

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
MESTRADO EM NUTRIÇÃO**

***REPERCUSSÕES FISIOLÓGICAS DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA  
TERMOLIZADA ASSOCIADA A DIFERENTES NÍVEIS DE TIAMINA SOBRE O  
TECIDO RENAL EM RATOS ADULTOS***

**ROSE CAROLINNE CORREIA DA SILVA**

**MACEIÓ-2012**

**ROSE CAROLINNE CORREIA DA SILVA**

***REPERCUSSÕES FISIOLÓGICAS DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA  
TERMOLIZADA ASSOCIADA A DIFERENTES NÍVEIS DE TIAMINA SOBRE O  
TECIDO RENAL EM RATOS ADULTOS***

Dissertação apresentada à Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: **Prof<sup>a</sup> Dra. Suzana Lima de Oliveira**  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

Co-Orientadora: **Prof<sup>a</sup> Dra. Terezinha da Rocha  
Ataíde**  
Faculdade de Nutrição  
Universidade Federal de Alagoas

**MACEIÓ-2012**

## **DEDICATÓRIA**

Dedicado à minha amada mãe Maria Goretti, pelo amor e confiança incondicionais que têm dedicado a mim, pelo exemplo de força, determinação e perseverança que me inspiram desde sempre.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida que me concedeu, pela presença constante, por guiar meus passos, por ser minha inspiração e fortaleza.

À minha família pelo apoio e confiança incondicionais.

À minha orientadora prof<sup>a</sup> Suzana Lima de Oliveira pela confiança e paciência, pelos ensinamentos que levarei para além da vida acadêmica, por ser um exemplo profissional e pessoal dignos, pela competência, seriedade e compromisso irrestritos com os quais orientou o presente trabalho. Pela dedicação à FANUT e à Ciência da Nutrição.

À minha co-orientadora Terezinha da Rocha Ataíde pelo exemplo de seriedade e respeito à Ciência, e pelos esforços dedicados ao desenvolvimento da FANUT e de todos que a integram.

À prof<sup>a</sup> Luci Tojal e Seara por tudo que tem representado para mim desde a graduação. Pelas oportunidades que me concedeu, pela confiança, pelo amor à Ciência da Nutrição, pelo entusiasmo com que conduz todos os seus projetos.

Ao prof<sup>o</sup> José Leão, pelos esforços direcionados para a melhoria da formação acadêmica e crítica de todos que integram a FANUT.

À prof<sup>a</sup> Glaucevane, pelo exemplo de professora e de pesquisadora. Por enxergar as potencialidades de seus alunos e fazer a diferença na formação dos mesmos. Pelas palavras de incentivo e pelo apoio.

À Elisa Batista pela amizade e pelo esforço conjunto que proporcionou a conclusão do presente projeto.

À Monique Amaral, pelas palavras de sabedoria e pelo exemplo de responsabilidade e dedicação.

Ao profº Cyro Rego Júnior e à médica patologista Maria do Carmo Balwani pela disponibilidade e valiosa colaboração na avaliação estatística dos dados e na avaliação das lâminas histológicas respectivamente.

À Sara, Ísis, Fernanda e Elenita pela dedicação que demonstraram durante o desenvolvimento de todo o projeto

Aos meus fiéis amigos, pessoas raras que encontrei em minha breve caminhada, por tornarem minha vida mais alegre e suave.

À UFAL e a FANUT pelo aprendizado, desenvolvimento e amadurecimento que me proporcionaram. Concluo essa etapa acadêmica com a certeza de que poderei enfrentar novos desafios.

À todos que contribuíram para conclusão deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

AGEs (do inglês *advanced glycation end products*) são produtos finais de interações aminocarbonílicas cujas principais fontes exógenas são alimentos submetidos a altas temperaturas e calor seco. Apresentam propriedades antigênicas, pró-oxidantes, pró-inflamatórias, pró-fibróticas, pró-coagulantes e nefrotóxicas. O tecido renal torna-se um alvo particular por seu papel na depuração dessas substâncias, impedindo que se acumulem e evitando o aumento sustentado de seus níveis séricos, o que sofre a influência do envelhecimento, devido a diminuição da depuração renal naturalmente presente durante esse processo fisiológico. O acúmulo renal de AGEs pode resultar de seu aprisionamento quantitativo pela circulação, da geração local dessas substâncias, envolvendo proteínas pré-existentes, ou da diminuição patológica de sua depuração. A presença de AGEs em rins normais tem sido associada ao aparecimento de características histológicas semelhantes à glomerulosclerose diabética, com alargamento da membrana basal, aumento do volume glomerular, expansão da matriz mesangial extracelular, glomerulosclerose focal e albuminúria, além de estimular inflamação, fibrose e hipertrofia. As estruturas renais suscetíveis ao acúmulo de AGEs incluem membrana basal, células mesangiais e endoteliais, podócitos, e túbulos. Agentes antioxidantes e anti-glicantes como a vitamina tiamina podem prevenir os efeitos da exacerbada formação e acúmulo endógeno de AGEs. No presente protocolo experimental foi investigada a repercussão da ingestão crônica de dieta submetida a tratamento térmico (autoclavagem a 121,5°C, por 30 min) e diferentes níveis de tiamina sobre a fisiologia renal em ratos *Wistar* adultos saudáveis. Os resultados indicam que, após seis meses de tratamento, não foram encontradas alterações histológicas do tecido renal nem bioquímicas séricas entre os grupos estudados. O consumo crônico de dieta termolizada não promoveu o aparecimento de alterações morfo-funcionais no tecido renal de ratos adultos. Considera-se que a composição da dieta administrada tenha contribuído para o resultado observado.

### **Palavras-chave:**

Glicação. Dieta termolizada. Rins. Fisiologia. Tiamina.

## ABSTRACT

AGEs (advanced glycation end products) are end products of aminocarbonilics interactions exogenous sources whose main foods are subjected to high temperatures and dry heat. Have antigenic properties, pro-oxidant, proinflammatory, pro-fibrotic, pro-coagulants and nephrotoxic. The kidney tissue becomes a particular target for their role in the clearance of these substances, and preventing the accumulation preventing sustained increase in its serum levels, which is influenced by the aging due to the decreased renal clearance naturally present in the process physiological. The renal accumulation of AGEs may result from his imprisonment by the quantitative movement, local generation of these substances, proteins involving pre-existing pathological or decrease its clearance. The presence of AGEs in normal kidneys has been associated with the appearance of histological features similar to diabetic glomerulosclerosis, with enlargement of the basement membrane, increased glomerular volume, mensangial extracellular matrix expansion, focal glomerulosclerosis and albuminuria, and stimulate inflammation, fibrosis and hypertrophy. Kidney structures susceptible to the accumulation of AGEs include basement membrane, mesangial and endothelial cells, podocytes and tubules. Antioxidant and anti-glycantion agents as vitamin thiamine may prevent exacerbated the effects of endogenous formation and accumulation of AGEs. In this assay, we investigated the effect of chronic ingestion of diet subjected to heat treatment (autoclaving at 121.5°C for 30 min) with different levels of thiamine on renal physiology in healthy adult *Wistar* rats. The results indicate that after six months of treatment, there were no histological changes of renal tissue or serum biochemistry between the groups. The chronic consumption of diet termolized not promote the appearance of morphological and functional changes in kidney tissue of adult rats. It is considered that the diet composition administered may have contributed to the observed result.

### **Key words:**

Glycation. Termolized diet. Kidneys. Physiology. Thiamine.

## LISTA DE FIGURAS

### 2º artigo: artigo de resultados

### Página

Figura 1 Secção longitudinal representativa de uma amostra do rim esquerdo dos grupos experimentais Controle (A), Termolizada (B), Termolizada + tiamina nível 1 (C) e Termolizada + tiamina nível 2 (D).....

52

## LISTA DE TABELAS

### 2º artigo: artigo de resultados

### Página

Tabela 1	Parâmetros de qualidade das dietas e desenvolvimento dos animais experimentais submetidos às dietas Controle (comercial), Termolizada (controle autoclavada a 121,5°C/30 min), Termolizada + tiamina 1 (Termolizada + 6mg/kg de tiamina por dieta) e Termolizada + tiamina 2 (Termolizada + 120mg/kg de tiamina por dieta), por seis meses.....	50
Tabela 2	Análises bioquímicas séricas de glicose e de marcadores de função renal de ratos submetidos à dieta termolizada, com diferentes níveis de tiamina, por 23 semanas.....	51

## Lista de abreviaturas

AGER1 – Receptor 1 para AGEs  
AGEs – *Advanced glycation endproducts* (Produtos finais da glicação avançada)  
ANOVA – Análise de Variância  
CEA – Coeficiente de eficiência alimentar  
CML – carboxi-metil-lisina  
CTGF - Fator de Crescimento de Tecido Conectivo  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
HE – Hematoxilina-eosina  
IgA – Imunoglobulina A  
IL-1 – interleucina 1  
IL-6 – interleucina 6  
JAK2 – Janus Kinase 2  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
MG - metilglioxal  
NF-kB – Fator nuclear Kappa B  
RAGE – Receptor para AGEs  
SCAP - Proteína ativadora de clivagem  
sRAGE – RAGE (receptor para AGEs) solúvel  
SREBP - Proteína ligadora do elemento regulado por esteróis)  
STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição  
TGF- $\beta$ 1 – Fator beta 1 de transformação de crescimento  
TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa  
VCAM-1 - Molécula de adesão celular vascular 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>2 COLETÂNEA DE ARTIGOS.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Artigo de revisão</b> <b>Produtos da glicação avançada e fisiopatologia</b> <b>renal.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Artigo de resultados</b> <b>Repercussões fisiológicas da ingestão crônica de dieta termolizada</b> <b>associada a diferentes níveis de tiamina sobre o tecido renal em</b> <b>ratos adultos.....</b>	<b>40</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>5 ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

**1 INTRODUÇÃO GERAL**

A glicação constitui-se em uma série de reações não-enzimáticas que se processam através da interação inicial entre grupamentos carbonílicos, provenientes de açúcares redutores ou de seus produtos de oxidação ou de lipídios ou proteínas oxidados e aminas reativas, provenientes de proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucléicos. As reações intermediárias desse complexo processo químico dão origem a compostos dicarbonílicos, potentes agentes de glicação -dentre os quais se destacam o glioxal e o metilglioxal, por sua alta reatividade- que irão desencadear, em uma etapa mais avançada, a formação dos produtos finais de glicação avançada (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006; THORNALLEY, 2008; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010).

