao fluxo e remoção de albumina AGE, à expressão preferencial de receptores RAGE e AGER-1 e de sistemas anti e pró-oxidantes. A meia-vida da albumina AGE é bastante reduzida em comparação à albumina C (Coughlan et al., 2011; Vetter et al., 2015). Apesar deste fato, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que ela prejudica a função das células β pancreáticas, o que culmina em defeitos na secreção da insulina e redução de sua biossíntese, possivelmente por influenciar vias apoptóticas e de sinalização hormonal (Unoki et al., 2007; Coughlan et al., 2011; Tahara et al., 2012; Costal et al., 2013).

Macrófagos peritoneais representam uma população heterogênea e associam-se a perfis funcionais distintos mediados pelo estímulo do microambiente (Ghosn et al., 2010; Chawla et al., 2012; Patel et al., 2016). Investigou-se, neste modelo experimental, a expressão de genes envolvidos no eixo AGE-RAGE e resposta inflamatória, além daqueles envolvidos na polarização M1/M2. O tratamento com albumina AGE não alterou a

expressão de *Ager* e *Cd36*. Por outro lado, contribuiu para aumentar a expressão de *Ddost*, também observado frente ao tratamento com NAC, o que pode compensar e limitar, até certo ponto, o insulto promovido pelos AGE. Os efeitos protetores do AGE-R1 parecem estar associados à sua porção extracelular característica e ao domínio de alta afinidade aos AGE que competem com os demais receptores de superfície celular que exacerbam a geração de ROS (Vetter et al., 2015).

Embora o equilíbrio entre os principais receptores de AGE, RAGE e AGE-R1, se configure de fundamental importância à manutenção do balanço glico-oxidativo intracelular, Vlassara, Uribarri (2014) acreditam que a elevação de AGE, ainda que a curto prazo, possa conduzir a superexpressão concomitante de ambos.

Apenas o conteúdo do mRNA do *Il6* foi aumentado nos macrófagos isolados da cavidade peritoneal de animais tratados com albumina AGE. Em macrófagos derivados da medula óssea, Jin et al. (2015) observaram elevação dose-dependente da *Il6*, após tratamento com albumina AGE.

Nas análises dos perfis fenotípicos dos macrófagos M1 e M2 verificamos o aumento do conteúdo do mRNA de *Arg1*, que codifica a arginase 1, nos grupos C + NAC e AGE + NAC em comparação aos respectivos controles. Em ensaio realizado por Jin et al. (2015), a expressão desse gene permaneceu inalterada. A arginase, expressa em macrófagos do subtipo M2, hidrolisa a arginina em compostos como ornitina e ureia, além de contrabalançar a produção de óxido nítrico e competir com a óxido nítrico sintase (NOS) pelo

substrato L-arginina, o que contribui para o perfil anti-inflamatório dessas células (Rath et al., 2014).

O presente trabalho é pioneiro no que tange à avaliação dos efeitos dos AGE no tecido adiposo *in vivo* e os resultados podem estar condicionados ao tempo de tratamento e dose utilizada. Além disso, o modelo murino experimental pode condicionar diferenças espécie-específicas e não pode ser diretamente comparado aos resultados em cultura de adipócitos e outros ensaios *in vitro*, onde é evidente a ação dos AGE no prejuízo da sensibilidade insulínica e piora do perfil inflamatório (Unno et al., 2005; Maeda et al., 2011).

Importante salientar que em camundongos knockout para apo E não diabéticos, o tratamento com albumina AGE, por um mês, favoreceu o aumento do infiltrado de lípidos no arco aórtico o que se vinculou à maior expressão local de *Ager*, *Orl1* (LOX1- receptor de LDL oxidada) e *Cybb* (NADPH oxidase 2). A análise de expressão gênica foi corroborada pela imuno-histoquímica para estas proteínas, com elevação concomitante de CML e do marcador de peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal (Gomes et al. 2016).

Em macrófagos, o tratamento com albumina-AGE aumenta o insulto oxidativo (de Souza Pinto et al., 2011) e inflamatório (Okuda et al., 2012) e a expressão de marcadores de estresse de retículo endoplasmático e da via adaptativa a proteínas mal- enoveladas (Castilho et al., 2012). Esses eventos vinculam-se com a redução do conteúdo do receptor de HDL, ABCA-1, condicionando prejuízo na remoção do excesso de colesterol pela

apo-AI e HDL (Okuda et al., 2012, Castilho et al., 2012, Machado-Lima et al., 2013) e consequente acúmulo intracelular de colesterol (Machado et al., 2006) e 7-cetocolesterol (Iborra et al., 2011).

Os achados deste estudo apontam para o papel da albumina-modificada por glicação avançada no estímulo à infiltração de macrófagos no tecido periepídimal de ratos Wistar, independentemente da presença de outras alterações metabólicas típicas da resistência insulínica e DM. Embora não tenha sido observado o perfil de polarização de macrófagos e aumento de estresse inflamatório local, os resultados evidenciam que a glicação avançada pode ser o gatilho para alterações metabólicas que norteiem a gênese e evolução da resistência insulínica.

7. CONCLUSÃO

A albumina AGE favorece o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo o que evidencia a sensibilização deste território à ação dos AGE e pode, a longo prazo, contribuir para piora na resistência à insulina, observada neste modelo animal. A NAC antagoniza os efeitos da albumina AGE e exerce, por si, efeitos benéficos sobre o perfil de diferenciação de macrófagos no tecido adiposo e peritônio, resposta inflamatória, peroxidação lipídica e resistência insulínica. A NAC pode ser uma ferramenta útil na prevenção das ações dos AGE sobre o desenvolvimento de resistência insulínica e complicações do DM.

8. REFERÊNCIAS

- Adamopoulos C, Mihailidou C, Grivaki C, Papavassiliou KA, Kiaris H, Piperi C, Papavassiliou AG. Systemic effects of AGEs in ER stress induction in vivo. *Glycoconj J*. 2016;33(4):537-44.
- Ahmed N. Advanced glycation endproducts - role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;67(1):3-21.
- Alexiou P, Chatzopoulou M, Pegklidou K, Demopoulos VJ. RAGE: a multi-ligand receptor unveiling novel insights in health and disease. *Curr Med Chem*. 2010;17(21):2232-52.
- Anguizola J, Matsuda R, Barnaby OS, Hoy KS, Wa C, DeBolt E, Koke M, Hage DS. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta*. 2013;425:64-76.
- Baraka-Vidot J, Guerin-Dubourg A, Dubois F, Payet B, Bourdon E, Rondeau P. New insights into deleterious impacts of in vivo glycation on albumin antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3532-41.
- Baraka-Vidot J, Planesse C, Meilhac O, Militello V, van den Elsen J, Bourdon E, Rondeau P. Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin. *Biochemistry*. 2015;54(19):3051-62.
- Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci*. 2011;121:43-55.
- Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):9-21.
- Becker L, Liu NC, Averill MM, Yuan W, Pamir N, Peng Y, Irwin AD, Fu X, Bornfeldt KE, Heinecke JW. Unique proteomic signatures distinguish macrophages and dendritic cells. *PLoS One*. 2012;7(3):e3397.
- Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:534873.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;413(6865):813-20.
- Cai JH, Deng S, Kumpf SW, Lee PA, Zagouras P, Ryan A, Gallagher DS. Validation of rat reference genes improved quantitative gene expression analysis using low density arrays. *Biotechniques*. 2007;42(4): 503-512.

- Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. AGE-receptor 1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. *Am J Physiol Cell.* 2008;294;294:C145-52.
- Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(39):15888-93.
- Calzadilla M, Serrano-Gómez M, García-Santos E, Schiaooacasse A, Abalde Y, Calvo JC, Peral B, Guerra LN. N-Acetylcysteine affects obesity-related protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *Redox Rep.* 2013;18(6):210-8.
- Campello RS, Alves-Wagner ABT, Abdulkader F, Mori RCT, Machado UF. Carbohydrate and lipid enriched meals acutely disrupt glycemic homeostasis by inducing transient insulin resistance in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2012;90(5):537-45.
- Castilho G, Okuda LS, Pinto RS, Iborra RT, Nakandakare ER, Santos CX, Laurindo FR, Passarelli M. ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycated albumin reversal by a chemical chaperone. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(7):1078- 86.
- Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The Macrophage Switch in Obesity Development. *Front Immunol.* 2016;(5)6:637.
- Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2012;10(11):738-49.
- Chiquet M, Birk DE, Bönnemann CG, Koch M. Collagen XII: Protecting bone and muscle integrity by organizing collagen fibrils. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;53:51-4.
- Church C, Horowitz M, Rodeheffer M. WAT is a functional adipocyte? *Adipocyte.* 2012;1(1):38-45.
- Cohen M. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):25-30.
- Costal F, Oliveira E, Raposo A, Machado-Lima A, Peixoto E, Roma L, Santos L, Faria JBL, Carpinelli AG, Giannella-Neto A, Passarelli M, Correa-Giannella ML. Dual effect of advanced glycation end products in pancreatic islets apoptosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29:296-307.
- Coughlan MT, Yap FY, Tong DC, Andrikopoulos S, Gasser A, Thallas-Bonke V, Webster DE, Miyazaki J, Kay TW, Slattey RM, Kaye DM, Drew BG, Kingwell BA, Furlanos S, Groop PH, Harrison LC, Knip M, Forbes JM.