AGEs (do inglês *Advanced Glycation End Products*) ou produtos finais da glicação avançada, além da ocorrência nos ambientes intra e extracelular do organismo humano, podem ser formados nos alimentos durante seu processamento térmico, dependendo de sua composição em nutrientes e das condições do processamento aplicado em sua preparação (NUNES; BAPTISTA, 2001; GOLDBERG et al., 2002; VLASSARA et al., 2002). A literatura relata que o processo ocorre em temperatura de congelamento, mas de 40°C a 90°C é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, sendo a velocidade da reação duplicada a cada elevação de 10°C; acima de 100°C, o aumento de 10°C pode aumentar 600 vezes a reação. Além disso, o processo é favorecido por condições como pH, na faixa de 6 a 8 (preferencialmente alcalino), atividade de água entre 0,3 e 0,7 (atividade de água de 0,7 corresponde a maior taxa de reação) e presença de cátions metálicos, como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , que podem catalisar a reação (MORALES; VAN BOEKEL, 1997). Por outro lado, componentes alimentares de propriedade

antioxidante ou antiglicante, a exemplo da vitamina tiamina, representam uma contraposição à formação de AGEs.

Os AGEs tem sido implicados na fisiologia do envelhecimento e na patogênese de inúmeras doenças crônicas, dentre elas o diabetes mellitus, o câncer, a aterosclerose e a doença de Alzheimer. AGEs são substâncias antigênicas e dentre suas propriedades deletérias é possível citar suas capacidades pró-oxidante, pró-inflamatória, pró-trombótica, pró-coagulante e nefrotóxica. A literatura evidencia que AGEs circulantes aumentados são capazes de piorar o prognóstico de nefropatia diabética, insuficiência renal crônica e receptores de transplante renal (BOHLENDER et al, 2005; KANKOVA, 2008; DAROUX et al., 2010). Parte desses efeitos se deve a capacidade desses produtos em se ligar a proteínas corporais, produzindo nessas moléculas modificações estruturais e funcionais, enquanto são reconhecidos também os danos desencadeados por sua associação específica com receptores denominados RAGE (receptor para AGE). Em células suscetíveis, a presença extracelular de AGE pode rapidamente aumentar a expressão de RAGE, o que pode ser observado em podócitos glomerulares, em nefropatas diabéticos (SOULIS et al, 1997; TANJI et al, 2000; WENDT et al, 2003).

O rim é ao mesmo tempo um local para excreção de produtos finais de AGEs e alvo de seus intermediários precoces reativos. Quase todas as estruturas renais são suscetíveis a acumular AGEs, incluindo membrana basal, células mesangiais e endoteliais, podócitos, e túbulos (GUGLIUCCI & BENDAYAN, 1995). O aumento dos níveis plasmáticos de carboximetil lisina (CML), um marcador de formação de AGEs de importância reconhecida, tem sido associado a diversos processos patológicos, incluindo aqueles que comprometem a função renal (REDDY, BEYAZ, 2006; IKEDA et al., 1996; IMAI et al., 1997).

Considerando-se os prejuízos potenciais ao tecido renal da exposição aos produtos de glicação avançada e a contribuição da dieta para esse processo, realizou-se uma investigação da repercussão de uma dieta termolizada, como forma de promover o aumento da ingestão de AGEs, associada a diferentes concentrações de tiamina sobre o tecido renal de ratos *Wistar* adultos saudáveis, avaliando a morfologia do tecido e marcadores bioquímicos de função renal.

**2 COLETÂNEA DE ARTIGOS**

**1º artigo: artigo de revisão**

SILVA, RC; OLIVEIRA, SL; ATAÍDE, TR; SEARA, LT. Produtos da glicação avançada e doença renal.

## RESUMO

AGEs (do inglês *advanced glycation endproducts*) são produtos de interações aminocarbonílicas não enzimáticas, que ocorrem nos ambientes intra e extracelular e nos alimentos preparados em condições de calor seco (altas temperaturas e baixa umidade). Esse grupo heterogêneo de moléculas possui propriedades pró-oxidantes, pró-inflamatórias, pró-fibróticas e pró-coagulantes, sendo associados à patogênese de inúmeras doenças crônicas. Os efeitos desencadeados pelos AGEs no organismo são mediados, em parte, por sua associação com receptores denominados RAGE. Todos os tecidos orgânicos podem sofrer os prejuízos ocasionados pelos AGEs, sendo o tecido renal um alvo particular, por seu papel no metabolismo dessas substâncias, depurando-as e impedindo que se acumulem, o que previne o aumento sustentado de seus níveis séricos. O envelhecimento contribui para o acúmulo de AGEs, devido à diminuição da depuração renal naturalmente presente durante esse processo fisiológico. A presença de AGEs em rins normais tem sido associada ao aparecimento de características histológicas semelhantes à glomerulosclerose diabética, com alargamento da membrana basal, aumento do volume glomerular, expansão da matriz mensangial extracelular, glomerulosclerose focal e albuminúria. A inibição da glicação, em investigação com animais diabéticos, tem resultado em melhora glomerular e dos índices de dano renal. Nesse cenário, as atuais evidências apontam para uma participação dos AGEs circulantes na patogênese renal, independente de outras causas. A repercussão dos AGEs em rins normais ainda é um campo de estudo escasso. Maiores esclarecimentos são necessários a fim de elucidar os mecanismos de ação dos AGEs no tecido renal, incluindo a participação daqueles veiculados pela dieta, sua principal fonte exógena, na determinação desse processo.

## PALAVRAS-CHAVE

Glicação. Rim. Patogênese.

## ABSTRACT

AGEs (advanced glycation endproducts) are products of nonenzymatic aminocarbonilics interactions that occur in intracellular and extracellular environments and foods prepared in a dry heat (high temperatures and low humidity). This heterogeneous group of molecules possesses pro-oxidant, proinflammatory, pro-fibrotic and pro-coagulants, being associated with the pathogenesis of many chronic diseases. The effects triggered by AGEs in the body are mediated in part by its association with receptors called RAGE. All tissues may suffer damages due to AGEs, being the renal tissue a particular target for his role in the metabolism of these substances, debugging them and preventing them from building up, which prevents the sustained increase of plasma levels. Aging contributes to the accumulation of AGEs, due to decreased renal clearance naturally present during this physiological process. The presence of AGEs in normal kidneys have been associated with the appearance of histologic features similar to diabetic glomerulosclerosis, with enlargement of the basement membrane, increased glomerular volume, expansion of extracellular matrix mensangial, focal glomerulosclerosis and albuminuria. Inhibition of glycation in diabetic animal research, has resulted in improved glomerular and indices of renal damage. In this scenario, the current evidence points to an involvement of circulating AGEs in the pathogenesis of renal failure, independent of other causes. The impact of AGEs in normal kidneys is still a sparse field of study. Further clarifications are needed to elucidate the mechanisms of action of AGEs in renal tissue, including the participation of those served by the diet, its main exogenous source, the determination of this process.

## KEYWORDS

Glycation. Kidney. Pathogenesis.

## INTRODUÇÃO

Os produtos da glicação avançada, conhecidos pela sigla AGEs (do inglês *advanced glycation endproducts*), são provenientes de interações aminocarbonílicas não enzimáticas que ocorrem em ambiente endógeno (intra e extracelular) e exógeno, sendo a principal fonte, neste último caso, a dieta submetida a calor seco (altas temperaturas e baixa umidade), processo que sofre a influência também da variável tempo (VLASSARA et al., 2002; MONNIER, 2003; CAI et al., 2004; URIBARRI et al., 2005; HUEBSCHMANN et al., 2006; STIRBAN et al., 2006; CAI et al., 2007; THORNALLEY, 2008; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010). AGEs, também conhecidos como glicotoxinas dietéticas, são um grupo heterogêneo de moléculas e possuem propriedades pró-oxidantes, pró-inflamatórias, pró-fibróticas, pró-coagulantes e nefrotóxicas, sendo associados à patogênese de inúmeras doenças crônicas, que representam um problema de saúde pública no Brasil e em todo o mundo (KANKOVA, 2008; DAROUX et al., 2010)

Embora seja razoável considerar que todos os tecidos orgânicos possam ser alvos dos efeitos deletérios dos AGEs, o tecido renal, por seu papel no metabolismo dessas substâncias, constitui-se em um alvo particular. Os rins normais são responsáveis pela depuração dessas moléculas, impedindo o seu acúmulo e, conseqüentemente, evitando o aumento sustentado de seus níveis séricos. No entanto, o processo fisiológico de envelhecimento implica comumente em diminuição da depuração renal, fenômeno que pode acelerar o acúmulo endógeno de substâncias tóxicas, inclusive os AGEs, configurando-se o que se denomina como estresse carbonílico. Dessa maneira, estabelece-se um quadro favorável à instalação ou progressão de uma lesão renal (REDDY, BEYAZ, 2006; IKEDA et al.,

1996; IMAI et al., 1997; RAJ et al., 2000). Dessa forma, a presente revisão objetiva informar sobre os efeitos dos AGEs sobre a fisiologia e fisiopatologia renal.