- Advanced glycation end products are direct modulators of β -cell function. *Diabetes*. 2011;60(10):2523-32.
- Davis KE, Prasad C, Vijayagopal P, Juma S, Imrhan V. Advanced Glycation End Products, Inflammation, and Chronic Metabolic Diseases: Links in a Chain? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014a;56(6):989-98.
- Davis KE, Prasad C, Vijayagopal P, Juma S, Imrhan V. Serum soluble receptor for advanced glycation end products correlates inversely with measures of adiposity in young adults. *Nutr Res*. 2014b;34(6):478-85.
- de Souza Pinto R; Castilho G, Paim BA, Machado-Lima A, Inada NM, Nakandakare ER, Vercesi AE, Passarelli M. Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycated albumin. *Lipids*. 2012;47:443-50.
- Dhar A, Dhar I, Jiang B, Desai KM, Wu L. Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic beta-cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats. *Diabetes*. 2011;60(3):899-908.
- Di Pino A, Currenti W, Urbano F, Mantegna C, Purrazzo G, Piro S, Purrello F, Rabuazzo AM. Low advanced glycation end product diet improves the lipid and inflammatory profiles of prediabetic subjects. *J Clin Lipidol*. 2016;10(5):1098-108.
- Dodd S, Dean O, Copolov DL, Malhi GS, Berk M. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(12):1955-62.
- Elakovic I, Nestorov J, Kovacevic S, Matic G. Selection of reference genes for normalization of Real Time PCR data in visceral adipose tissue of female rats on a fructose-enriched diet. *Arch Biol Sci*. 2012;64(4):1247-59.
- Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci*. 2016;151:359-63.
- Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141-50.
- Fabre NT. Efeitos da administração crônica de albumina modificada por glicação avançada (AGE) sobre o tecido hepático: caracterização do perfil histológico, inflamatório e antioxidante [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2016.
- Fukami K, Yamagishi S, Coughlan MT, Harcourt BE, Kantharidis P, Thallas-Bonke V, Okuda S, Cooper ME, Forbes JM. Ramipril inhibits AGE-RAGE-induced matrix metalloproteinase-2 activation in experimental diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):86.

- Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5509-14.
- Gaens KH, Goossens GH, Niessen PM, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ, Niessen HW, Rensen SS, Buurman WA, Greve JW, Blaak EE, van Zandvoort MA, Bierhaus A, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Nε-(carboxymethyl)lysine-receptor for advanced glycation end product axis is a key modulator of obesity-induced dysregulation of adipokine expression and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(6):1199-208.
- Ghosh EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(6):2568-73.
- Gomes DJ, Velosa AP, Okuda LS, Fusco FB, da Silva KS, Pinto PR, Nakandakare ER, Correa-Giannella ML, Woods T, Brimble MA, Pickford R, Rye KA, Teodoro WR, Catanozi S, Passarelli M. Glycated albumin induces lipid infiltration in mice aorta independently of DM and RAS local modulation by inducing lipid peroxidation and inflammation. *J Diabetes Complications*. 2016;30(8):1614-1621.
- Gómez-Hernández A, Beneit N, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol*. 2016;2016:1216783.
- Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5755-61.
- Goodwin M, Herath C, Jia Z, Leung C, Coughlan MT, Forbes J, Angus P. Advanced glycation end products augment experimental hepatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(2):369-76.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
- Goyal A, Nimmakayala KR, Zonszein J. Is there a paradox in obesity? *Cardiol Rev*. 2014;22(4):163-70.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, MJ West. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96(5):379-94.
- Gupta A, Uribarri J. Dietary Advanced Glycation End Products and Their Potential Role in Cardiometabolic Disease in Children. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(5):291-300.

- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008;29:2959–71.
- Hanssen NM, Wouters K, Huijberts MS, Gijbels MJ, Sluimer JC, Scheijen JL, Heeneman S, Biessen EA, Daemen MJ, Brownlee M, de Kleijn DP, Stehouwer CD, Pasterkamp G, Schalkwijk CG. Higher levels of advanced glycation endproducts in human carotid atherosclerotic plaques are associated with a rupture-prone phenotype. *Eur Heart J*. 2014;35(17):1137-46.
- Hill AA, Bolus WR, Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol Rev*. 2014;262:134-52.
- Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*. 2002;62(5):1524-38.
- Iborra RT, Machado-Lima A, Castilho G, Nunes VS, Abdalla DS, Nakandakare ER, Passarelli M. Advanced glycation in macrophages induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol and total sterols by decreasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1. *Lipids in Health and Dis*. 2011;10:172.
- Iborra RT, Machado-Lima A, Machado UF, Rui I, Yokoyama S, Passarelli M. Age-albumin reduces abca-1 content in macrophages by inducing its modification by age and degradation by the ubiquitin-proteasome and lysosomal system. 84th European Atherosclerosis Society Congress 2016, p. 106.
- Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2010;11(1):11-8.
- Jin X, Yao T, Zhou Z, Zhu J, Zhang S, Hu W, Shen C. Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- κ B Pathway. *Biomed Res Int*. 2015;2015:732450.
- Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013;94(1):55-68.
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:6474–6479.
- Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett*. 2003;537(1-3):85-90.
- Lanthier N, Leclercq IA. Adipose tissues as endocrine target organs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014;28(4):545-58.

- Lasram MM, Dhouib IB, El Fazaa S, Gharbi N. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. *Clin Biochem*. 2015;S0009-9120(15)00141-1.
- Leung C, Herath CB, Jia Z, Andrikopoulos S, Brown BE, Davies MJ, Rivera LR, Furness JB, Forbes JM, Angus PW. Dietary advanced glycation end-products aggravate non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2016;22(35):8026-40.
- Liu Y, Yao W, Xu J, Qiu Y, Cao F, Li S, Yang S, Yang H, Wu Z, Hou Y. The anti-inflammatory effects of acetaminophen and N-acetylcysteine through suppression of the NLRP3 inflammasome pathway in LPS-challenged piglet mononuclear phagocytes. *Innate Immun*. 2015;pii:1753425914566205.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
- López-Díez R, Shekhtman A, Ramasamy R, Schmidt AM. Cellular mechanisms and consequences of glycation in atherosclerosis and obesity. *Biochim Biophys Acta*. 2016; pii: S0925-4439(16)30113-2.
- Lorenzi R, Andrades ME, Bortolin RC, Nagai R, Dal-Pizzol F, Moreira JC. Oxidative damage in the liver of rats treated with glycolaldehyde. *Int J Toxicol*. 2011;30(2):253-8.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.
- Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2111-7.
- Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(3):392-403.
- Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Sartori CH, Oliveira ER, Nakandakare ER, Stefano JT, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML, Passarelli M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1-mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(1):66-76.
- Machado JT, Iborra RT, Fusco FB, Castilho G, Pinto RS, Machado-Lima A, Nakandakare ER, Seguro AC, Shimizu MH, Catanozi S, Passarelli M. N-

- acetylcysteine prevents endoplasmic reticulum stress elicited in macrophages by serum albumin drawn from chronic kidney disease rats and selectively affects lipid transporters, ABCA-1 and ABCG-1. *Atherosclerosis*. 2014;343-52.
- Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Castilho G, Sartori CH, Oliveira ER, Okuda LS, Nakandakare ER, Giannella-Neto D, Machado UF, Corrêa-Giannella ML, Traldi P, Porcu S, Roverso M, Lapolla A, Passarelli M. In type 2 diabetes mellitus glycated albumin alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Cell Physiol*. 2015a;230(6):1250-7.
- Machado-Lima A, Iborra RT, Nakandakare E, Correa-Giannella MLC, Schimdt AM, Passarelli M. RAGE mediates altered gene expression and impaired cholesterol efflux in macrophages elicited by advanced glycated albumin isolated from poorly controlled diabetes mellitus patients. In: *Abstracts of The Crossroads of Lipid Metabolism and Diabetes - Keystone Symposia Conference*, 2015b.
- Maeda S, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Co-treatment with azelinidipine and olmesartan inhibits advanced glycation end products (AGEs) elicited down-regulation of adiponectin mRNA levels in cultured adipocytes partly via its anti-oxidative property. *Int J Cardiol*. 2011;146(2):264-6.
- Magalhães PM, Appell HJ, Duarte JA. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic complications: the protective role of regular physical activity. *Eur Rev Aging Phys Act*. 2008;5:17–29.
- Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm*. 2013;2013:139239.
- Malipattu SK, Uribarri J. Advanced glycation end product accumulation: a new enemy to target in chronic kidney disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2014;23(6):547-54.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176-85.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
- Meshkani R, Vakili S. Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. *Clin Chim Acta*. 2016;462:77-89.
- Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent

- in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res.* 2008;49(7):1562-8.
- Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. RNA-seq: A method for comprehensive transcriptome analysis. *Current Protocol in Molecular Biology.* 2010;4.11.1-13.
- Neelofar K, Arif Z, Alam K, Ahmad J. Hyperglycemia induced structural and functional changes in human serum albumin of diabetic patients: a physico-chemical study. *Mol Biosyst.* 2016;12(8):2481-9.
- Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules.* 2015;165(1):194-222.
- Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:275–97.
- Ohkawa H; Nobuko O; Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Bioch.* 1979;95:351-58.
- Okuda LS, Castilho G, Rocco DDFM, Nakandakare ER, Catanozi S, Passareli M. Advanced glycation impairs HDL anti-inflammatory activity and primers macrophages to inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. *Bioch Biophys Acta.* 2012;1821:1485-92.
- Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46.
- Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012;18(3):363-74.
- Passarelli M, Tang C, McDonald TO, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes.* 2005;54(7):2198-205.
- Patel U, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug Discov Today.* 2016;pii: S1359-6446(16)30293-8.
- Peppia M, Uribarri J, Vlassara H. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. *Clin Diab.* 2003;21:4.
- Peppia M, Vlassara H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens).* 2005;4(1):28-37.
- Pinto Jr DC, Efeito da albumina modificada por glicação avançada sobre a expressão do gene *slc2a4* em músculo esquelético [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2016.

- Poletto AC, David-Silva A, Yamamoto AP, Machado UF, Furuya DT. Reduced Slc2a4/GLUT4 expression in subcutaneous adipose tissue of monosodium glutamate obese mice is recovered after atorvastatin treatment. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7:18.
- Prescott L. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? *Ann Emerg Med*. 2005;45:409–13.
- Rabbani N, Shaheen F, Anwar A1, Masania J, Thornalley PJ. Assay of methylglyoxal-derived protein and nucleotide AGEs. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(2):511-7.
- Radomska-Lesniewska DM, Skopinski P. N-acetylcysteine as an antioxidant and anti-inflammatory drug and its some clinical applications. *Cent Eur J Immun*. 2012;37:57-66.
- Raghav A, Ahmad J. Glycated serum albumin: a potential disease marker and an intermediate index of diabetes control. *Diabetes Metab Syndr*. 2014;8(4):245-51.
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. 2014;5:532.
- Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978.
- Rojas A, Delgado-López F, González I, Pérez-Castro R, Romero J, Rojas I. The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cell Signal*. 2013;25(3):609-14.
- Samad F, Ruf W. Inflammation, obesity, and thrombosis. *Blood*. 2013;122(20):3415-22.
- Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(8):4117-29.
- Sánchez-Pla A, Reverter F, Ruíz de Villa MC, Comabella M. Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. *J Neuroimmunol*. 2012;248(1-2):23-31.
- Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2007;87(2):507-20.
- Schmidt AM. Soluble RAGEs - Prospects for treating & tracking metabolic and inflammatory disease. *Vascul Pharmacol*. 2015;72:1-8.
- Shimizu MHM, Volpini RA, Bragança AC, Campos R, Canale D, Sanches TR, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. *Exp Gerontol*. 2013;48:298-303.