## **PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA E FISIOPATOLOGIA RENAL**

Os efeitos deletérios dos AGEs se devem a sua capacidade de interagir com uma família de diferentes receptores celulares de membrana e de promover ligações cruzadas com proteínas biologicamente ativas, comprometendo-as estrutural e funcionalmente (AHMED et al., 2002; JAKUS; RIETBROCK, 2004; BIERHAUS et al., 2005). Recentes estudos indicam que AGEs desempenham um papel crítico, através da alteração da função e da estrutura das proteínas da matriz tecidual, e proteínas modificadas por AGEs acionam uma variedade de respostas celulares, através de receptores de superfície celular específicos, resultando em expressão e ativação de mediadores patogênicos, como TGF- $\beta$ 1, e estresse oxidativo, implicados no desenvolvimento e indução de nefropatia diabética (BOHLENDER et al, 2005). Tem sido bem explorada a associação entre AGEs, a nefropatia diabética e a insuficiência renal, assim como outras doenças renais.

Diversos estudos sugerem que AGEs estimulam a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio), incluindo ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, em uma variedade de tipos de células. Em células tubulares renais, estimulam, também, a síntese de matriz extracelular. Adicionalmente, AGEs estimulam a síntese de laminina e a inflamação renal, promovendo além de hipertrofia, a fibrose e a esclerose glomerular, sendo identificados em muitas estruturas renais (vasos, glomérulos, túbulos e interstício) e desempenhando, portanto, um importante papel no acúmulo de matriz extracelular que pode estar envolvida no surgimento de lesão renal, acompanhada de glomerulosclerose

progressiva, associada ou não ao diabetes e ao envelhecimento (DAROUX et al., 2010; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010).

O acúmulo de AGEs no rim pode ser resultante do seu aprisionamento quantitativo pela circulação, da geração local dessas substâncias, envolvendo proteínas pré-existentes, ou da diminuição patológica de sua depuração. O processo de captura renal de AGEs tem sido evidenciado pela infusão crônica intravenosa de albumina modificada por AGE (na forma de carboximetil lisina-CML) em ratos normais, sendo observado, após 5 meses de infusão, que o conteúdo renal de AGEs aumentou 50% em comparação com os animais controle; o grupo tratado com AGEs apresentou características histológicas semelhantes à glomerulosclerose diabética, com a presença de alargamento da membrana basal, aumento do volume glomerular, expansão da matriz mesangial extracelular, glomerulosclerose focal e albuminúria (VLASSARA et al, 1994). Esse trabalho constitui um dos poucos estudos indicando o efeito nefrotóxico do excesso de AGEs circulantes, em rins normais, e corrobora, parcialmente, investigações recentes que apontaram uma melhora glomerular e dos índices de dano renal, *in vivo*, em modelo de ratos diabéticos, através da inibição da glicação da albumina.

Torna-se possível inferir, a partir dessas e de outras investigações, que AGEs circulantes desempenham papel fundamental na patogênese renal, sendo capaz de precipitar complicações renais associadas ao diabetes, como a glomerulosclerose (COHEN et al, 1995; COHEN et al, 2000; WENDT et al, 2003). Quase todas as estruturas renais são suscetíveis a acumular AGEs, incluindo membrana basal, células mesangiais e endoteliais, podócitos, e túbulos (GUGLIUCCI & BENDAYAN, 1995).

AGEs são capazes de interagir com diferentes receptores de superfície celular, sendo o RAGE, uma proteína multiligante da família das imunoglobulinas, de reconhecida importância na mediação dos efeitos dos AGEs, o mais bem caracterizado entre eles (BROWNLEE, 2001). Existe um corpo crescente de evidências que mostra que AGEs são reguladores positivos da expressão celular de RAGE, causando maior interação AGE-RAGE. Em células tubulares renais, AGEs induziram expressivamente a síntese de RAGE (DAROUX et al., 2010; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010).

Os efeitos deletérios mediados via RAGE, nos tecidos, são causados pela geração de estresse oxidativo, hiper-regulação de vias inflamatórias e pró-trombóticas, seguidas de injúria tecidual (KALOUSOVA et al, 2009), e estimulação de transdutores de sinais da Janus Kinase 2 (JAK2, uma tirosina quinase) e ativadores da via de transcrição (STAT). A esse respeito, tem sido demonstrado que AGEs induzem a proliferação de fibroblastos intersticiais, em rins de ratos normais, por ativação da via JAK2-STAT. Particularmente em fibroblastos mesangiais, os sinais mediados por RAGE convergem para STAT5 e p21waf, para controlar o ciclo celular. Desse modo, AGEs induzem a hipertrofia celular renal. Outro importante fator que contribui para a manutenção da hipertrofia é a diminuída depuração proteica celular causada pela inibição de proteases (BROWNLEE, 2001; HUANG et al, 2009), o que pode estar relacionado a presença de AGEs. Alguns trabalhos tem mostrado a capacidade de alguns antioxidantes reverterem o efeito fibrótico dos AGEs em culturas de células renais submetidas a altas concentrações de AGEs e glicose (HUANG et al, 2005; WILCOX, 2005; HUANG et al, 2009).

Nos rins, RAGE é altamente expresso em podócitos normais, nos quais a interação AGE-RAGE pode desencadear a produção de superóxido (TANJI et al., 2000; McCARTY, 2005). RAGE não promove a captação e a remoção de AGEs, mas a ligação AGE-RAGE influencia a expressão de fatores de crescimento e citocinas, incluindo TGF- $\beta$ 1 e CTGF, e a ativação do fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B, induzindo assim inflamação persistente e regulando o crescimento e a proliferação de vários tipos de células renais (BIERHAUS et al., 2005; FORBES; SOLDATOS; THOMAS, 2005; BIERHAUS; NAWROTH, 2009).

Adicionalmente aos efeitos desencadeados pela associação com seu receptor, é válido considerar que os AGEs gerados intracelularmente pela peroxidação lipídica e pela fragmentação não oxidativa das trioses fosfatos derivadas da glicólise, exercem seus efeitos de maneira independente da interação com o RAGE, e esses efeitos parecem ser cruciais para o papel fisiopatológico no dano renal diabético associado aos AGEs. Os efeitos de AGEs independentes de RAGE incluem alteração da arquitetura da matriz extracelular pela glicação não enzimática de seus componentes e a formação de ligações cruzadas proteicas, enquanto o mecanismo dependente consiste na modulação das funções celulares através da ligação com um dos domínios extracelulares do receptor. Os AGEs formados no ambiente intracelular sofrem particular influência da hiperglicemia e, portanto, são importantes em pacientes diabéticos, devido à sobrecarga de glicose contribuir para formação expressiva de intermediários dicarbonílicos altamente reativos (NEEPER et al, 1992; TANJI et al, 2000).

Uma forma distinta do RAGE promove efeito diverso daquela envolvida nos danos desencadeados por AGEs. Um estudo sobre rim transplantado descreveu

uma correlação de sRAGE (RAGE solúvel) com o espessamento arteriolar hialino em enxerto, associando-se baixos níveis dessa proteína com risco aumentado de mortalidade em transplantados renais (GROSS et al, 2007). O sRAGE é um inibidor da ação AGE-RAGE, de ocorrência natural, e corresponde ao resultado da ação de metaloproteinases que promovem um “*splicing*” alternativo regulado, ou truncamento carboxiterminal na estrutura de RAGE, resultando em alteração de seus domínios extracelulares, do qual faz parte o domínio V – que se liga aos diversos ligantes, incluindo AGEs – e promove a cascata de eventos intracelulares mediados por RAGE. Portanto, a presença de sRAGE permite que todos os ligantes se liguem aos domínios extracelulares, mas impede que haja sinalização intracelular (KALOUSOVÁ et al, 2006).

A doença renal crônica está associada ao estresse oxidativo e carbonílico, microinflamação e, eventualmente, reação autoimune. Ambos, estresse carbonílico e oxidativo, causam danos a importantes moléculas biológicas -proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos-, influenciando a resposta inflamatória. O acúmulo de produtos da glicação, decorrente de condições como a insuficiência renal crônica, por exemplo, afeta a transcrição de genes que codificam citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão, via interação AGE-RAGE, como já mencionado, e o subsequente aumento de reagentes clássicos de fase aguda (proteína C reativa), bem como estimula, por outro lado, mecanismos protetores como o do sistema da glioxalase I, fenômenos observados em uma variedade de doenças crônicas (KALOUSOVA et al., 2005).

AGEs têm sido descobertos em tecidos renais com nefropatia por IgA, nefrite lúpica, nefropatia hipertensiva, fibrose renal e rejeição crônica ao transplante.

Variantes genéticas do gene RAGE tem sido associados a risco de desordens renais (SUZUKI et al., 1999; DAROUX et al., 2010) e a formação de AGEs *in vitro* tem sido implicada no aumento da permeabilidade da membrana basal glomerular intacta (COCHRANE; ROBINSON, 1995).

O aumento dos níveis plasmáticos de carboximetil lisina (CML), um marcador de formação de AGEs de importância reconhecida, tem sido associado a diversos processos patológicos, incluindo aqueles que comprometem a função renal (REDDY, BEYAZ, 2006; IKEDA et al., 1996; IMAI et al., 1997). Estudos mostram que uma elevada concentração sérica de CML está associada à doença renal crônica em homens e mulheres não diabéticos, configurando-se como um promissor biomarcador, tanto de estresse oxidativo, quanto de risco de doença renal (LESLIE et al., 2003; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010).

Considera-se que AGEs podem ser marcadores de insuficiência renal em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, uma vez que apresentam uma correlação positiva com outros parâmetros clínicos tradicionais, como a creatinina e a cistatina C, e correlação negativa com a taxa de filtração glomerular. Além disso, pacientes com insuficiência renal apresentam, em média, valores mais elevados de AGEs fluorescentes; dessa maneira, tais compostos apresentam-se como um marcador independente de insuficiência renal, como verificado através de análise multivariada (ROUBIN et al, 2011).