- Shulman GI. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. *Physiology* (Bethesda). 2004;19:183-90.
- Singh RN, Rondeau P, Hoareau L, Bourdon E. Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin. *Free Radic Res*. 2007;41(10):1078-88.
- Song SO, Kim KJ, Lee BW, Kang ES, Cha BS, Lee HC. Serum glycated albumin predicts the progression of carotid arterial atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):450-5.
- Song F, Hurtado del Pozo C, Rosario R, Zou YS, Ananthakrishnan R, Xu X, Patel PR, Benoit VM, Yan SF, Li H, Friedman RA, Kim JK, Ramasamy R, Ferrante AW Jr, Schmidt AM. RAGE regulates the metabolic and inflammatory response to high-fat feeding in mice. *Diabetes*. 2014;63(6):1948-65.
- Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(9):2461-9.
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D447-52.
- Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):653-67.
- Tahara N, Yamagishi S, Matsui T, Takeuchi M, Nitta Y, Kodama N, Mizoguchi M, Imaizumi T. Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects. *Cardiovasc Ther*. 2012;30(1):42-8.
- Tan KC, Shiu SW, Wong Y, Tam X. Serum advanced glycation end products (AGEs) are associated with insulin resistance. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27(5):488-92.
- Thieme K, Silva KS, Fabre NT, Catanozi M, Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Costa-Pessoa JM, Oliveira-Sousa M, Machado UF, Passarelli M, Corrêa-Giannella ML. N-acetyl cysteine attenuated the deleterious effects of advanced glycation end-products on the kidney of non-diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*, 2016.
- Traldi P, Castilho G, Sartori CH, Machado-Lima A, Nakandakare ER, Corrêa-Giannella ML, Roverso M, Porcu S, Lapolla A, Passarelli M. Glycated human serum albumin isolated from poorly controlled diabetic patients

- impairs cholesterol efflux from macrophages: an investigation by mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)*. 2015;21(3):233-44.
- Trewin AJ, Lundell LS, Perry BD, Vikhe Patil K, Chibalin AV, Levinger I, McQuade LR, Stepto NK. Effect of N-acetylcysteine infusion on exercise induced modulation of insulin sensitivity, and signaling pathways in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;ajpendo:00605.
- Ueno H, Koyama H, Shoji T, Monden M, Fukumoto S, Tanaka S, Otsuka Y, Mima Y, Morioka T, Mori K, Shioi A, Yamamoto H, Inaba M, Nishizawa Y. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherogenesis in apoE-deficient mouse. *Atherosclerosis*. 2010;211(2):431-6.
- Ullian ME, Gelasco AK, Fitzgibbon WR, Beck CN, Morinelli TA. N-acetylcysteine decreases angiotensin II receptor binding in vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(8):2346-53.
- Unno Y, Sakai M, Sakamoto Y, Kuniyasu A, Nagai R, Nakayama H, Horiuchi S. Glycolaldehyde-modified bovine serum albumin downregulates leptin expression in mouse adipocytes via a CD36-mediated pathway. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:696-701.
- Unoki H, Bujo H, Yamagishi SI, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76(2):236-44.
- Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppia M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:461-6.
- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911-16.e12.
- Uribarri J, del Castillo MD, de la Maza MP, Filip R, Gugliucci A, Luevano-Contreras C, Macías-Cervantes MH, Markowicz Bastos DH, Medrano A, Menini T, Portero-Otin M, Rojas A, Sampaio GR, Wrobel K, Wrobel K, Garay-Sevilla ME. Dietary advanced glycation end products and their role in health and disease. *Adv Nutr*. 2015;6(4):461-73.
- Vetter SW. Glycated Serum Albumin and AGE Receptors. *Adv Clin Chem*. 2015;72:205-75.
- Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013;47(1):3-27.

- Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, Zhu L, Neade T, Beeri M, Silverman JM, Ferrucci L, Tansman L, Striker GE, Uribarri J. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: Role of the antiinflammatory AGE Receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4483-91.
- Vlassara H, Striker GE. AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(9):526-39.
- Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(4):697-719.
- Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep.* 2014;14(1):453.
- Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2007;2:31-56.
- Wang C, Chen K, Xia Y, Dai W, Wang F, Shen M, Cheng P, Wang J, Lu J, Zhang Y, Yang J, Zhu R, Zhang H, Li J, Zheng Y, Zhou Y, Guo C. N-acetylcysteine attenuates ischemia-reperfusion induced apoptosis and autophagy in mouse liver via regulation of the ROS/JNK/Bcl-2 pathway. *PlosOne.* 2014;29;9(9):e108855.
- Wang T, Mao X, Li H, Qiao S, Xu A, Wang J, Lei S, Liu Z, Ng KF, Wong GT, Vanhoutte PM, Irwin MG, Xia Z. N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the Jak/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial postischemic injury in diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:291-303.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57-63.
- Wautier MP, Guillausseau PJ, Wautier JL. Activation of the receptor for advanced glycation end products and consequences on health. *Diabetes Metab Syndr.* 2016;pii:S1871-4021(16)30208-9.
- Wu CH, Huang HW, Huang SM, Lin JA, Yeh CT, Yen GC. AGE-induced interference of glucose uptake and transport as a possible cause of insulin resistance in adipocytes. *J Agric Food Chem.* 2011;59(14):7978-84.
- Yamagishi S, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(5):663-71.