A associação dos AGEs como um dos fatores causais da nefropatia está bem estabelecida, porém o papel biomolecular desse grupo heterogêneo de moléculas sobre os eventos desencadeados permanecem sendo investigados. Particularmente no contexto do portador de diabetes, a nefropatia está associada ao acúmulo lipídico

glomerular. Em estudo *in vitro* de Yuan et al (2011), foi descoberto que CML aumenta o acúmulo lipídico por alterar a função da proteína ativadora de clivagem (SCAP) e da proteína ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP), em células humanas mesangiais; observou-se que CML aumentou o acúmulo de colesterol nessas células e a expressão e a translocação anormal de SCAP, mesmo na presença de alta concentração de LDL; a translocação de SCAP é responsável por promover o transporte de SREBP-2 para o complexo de Golgi, para a ativação de clivagens proteolíticas, aumentando a transcrição de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase e do receptor de LDL. A CML também foi capaz de aumentar a atividade de manosidase no complexo de Golgi, podendo aumentar a glicosilação da SCAP e, conseqüentemente, afetar sua atividade biológica, o que pode ser confirmado pela observação de que os efeitos da CML foram bloqueados por inibidores de manosidade no complexo de Golgi. É possível, através desse estudo, afirmar que a CML aumenta a síntese e captação/absorção de lipídios, causando formação de células espumosas, via aumento da transcrição e da glicosilação proteica de SCAP, em células mesangiais humanas, porém estudos adicionais devem ser realizados para confirmar a dinâmica desse processo, inclusive em outros modelos.

Ainda no contexto do diabetes, Beisswenger et al (1995), ao investigar a correlação de AGEs com complicações renais associadas à doença, encontrou um significativo aumento dos AGEs teciduais, com aumento de albumina urinária, durante a fase de pré-microalbuminúria da nefropatia, havendo, particularmente, uma correlação dos AGEs fluorescentes com a excreção de albumina. Berg et al (1997) se propuseram a investigar se AGEs circulantes eram capazes de prever a progressão patológica em pacientes com nefropatia diabética. Nesta investigação foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis séricos de AGE, no início do

estudo, e as mudanças durante o seguimento do protocolo, em relação à espessura da membrana basal e à relação matriz/fração de volume glomerular.

A literatura revela que há acúmulo plasmático e tecidual de AGEs com o avançar da idade, evidenciando que sejam potenciais toxinas urêmicas e que atuem na patogênese de complicações vasculares e renais associadas ao envelhecimento, sendo corriqueiramente acompanhada por perda da função renal (RAJ et al., 2000).

O envelhecimento acarreta aumento da inflamação, estresse oxidativo e é um dos fatores responsáveis pela redução da função renal em indivíduos normais, ainda que, segundo estudos, a função renal não decline em alguns indivíduos. Devido a propriedade dos AGEs de induzir processo inflamatório e estresse oxidativo e de se acumularem com a idade, principalmente por serem excretados pelos rins, suspeita-se que diminuir a exposição do organismo a essas substâncias, durante o envelhecimento, poderia resultar em redução da função renal menos expressiva; de modo recíproco, a preservação da função renal adequada é fundamental para manter os níveis corporais de AGEs em níveis não tóxicos, já que este órgão é o principal sítio de excreção dessas substâncias (KOSCHINSKY et al, 1997; VLASSARA et al, 2009). Dessa forma, o acúmulo de AGEs devido a diminuição lenta e progressiva da função renal, no envelhecimento, pode induzir a liberação de mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, antes de haver uma manifestação clínica evidente e mensurável de diminuição da função renal, sendo ambos – inflamação e estresse oxidativo – fatores de risco para o envelhecimento renal (KOSCHINSKY et al, 1997; OBERG et al, 2004).

Como apontado anteriormente, o rim é ao mesmo tempo um local para excreção de produtos finais de AGEs e alvo de seus intermediários precoces

reativos. Esses intermediários ligados a pequenos peptídeos podem ser filtrados pelo glomérulo e reabsorvidos pelo túbulo proximal através do filtrado, ou podem ser diretamente reabsorvidos para o sangue, nos capilares peritubulares. O túbulo proximal pode também metabolizar AGEs a produtos não-reativos, sendo este órgão portanto um dos reguladores mais importantes do metabolismo dessas substâncias durante o envelhecimento (KOSCHINSKY et al, 1997; VLASSARA et al, 2002; OBERG et al, 2004; URIBARRI et al, 2007; LINDEN et al, 2008). Na verdade, o envelhecimento está associado à baixa excreção urinária de produtos de Amadori da albumina glicada. Em ratos jovens e velhos foi observado que a ligação de albumina glicada em vesículas da borda em escova da membrana renal é dependente de concentração, saturável e reversível, observando-se também que parecem existir sítios de ligação diferentes para a albumina glicada e a albumina nativa (VERBEKE et al, 1996).

Uma clara ligação entre a dieta e o papel dos AGEs na inflamação e no estresse oxidativo subjacentes a doenças crônicas tem sido observada em estudos com ratos. Demonstrou-se que a diminuição da ingestão de AGEs reduz a doença renal crônica no envelhecimento. Esses dados suportam o papel dos AGEs no desenvolvimento de lesões renais em ratos envelhecidos e revelam que AGEs dietéticos são contribuintes muito importantes para a instalação dessas lesões, uma vez que se correlacionam diretamente com os níveis de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, e inversamente como a depuração de creatinina (BIERHAUS et al., 2005; LINDEN et al, 2008; BIERHAUS; NAWROTH, 2009).

## Dieta e AGEs

O significado do acúmulo de AGEs pelo organismo tem sido verificado pela observação de que a restrição de AGEs dietéticos é tão eficiente na prevenção de lesões renais relacionadas com o envelhecimento, quanto a restrição calórica. O conteúdo dietético de AGEs determina os seus níveis séricos e urinários, bem como os níveis de mediadores inflamatórios, tanto em indivíduos normais, como em portadores de insuficiência renal crônica, sendo a redução da ingestão de AGEs capaz de controlar essas mudanças, em ambos os casos (LI et al, 1996).

Por outro lado, estudos indicam os danos promovidos pela exposição a quantidades elevadas de AGEs dietéticos. Em ratos alimentados com dieta de alto teor em AGEs, foram detectados aumento da concentração plasmática e da excreção urinária de AGEs, bem como ganho de peso, aumento da excreção proteica renal e da expressão renal de citocina pró-fibrótica (VLASSARA et al., 2002; URIBARRI et al., 2005; KANKOVA, 2008). Em roedores diabéticos, dietas consideradas de elevado teor em AGEs aceleraram o desenvolvimento de nefropatia e de ateroma, em comparação com dietas com teor de macronutrientes similar, porém de baixo teor nesses compostos (McCARTY, 2005).

Em ratos, foram encontradas mudanças glomerulares aos 18-20 meses de idade, antes de serem reconhecidas alterações tubulointersticiais, e esses animais desenvolveram albuminúria e diminuição da função renal, migrando progressivamente para a morte, aos 30 meses de idade. Observou-se que a redução do consumo dietético de AGEs bloqueou o desenvolvimento de doença renal crônica

associada ao envelhecimento, o que conseqüentemente refletiu-se em sobrevivência prolongada (ZHENG et al, 2004; ZHENG et al, 2005; CAI et al, 2007).

Em camundongos alimentados com uma dieta com restrição calórica, e cujo conteúdo de AGEs foi aumentado por tratamento térmico breve, foram encontrados níveis elevados de 8-isoprostanos, AGEs, RAGE e p66<sup>shc</sup>, nos animais envelhecidos, associados a baixo AGER1 (Receptor 1 para AGE) – o qual aumenta a depuração de AGEs e regula negativamente RAGE -, marcada fibrose renal e tempo de vida encurtado, enquanto os animais submetidos apenas à restrição calórica apresentaram resultados contrários no que se refere a todos esses parâmetros. Sugere-se que os efeitos benéficos de uma dieta restrita em calorias se devem, parcialmente, à diminuída oferta de oxidantes através da alimentação – incluindo AGEs - e que este é certamente um dos determinantes do estado oxidante no envelhecimento em camundongos, em vez da diminuição da ingestão energética (CAI et al, 2007).

O benefício da redução da ingestão de AGEs também pode ser verificado em contexto clínico. Dietas com baixa teor de glicotoxinas promoveram a redução dos níveis séricos de AGEs, em portadores de diabetes, bem como, especificamente os níveis de CML, em pacientes com falha renal, em 40% e 30% respectivamente. AGEs, portanto, contribuem para o declínio da função renal, em um ciclo vicioso de metabolização e acúmulo pelos rins, amplificando os danos gerados por essas moléculas. Embora a redução da depuração renal e o aumento do estresse oxidativo possam ser as mais importantes causas de altos níveis de AGEs, em pacientes com doença renal crônica, a dieta parece ser uma importante fonte dessas substâncias altamente reativas (CHUNG et al., 2007). Adicionalmente, estudos *in vivo* e *in vitro*

demonstram seu papel essencial na patogênese da nefropatia diabética e na progressão e complicações da insuficiência renal (RAJ et al., 2000; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010), sendo o uso de quelantes e inibidores de AGEs capaz de melhorar a função renal, em pacientes diabéticos e modelos animais (SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010). Em cerca de 300 humanos saudáveis, a investigação da presença de CML e de um intermediário altamente reativo e menos estável - o metilglioxal (MG) - no soro, mostrou que ambos são mais elevados em indivíduos mais velhos, que os níveis de AGEs (CML) estão correlacionados com marcadores inflamatórios circulantes, como 8-isoprostanos, TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1) e proteína C reativa, e, por fim, que AGEs (CML) são preditores independentes de estresse oxidativo em indivíduos saudáveis (VLASSARA, 1996; URIBARRI et al, 2007).

Além disso, o desenvolvimento desse protocolo permitiu concluir que a ingestão dietética de AGEs correlaciona-se com os níveis de intermediários dicarbonílicos altamente reativos e marcadores de estresse oxidativo, indicando que a alta ingestão crônica e sustentada desses compostos pode se sobrepôr a capacidade de defesas antioxidantes e detoxificantes responsáveis por conter seu acúmulo no organismo, removendo-os ou neutralizando-os. Dessa forma, é possível afirmar, também, que o consumo crônico de AGEs pode, independente da idade, estimular o estresse oxidativo e contribuir, portanto, para a patogênese da maioria das doenças crônicas. Estes resultados apoiam a ligação entre a exposição a cargas exógenas de oxidantes e o processo inflamatório. O impacto da restrição de AGEs foi também avaliado em indivíduos com doença renal crônica não relacionada ao envelhecimento, sendo encontrada uma redução da inflamação entre 40-60%,

semelhante aos indivíduos saudáveis (VLASSARA, 1996; URIBARRI et al, 2003; URIBARRI et al, 2007; VLASSARA et al, 2009).

## **CONCLUSÃO**

Há um corpo crescente de evidências que apontam para uma associação entre o acúmulo de AGEs no organismo e inúmeras doenças crônicas, incluindo aquelas que afetam os rins, como a nefropatia diabética e a insuficiência renal crônica, dentre outras. Por outro lado, são escassos os modelos que investigam os efeitos dos AGEs sobre a fisiologia renal, independente de um quadro patológico ou condição fisiológica particular, como o envelhecimento, através de modelos biológicos saudáveis. Adicionalmente, no que se refere aos prejuízos fisiológicos desencadeados pelos AGEs, deve-se ponderar que o consumo dietético dessas substâncias nefrotóxicas pode acelerar a perda de função renal, repercussão que ganha especial importância, quando se considera que os rins consistem em importante sítio de metabolização dos AGEs. O esclarecimento das vias envolvidas nos efeitos deletérios dos AGEs sobre o sistema renal torna-se necessário, a fim de se compreender a extensão do dano promovido por esse grupo de compostos e, conseqüentemente, de modo a orientar a elaboração de medidas preventivas e terapêuticas para o adequado controle da doença renal.

## REFERÊNCIAS

AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-Nhydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Ne-carboxymethyl-lysine and Ne-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochem. J.** v. 364, p. 1-14, 2002.

BEISSWENGER, P. J. et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. **Diabetes.** v. 7, p. 824-9, 1995.

BERG, T. J. et al. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism.** v. 6, p. 661-5, 1997.

BIERHAUS, A. et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end Products. **J Mol Med.** v. 83, p. 876–886, 2005.

BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. **Diabetologia.** v. 52, p. 2251–2263, 2009.

BOHLENDER, J. M. et al. Advanced glycation end products and the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 289, p. 645-659, 2005.

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

CAI, W. et al. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. **Am J Pathol.** v. 173, p. 327-336, 2004.

CAI, W. et al. Reduced Oxidant Stress and Extended Lifespan in Mice Exposed to a Low Glycotoxin Diet: Association with Increased AGER1 Expression. **American Journal of Pathology.** v. 170, p. 1893-1902, 2007.

CAI, W. et al. Reduced Oxidant Stress and Extended Lifespan in Mice Exposed to a Low Glycotoxin Diet: Association with Increased AGER1 Expression. **American Journal of Pathology.** v. 170, p. 1893-1902, 2007.

CHUNG, S. H. et al. Identifying and managing malnutrition stemming from different causes. **Peritoneal Dialysis International.** v. 27, p. 239-244, 2007.

COCHRANE, S. M.; ROBINSON, G. B. *In vitro* glycation of glomerular basement membrane alters its permeability: a possible mechanism in diabetic complications. **FEBS Letters.** v. 375, p. 41-44, 1995.

COHEN, M. P. et al. Prevention of diabetic nephropathy in *db/db* mice with glycated albumin antagonists: a novel strategy. **J Clin Invest.** v. 95, p. 2338–2345, 1995.

COHEN, M. P. et al. Inhibiting albumin glycation ameliorates diabetic nephropathy in the *db/db* mouse. **Exp Nephrol.** v. 8, p. 135–143, 2000.

DAROUX, M. et al. Advanced glycation end-products: Implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. **Diabetes & Metabolism.** v. 36, p. 1–10, 2010.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Advanced Glycation End Products that Detour “around the side: Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **Clin Biochem Rev.** v. 26, p. 123–134, 2005.

GROSS, S. et al. Low levels of sRAGE are associated with increased risk for mortality in renal transplant recipients. **Transplantation.** v. 5, p. 659–63, 2007.

GUGLIUCCI, A., BENDAYAN, M. Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. An ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. **J Histochem Cytochem.** v. 43, p. 591–600, 1995.

HUANG, J. S. et al. Effect of nitric oxide/GMP-dependent protein kinase activation on advanced glycation endproduct-induced proliferation in renal fibroblasts. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 16, p. 2318–2329, 2005.

HUANG, J. S. et al. Effects of Nitric Oxide and Antioxidants on Advanced Glycation End Products-Induced Hypertrophic Growth in Human Renal Tubular Cells. **Toxicological Sciences.** v. 1, p. 109–119, 2009.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. **Diabetes Care.** v. 29, p. 1420–1432, 2006.

IKEDA, K. et al. N-(Carboxymethyl)lysine Protein Adduct Is a Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction. **Biochemistry.** v. 35, p. 8075–8083, 1996.

IMAI, N. et al. Histological Localization of Advanced Glycosylation End Products in the Progression of Diabetic Nephropathy. **Nephron.** v. 76, p. 153–160, 1997.

JAKUŠ, V.; RIETBROCK, N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. **Physiol. Res.** v. 53, p. 131–142, 2004.

KALOUSOVA, M. et al. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases—clinical chemistry and genetic background. **Mutation Research.** v. 579, p. 37–46, 2005.

KALOUSOVÁ, M. et al. RAGE polymorphisms, renal function and histological finding at 12 months after renal transplantation. **Clinical Biochemistry.** v. 42, p. 347–352, 2009.

KALOUSOVÁ, M. et al. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients With Decreased Renal Function. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 47, p. 406-411, 2006.

KANKOVA, K. Diabetic threesome (hyperglycaemia, renal function and nutrition) and advanced glycation end products: evidence for the multiple-hit agent? **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 67, p. 60–74, 2008.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glicotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6476-6479, 1997.

LESLIE, R. D. G. et al. Level of an Advanced Glycated End Product Is Genetically Determined A Study of Normal Twins. **Diabetes**. v. 52, p. 2441-2444, 2003.

LI, Y. M. et al. Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 93, p. 3902-7, 1996.

LINDEN, E. et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. **Clin J Am Soc Nephrol**. v. 3, p. 691-8, 2008.

McCARTY M. F. The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics – though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. **Medical Hypotheses**. v. 64, p.394–398, 2005.

McCARTY, M. F. The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics – though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. **Medical Hypotheses**. v. 64, p.394–398, 2005.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. **Arch Biochem Biophys**. v. 419, p. 1-15, 2003.

NEEPER, M. et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem**. v. 267, p.14998–15004, 1992.

OBERG, B. P. et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney Int**. v. 65, p. 1009-16, 2004.

RAJ, D. S. C. et al. Advanced Glycation End Products: A Nephrologist's Perspective. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 35, p. 365-380, 2000.

REDDY, V. P.; BEYAZ, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. **Drug Discovery Today**. v. 11, p. 646-54, 2006.

ROUBIN, S. R. et al. Productos de glicación avanzada: nuevo marcador de disfunción renal en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. **Medicina clínica**, v. 136, p. 513-521, 2011.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCI, L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 65, p. 963-975, 2010.

STIRBAN, A. et al. Benfotiamine prevents macro and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 29, p. 2064-71, 2006.

SUZUKI, D. et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesion. **J Am Soc Nephrol**. v. 10, p. 822–832, 1999.

TANJI, N. et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. **J Am Soc Nephrol**. v. 11, p. 1656–1666, 2000.

THORNALLEY, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. **Drug Metabol Drug Interact**. v. 23, p. 125-150, 2008.

URIBARRI, J. et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 62, p. 427-33, 2007.

URIBARRI, J. et al. Diet-derived Advanced Glycation End Products are Major Contributors to the Body's AGE Pool and Induce Inflammation in Health Subjects. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1043, p. 461-6, 2005.

URIBARRI, J. et al. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. **J Am Soc Nephrol**. v. 14, p. 728-31, 2003.

VERBEKE, P. et al. Effect of glycation of albumin on its binding to renal brush-border membrane vesicles: influence of aging in rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1282, p. 93-100, 1996.

VLISSARA, H. et al. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 11704–11708, 1994.

VLISSARA, H. et al. Identifying Advanced Glycation End Products as a Major Source of Oxidants in Aging: Implications for the Management and/or Prevention of Reduced Renal Function in Elderly Persons. **Seminars in Nephrology**, v. 29, p. 594-603, 2009.

VLISSARA, H. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 15596-601, 2002.

VLISSARA, H. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 15596-601, 2002.

VLASSARA, H. et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low AGE intake; role of a new antiinflammatory AGE-receptor-1. **Endocrinology**. 2009. In press.

VLASSARA, H. Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. **Kidney Int.** v. 49, p. 1795-804, 1996.

WENDT, T. et al. Glucose, glycation and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol.** v. 14, p. 1383–1395, 2003.

WILCOX, C. S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: A critical link to hypertension? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 289, p. 913–935, 2005.

YUAN, Y. et al. Advanced glycation end products (AGEs) increase human mesangial foam cell formation by increasing Golgi SCAP glycosylation in vitro. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 1, p. 236-43, 2011.

ZHENG, F. et al. Glomerular aging in females is a multi-stage reversible process mediated by phenotypic changes in progenitors. **Am J Pathol.** v. 162, p. 355-63, 2005.

ZHENG, F. et al. The glomerulosclerosis of aging in females: contribution of the proinflammatory mesangial cell phenotype to macrophage infiltration. **Am J Pathol.** v. 165, p. 1339-48, 2004.

**2º artigo: artigo de resultados**

SILVA, RC; OLIVEIRA, SL; ATAÍDE, TR; JÚNIOR, CRC; BALWANI, MCLV.  
Repercussões fisiológicas da ingestão crônica de dieta termolizada associada a diferentes níveis de tiamina sobre o tecido renal em ratos adultos

## RESUMO

AGEs (do inglês *advanced glycation end products*) são produtos finais de interações aminocarbonílicas cujas principais fontes exógenas são alimentos submetidos a altas temperaturas e calor seco. No rim AGEs estimulam a inflamação e síntese de fibronectina, laminina e colágeno IV, e promove fibrose, hipertrofia e esclerose glomerular. Antioxidantes/anti-glicantes como a vitamina tiamina podem prevenir o acúmulo endógeno de AGEs. O objetivo deste trabalho consistiu em investigar os efeitos da ingestão crônica de dieta termolizada, rica em AGEs, e diferentes concentrações de tiamina sobre parâmetros morfo-funcionais do tecido renal em ratos *Wistar* adultos. Ratos machos *Wistar*, de cinco meses de idade, foram subdivididos em quatro grupos experimentais, segundo as dietas oferecidas: controle (C), termolizada (T), autoclavada a 121,5°C por 30 min; termolizada, com tiamina nível 1 (TT1), de 6 mg de tiamina/kg de dieta e termolizada com tiamina nível 2 (TT2), de 120 mg de tiamina/kg de dieta. Após seis meses de tratamento, os animais foram anestesiados e realizou-se a coleta de amostras de rim para análise histológica e de sangue para obtenção do soro. Foram determinadas as concentrações séricas de creatinina, ácido úrico, uréia, sódio, potássio, cálcio e fósforo, por meio de *Kits* laboratoriais. Não foram encontradas alterações histológicas e dos marcadores bioquímicos nos grupos experimentais. O consumo crônico de dieta termolizada não promoveu o aparecimento de alterações morfo-funcionais no tecido renal de ratos adultos. Considera-se que a composição das dietas utilizadas, a exemplo de elementos anti-glicantes, possa ter contribuído para esse panorama.

## PALAVRAS-CHAVE

Dieta. Glicação. Tiamina. Tecido renal.

## ABSTRACT

Advanced glycation endproducts (AGEs) are aminocarbonilics interactions end-products whose main exogenous sources are foods subjected to high temperatures and dry heat. In kidney AGEs stimulate inflammation, fibronectin, laminin and collagen IV synthesis and promote fibrosis, hypertrophy and glomerular sclerosis. Antioxidant / anti-glicantes as vitamin thiamine may prevent the accumulation of endogenous AGEs. The objective of this study was to investigate the effects of chronic ingestion of termolized diet, rich in AGEs, and different concentrations of thiamine on morpho-functional parameters of renal tissue in adult Wistar rats. Male Wistar rats, five months old, were divided into four groups according to the offered diets: control (C), termolizada (T), autoclaved at 121.5 ° C for 30 min; termolizada with thiamine level 1 (TT1), 6 mg of thiamine / kg diet termolizada with thiamine and level 2 (TT2), 120 mg of thiamine / kg diet. After six months of treatment, animals were anesthetized and held collecting kidney samples for histological examination and for obtaining blood serum. We determined serum concentrations of creatinine, uric acid, urea, sodium, potassium, calcium and phosphorus, through laboratory kits. Histological and biochemical markers changes were not found in the experimental groups. The chronic consumption of diet termolizada not promote the appearance of morphological and functional changes in kidney tissue of adult rats. It is considered that the composition of the diets, like anti-glicantes elements, may have contributed to this situation.

## KEYWORDS

Diet. Glycation. Thiamine. Renal tissue.

## INTRODUÇÃO

A glicação é um complexo processo químico não-enzimático que ocorre tanto nos organismos vivos, nos meios intra e extracelular, como no meio ambiente, notadamente no contexto da preparação dos alimentos. Constitui-se em uma série de reações, que se processam através da interação inicial entre grupamentos carbonílicos, provenientes de açúcares redutores ou de seus produtos de oxidação ou de lipídios ou proteínas oxidados e amins reativas, provenientes de proteínas, aminofosfolípídeos ou ácidos nucleicos. Essas reações originam intermediários dicarbonílicos, potentes agentes de glicação, dentre os quais destacam-se o glioxal e o metilglioxal, por sua alta reatividade, que irão desencadear, em uma etapa mais avançada, a formação dos produtos finais de glicação avançada (MONNIER, 2003; HUEBSCHMANN et al., 2006; THORNALLEY, 2008; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010).

Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados a sua capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Através da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares como o RAGE (receptor de AGEs), os AGEs promovem respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de fatores de crescimento (AHMED et al., 2002; JAKUS; RIETBROCK, 2004; BIERHAUS et al., 2005).

AGEs, portanto, são um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades pró-oxidantes e pró-inflamatórias reconhecidas e que podem acionar respostas celulares pró-fibróticas e pró-coagulantes, exercendo múltiplos efeitos

biologicamente importantes em organismos vivos, pela modificação direta de proteínas e suas funções (KANKOVA, 2008; DAROUX et al., 2010). Uma extensiva literatura associa a dieta à inflamação subclínica, fenômeno comumente encontrado no ocidente moderno, cuja iniciação pode ter forte influência dos AGEs dietéticos (NEADE; URIBARRI, 2008).

Métodos como fritar, assar e grelhar potencializam a formação de AGEs, enquanto a cocção dos alimentos sob temperaturas mais brandas, por períodos curtos de tempo e em presença de umidade, como o cozimento em água ou em vapor, contribuem para o menor conteúdo dietético em AGEs (VLASSARA et al., 2002; CAI et al., 2004; URIBARRI et al., 2005; STIRBAN et al., 2006; CAI et al., 2007). A dieta constitui, portanto, a principal fonte exógena de AGEs, sobretudo a dieta ocidental, que agrega os fatores responsáveis por acelerar a formação desses compostos em alimentos (KANKOVA, 2008; SEMBA; NICKLETT; FERRUCCI, 2010). Ao mesmo tempo, o processamento de alimentos pode induzir a perda de substâncias antioxidantes protetoras, incluindo vitaminas como a C e a E, além de compostos como carotenóides e substâncias antiglicantes, como a vitamina tiamina.

Evidências afirmam que AGEs dietéticos se somam ao *pool* endógeno, representando impacto negativo para a saúde por favorecer o surgimento e a progressão de diversas doenças (PEPPA; URIBARRI; VLASSARA, 2003; KANKOVA, 2008). A relação entre AGEs e inúmeras doenças crônicas tem sido amplamente descrita na literatura científica, a exemplo do diabetes e suas complicações micro e macrovasculares (BROWNLEE, 2001; PEPPA; URIBARRI; VLASSARA, 2003; RAHBAR; FIGAROLA, 2003), esteatose, esteatohepatite e cirrose hepática, além de enfermidades inflamatórias do intestino grosso

(BENGMARK; GIL, 2007; HYOGO et al., 2007) e doenças renais, com destaque para a nefropatia diabética e a insuficiência renal crônica (BUSCH et al., 2006).

Embora existam relatos de que apenas cerca de 10% dos AGEs ingeridos sejam absorvidos, como componentes de oligopeptídeos, estes ainda podem exercer efeitos adversos pela interação com RAGE ou por ligação covalente nos tecidos (McCARTY, 2005). A ingestão dietética progressiva de AGEs contribui para o acúmulo corporal destes produtos, aumentando seus níveis circulantes e teciduais, o que pode concorrer para o aumento de marcadores inflamatórios. Tem-se mostrado que a redução da ingestão dietética de AGEs diminui seus níveis séricos e de mediadores inflamatórios, o que pode representar um importante complemento para as intervenções dirigidas à inibição da glicação endógena (RAJ et al., 2000; FORBES; SOLDATOS; THOMAS, 2005; URIBARRI et al., 2005; DAROUX et al., 2010).

A dieta estabelece-se, portanto, como uma fonte ambiental potencialmente significativa de AGEs, podendo constituir-se um fator de risco crônico para lesão (GOLDBERG et al., 2002; SATO et al., 2009). Muitos estudos em modelos animais e em humanos esclarecem o papel dos AGEs em processos patológicos, envolvendo os rins secundariamente, a exemplo da nefropatia diabética, cuja causa primária é o Diabetes Mellitus. No entanto, são escassas as investigações acerca da repercussão de AGEs dietéticos especificamente sobre o tecido renal, em indivíduos saudáveis.

Considerando, então, que as evidências indicam o potencial deletério dos AGEs sobre diversos tecidos; que a dieta constitui a principal fonte exógena de AGEs, contribuindo para o aumento dos níveis séricos desses compostos em animais e humanos; que o tecido renal constitui-se o tecido responsável pela depuração dos AGEs endógenos, tornando-se, ao mesmo tempo, um alvo

importante do efeito deletério dessas substâncias; que antioxidante/antiglicantes possuem propriedades protetoras importantes para reduzir a capacidade de formação endógena de AGEs, e considerando por fim a escassez de estudos que relatem o papel dos AGEs sobre o tecido renal em animais saudáveis, justifica-se o presente protocolo experimental, visando fornecer elementos para esclarecer a repercussão da ingestão crônica de dieta termolizada (considerada fonte de AGEs dietéticos) associada a diferentes níveis da vitamina antioxidante tiamina sobre o tecido renal, em ratos adultos saudáveis.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

**Animais e dietas:** 30 ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade, foram acondicionados em gaiolas coletivas (quatro animais em cada gaiola), recebendo dieta padrão comercial (Labina, Purina do Brasil), até os cinco meses de idade. Posteriormente, foram subdivididos em quatro grupos, de forma homogênea em relação ao peso, em gaiolas semi-metabólicas individuais, conforme diferentes tratamento dietéticos, sendo assim constituídos: **Grupo Controle (C)**, submetido à dieta padrão comercial ( $n=8$ ); **Grupo** recebendo dieta controle submetida a tratamento térmico, chamada termolizada ( $n=7$ ) **(T)**; **Grupo** submetido à dieta termolizada, suplementada com tiamina nível 1 ( $n=7$ ) **(TT1)** e **Grupo** submetido à dieta termolizada, suplementada com tiamina nível 2 ( $n=8$ ) **(TT2)**. As dietas dos grupos TT1 e TT2 foram oferecidas no formato em pó, em virtude da adição de tiamina, uma vitamina termolábil, posterior ao tratamento térmico.

A dieta termolizada foi confeccionada no Laboratório Controle de Qualidade dos Alimentos da Faculdade de Nutrição (FANUT), conforme o protocolo estabelecido por Shangari et al. (2007) Submeteu-se a dieta controle, em autoclave

(Autoclave Vertical Phoenix), a três ciclos, de cinco minutos, e um último ciclo, com duração de 30 minutos, a temperatura de 121,5°C, com intervalo de 10 minutos entre cada ciclo. Parte da dieta termolizada foi triturada e dividida em duas porções, para o estabelecimento de dois níveis de suplementação de tiamina: nível 1 para o grupo TT1 (adição de 6 mg de tiamina/Kg de dieta, conforme as necessidades fisiológicas para roedores) (Reeves, 1997) e nível 2 para o grupo TT2 (adição de 120 mg de tiamina/Kg de dieta). O nível 1 foi estipulado a fim de se garantir a concentração de tiamina recomendada para a espécie, considerando-se a perda potencial da vitamina pelo tratamento térmico, e o nível 2, para ofertar uma cota suplementar, que, neste protocolo, consistiu em um aumento da recomendação em 20 vezes. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial da FANUT (24±1°C; ciclo claro/escuro de 12 h), durante o período experimental de 23 semanas. Os animais foram pesados (balança MARTE AS5000C, Máx. 5.000g, Mín. 5g, e=1g, d=0,1g, classe II, temperatura de trabalho 10-40 °C) semanalmente e tiveram acesso à água e a dieta *ad libitum*. A cada semana, realizou-se, também, o controle da ingestão alimentar.

Ao fim da etapa experimental, após jejum de 12h, os animais foram anestesiados para a coleta de amostras de sangue, por punção cardíaca. O sangue foi centrifugado (3500 x *g por* 20 min), para obtenção de soro. Da mesma forma, foram obtidas amostras de rins para posterior análise histológica. Procedeu-se à imersão do rim esquerdo em formol a 10%, para fixação. O presente protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas sob número de processo 011605/2010-57.

**Análises Bioquímicas:** Para avaliação da integridade da função renal, foram determinados os valores séricos de uréia, ácido úrico, creatinina, sódio, potássio,

cálcio e fósforo. Determinou-se também a concentração sérica de glicose. Todas as medições foram realizadas através de medições espectrofotométricas por meio de *kits* laboratoriais, por laboratório da rede credenciada de Maceió (UNILAB).

**Análise histológica dos rins:** após fixação em formol a 10%, o órgão foi clivado, adotando-se cortes longitudinais. As alterações macroscópicas, quando presentes, foram igualmente consideradas para análise histológica. Os fragmentos obtidos foram processados, incluídos em parafina e corados pelo método hematoxilina-eosina (HE), para a elaboração das lâminas histológicas, sendo observado presença ou não de fibrose e inflamação.

**Cálculo do coeficiente de eficiência alimentar (CEA):** através dos dados obtidos dos registros semanais de peso e ingestão, para monitoramento da qualidade global das dietas e do desenvolvimento dos animais, calculou-se o coeficiente de eficiência alimentar para o período, por meio da fórmula,

$$CEA = \text{ganho de peso (g)} \times 100 / \text{consumo alimentar (g)}$$

**Análises Estatísticas:** Os dados obtidos referentes às variáveis peso, ingestão, CEA e parâmetros bioquímicos (glicose, uréia, ácido úrico, creatinina, sódio, potássio, cálcio e fósforo) foram analisados para verificação dos pressupostos paramétricos de normalidade e homocedasticidade, através dos testes de Shapiro-Wilk e de Levene. Como nenhuma das variáveis apresentou os pressupostos paramétricos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparação das distribuições e, quando apresentaram diferença significativa, utilizou-se o teste post hoc de Nemenyi. Como nível de significância, adotou-se até 5% de significância.

## RESULTADOS

### **Avaliação de peso, ingestão e CEA**

As médias de peso por grupo experimental, ao longo dos seis meses identificou diferença significativa entre os grupos, conforme mostra a tabela 1. Verifica-se que nos três meses finais do período experimental, os grupos suplementados com tiamina apresentaram menor peso que os demais grupos.

A avaliação das médias de ingestão alimentar dos grupos experimentais, no período, indicou ausência de diferença estatística entre os grupos C, T, TT1 e TT2. A comparação dos grupos quanto ao CEA, ao longo das 23 semanas, revela que não houve diferença estatística em relação ao parâmetro. A mesma análise relativa a cada grupo isoladamente, em relação ao tempo, no entanto, indica redução significativa da eficiência alimentar para todos os grupos, com exceção do que recebeu dieta termolizada.

**Tabela 1.** Parâmetros de qualidade das dietas e desenvolvimento dos animais experimentais submetidos às dietas Controle (comercial), Termolizada (controle autoclavada a 121,5°C/30 min), Termolizada + tiamina 1 (Termolizada + 6mg/kg de tiamina por dieta) e Termolizada + tiamina 2 (Termolizada + 120mg/kg de tiamina por dieta), por seis meses.

Variável	Grupos	Período Experimental					
		1	2	3	4	5	6
<b>Peso</b>	Labina	328,93 <sup>aA</sup>	349,86 <sup>aA</sup>	378,45 <sup>aB</sup>	390,05 <sup>aB</sup>	396,08 <sup>aB</sup>	395,81 <sup>aB</sup>
	Termolizada	323,31 <sup>aA</sup>	346,54 <sup>abAB</sup>	368,80 <sup>abBC</sup>	388,63 <sup>aC</sup>	395,46 <sup>aC</sup>	396,56 <sup>aC</sup>
	Termolizada + tiamina 1	313,3 <sup>6aA</sup>	337,87 <sup>abAB</sup>	352,02 <sup>bcB</sup>	358,48 <sup>bB</sup>	360,04 <sup>bB</sup>	362,62 <sup>bB</sup>
	Termolizada + tiamina 2	304,37 <sup>aA</sup>	321,96 <sup>bAB</sup>	334,21 <sup>cAB</sup>	343,12 <sup>bB</sup>	345,28 <sup>bB</sup>	346,91 <sup>bB</sup>
<b>CEA</b>	Labina	2,78 <sup>aA</sup>	2,72 <sup>aA</sup>	2,35 <sup>aA</sup>	2,31 <sup>aA</sup>	1,15 <sup>aAB</sup>	0,49 <sup>aB</sup>
	Termolizada	2,01 <sup>aA</sup>	2,56 <sup>aA</sup>	2,73 <sup>aA</sup>	2,37 <sup>aA</sup>	1,26 <sup>aA</sup>	1,12 <sup>aA</sup>
	Termolizada + tiamina 1	3,63 <sup>aA</sup>	2,01 <sup>aAB</sup>	1,78 <sup>aAB</sup>	2,04 <sup>aAB</sup>	1,31 <sup>aB</sup>	0,59 <sup>aB</sup>
	Termolizada + tiamina 2	2,38 <sup>aA</sup>	2,32 <sup>aA</sup>	2,03 <sup>aAB</sup>	2,20 <sup>aA</sup>	1,52 <sup>aAB</sup>	0,29 <sup>aB</sup>
<b>Ingestão</b>	Labina	169,97 <sup>aD</sup>	172,16 <sup>aE</sup>	156,85 <sup>aA</sup>	159,59 <sup>aC</sup>	157,37 <sup>aB</sup>	173,18 <sup>aF</sup>
	Termolizada	170,83 <sup>aE</sup>	169,54 <sup>aD</sup>	159,02 <sup>aB</sup>	161,71 <sup>aC</sup>	158,68 <sup>aA</sup>	183,17 <sup>aF</sup>
	Termolizada + tiamina 1	165,54 <sup>aE</sup>	145,19 <sup>aC</sup>	151,75 <sup>aD</sup>	143,52 <sup>aB</sup>	143,46 <sup>aA</sup>	169,14 <sup>aF</sup>
	Termolizada + tiamina 2	163,78 <sup>aE</sup>	148,14 <sup>aD</sup>	146,85 <sup>aC</sup>	140,72 <sup>aB</sup>	139,89 <sup>aA</sup>	167,86 <sup>aF</sup>
<b>Ganho de peso</b>	Labina	7.65 <sup>aA</sup>	7.68 <sup>aA</sup>	3.75 <sup>aA</sup>	3.27 <sup>aA</sup>	1.84 <sup>aA</sup>	-5.07 <sup>aA</sup>
	Termolizada	5.19 <sup>aA</sup>	1.86 <sup>aA</sup>	7.65 <sup>aA</sup>	4.28 <sup>aA</sup>	0.43 <sup>aA</sup>	1.55 <sup>aA</sup>
	Termolizada + tiamina 1	0.44 <sup>aA</sup>	7.65 <sup>aA</sup>	6.96 <sup>aA</sup>	-1.74 <sup>aA</sup>	-0.23 <sup>aA</sup>	1.03 <sup>aA</sup>
	Termolizada + tiamina 2	4.88 <sup>aA</sup>	4.43 <sup>aA</sup>	1.09 <sup>aA</sup>	2.67 <sup>aA</sup>	0.02 <sup>aA</sup>	0.33 <sup>aA</sup>

Os parâmetros estão representados como média. a,b,c, d indicam comparação entre grupos (colunas); A,B,C, D, E, F indicam comparação em relação ao tempo (linhas). Teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Nemenyi com  $p < 0,05$ . Letras iguais representam ausência de diferença estatística.

## Avaliação Bioquímica

Os dados relativos às análises bioquímicas séricas encontram-se na tabela 2. Observa-se que para a glicemia e os marcadores de função renal - uréia, ácido úrico, creatinina, sódio, potássio, cálcio e fósforo- não houve diferença estatística entre os grupos experimentais que receberam dietas submetidas a diferentes tratamentos, no que se refere ao processamento térmico e níveis dietéticos de tiamina, conforme demonstrado na Tabela 2.

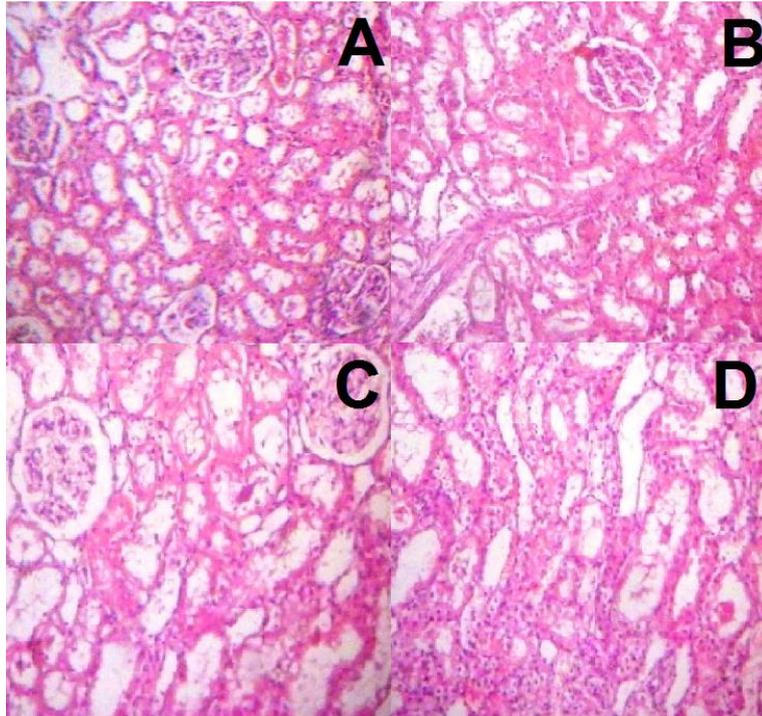
**Tabela 2** - Análises bioquímicas séricas de glicose e de marcadores de função renal de ratos submetidos à dieta termolizada, com diferentes níveis de tiamina, por 23 semanas.

Parâmetro Bioquímico	Grupos experimentais				Significância Estatística p
	C	T	TT1	TT2	
Glicose	190,71	202,14	175,2	171,33	0,840
Uréia	40,14	38,14	41,4	37,5	0,418
Ácido úrico	2,15	1,75	1,74	2,26	0,766
Creatinina	0,35	0,33	0,35	0,33	0,861
Sódio	144,86	143,14	144	144,17	0,922
Potássio	5,81	5,72	6,06	6,76	0,357
Cálcio	9,45	9,18	9,48	9,31	0,420
Fósforo	7,73	6,91	6,90	7,72	0,604

Os valores são apresentados como média, considerando-se cada um dos parâmetros bioquímicos analisados ( $P > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis). Grupo C (recebendo dieta comercial padrão;  $n=8$ ), Grupo T (recebendo dieta termolizada – dieta comercial aquecida a  $121,5^{\circ}\text{C}$ , 30 min;  $n=7$ ), Grupo TT1 (recebendo dieta termolizada, tiamina nível 1, acrescida de 6mg de tiamina/kg de dieta;  $n=7$ ); Grupo TT2 (recebendo dieta termolizada mais tiamina nível 2, acrescida de 120 mg de tiamina/kg de dieta;  $n=8$ ). Significância estatística para  $p < 0,05$

### Avaliação histológica renal

A análise renal histológica demonstrou que todos os fragmentos de rim colhidos apresentam um padrão morfológico normal, representado na figura 1. Verifica-se a ausência de alterações macroscópicas e microscópicas, tais como infiltrado inflamatório.



**Figura 1.** Secção longitudinal representativa de uma amostra do rim esquerdo dos grupos experimentais Controle (A), Termolizada (B), Termolizada + tiamina nível 1 (C) e Termolizada + tiamina nível 2 (D).

## DISCUSSÃO

Os AGEs presentes no organismo podem ser provenientes da ingestão dietética (sua principal fonte exógena), cuja estimativa de absorção está entre 10 e 80%, sendo que após uma única refeição rica em AGEs, é possível detectar o aumento de seus níveis séricos, contribuindo para o pool endógeno desses produtos (KOSCHINSKY et al., 1997; VLASSARA et al, 2002). Submeter a dieta ao calor seco é um fator crucial que implica em maior formação de AGEs e perda de substâncias termolábeis, como a vitamina antioxidante tiamina (SHANGARI et al., 2007).

Os rins são parte importante do sistema de depuração dos AGEs. Os níveis de AGEs plasmáticos são determinados em parte pela taxa de depuração de proteínas e função renal, sendo a depuração renal a forma predominante de excreção de AGEs, especialmente as frações de baixo peso molecular (adutos de

glicação livres). Adutos de AGEs e peptídeos são filtrados no glomérulo e uma pequena parte pode ser reabsorvida e degradada por células tubulares proximais (KANKOVA, 2008; GERRITS, SMIT & BILO, 2009). Considerando-se a exposição dos rins aos AGEs, especialmente por seu papel de depuração, é razoável esperar que os danos promovidos por essas substâncias, a exemplo daquelas veiculadas por alimentos processados termicamente, pudessem ser detectados nos rins de forma até mais expressiva do que em outros tecidos. De qualquer modo, são escassos os estudos investigando a repercussão de AGEs veiculados pela dieta na saúde do organismo, como um todo ou de tecidos alvo, em particular.

Analisando-se primeiramente os parâmetros de controle do desenvolvimento dos animais, durante o período experimental, verifica-se que foi detectada uma diferença estatística no que diz respeito ao peso, especialmente ao final do período, comparando-se os grupos suplementados com tiamina aos demais. Foi observada diferença estatística intragrupo em relação à ingestão dos animais no decorrer do período experimental, porém entre os grupos essa diferença não se manifestou, indicando que embora sejam roedores, a forma de administração em pó, necessária para a adição de tiamina posterior ao processamento térmico das dietas termolizadas não comprometeu a ingestão nem a manutenção do desenvolvimento dos animais representada pela ausência de diferença em relação ao ganho de peso ao longo do tempo e entre os grupos.

Por outro lado, que a suplementação de tiamina pode ter contribuído para a diferença de peso, ao final do experimento, embora esse efeito não possa ser confirmado através do presente protocolo. As diferenças determinadas pelo tempo, analisando os dados de peso para cada grupo, isoladamente, parecem ser um reflexo natural do processo de manutenção corporal. Possivelmente fatores

adicionais não controlados no presente protocolo podem ter contribuído para esse resultado.

No presente estudo, o perfil bioquímico e o padrão histológico observados nos diferentes grupos experimentais demonstraram que a manipulação de dietas submetidas a diferentes condições de processamento térmico e com diferentes concentrações de tiamina, nas condições do protocolo desenvolvido, de investigação do efeito potencialmente tóxico da dieta termolizada, não foi capaz de promover alterações renais, em ratos, após 23 semanas de consumo.

Considerando o protocolo utilizado por Shangari et al (2007) e reproduzido parcialmente no presente estudo (a dieta de base utilizada no presente protocolo, dieta comercial Purina da Labina, é distinta da utilizada pelos autores, AIN-93), uma dieta termolizada seria capaz de induzir a formação de AGEs e a perda de tiamina na dieta, sendo estes fatores os possíveis responsáveis pela manifestação de alterações histológicas detectadas em alguns tecidos, a exemplo de infiltração de macrófagos no cólon. Destacando-se os efeitos deletérios renais, como nefrolitíase, que tem sido associados ao emprego da AIN-93 (KLURFELD, 2002), utilizando-se diferentes protocolos, a mudança do tipo de dieta manipulada constitui-se um fator que poderia explicar a diferença dos resultados encontrados, de alguma maneira favoráveis ao emprego da dieta comercial. Uma vez que o consumo de AIN-93, por si só, tem implicado em alterações fisiopatológicas em vários tecidos, talvez seja difícil separá-las das alterações potencialmente produzidas por seu tratamento térmico. Por outro lado, ainda que, no presente caso, os animais tenham sido submetidos à dieta comercial termolizada por quase seis meses, independente da ingestão de níveis diferentes de tiamina, não se detectou, através dos parâmetros histológicos e bioquímicos analisados, qualquer repercussão de seu consumo

crônico sobre o tecido renal. Dessa forma, é possível que o modelo de Shangari et al (2007) tenha repercutido em alterações histológicas devido à utilização da dieta AIN-93, dentre outros fatores.

Ainda nesse cenário, a dieta utilizada no presente protocolo, ao contrário da AIN-93G, não possui formulação nutricional totalmente definida, mas é possível inferir que sua composição tenha contribuído para os resultados obtidos. A tabela recentemente publicada por Uribarri et al (2010), que disponibiliza o conteúdo de AGEs em alimentos, medidos como CML, e a presença de dicarbonilas altamente reativas na forma de metilglioxal, indicam que em relação a composição em macronutrientes, as principais fontes dietéticas de AGEs são alimentos ricos em lipídios. Embora não se possa estabelecer apropriadamente uma comparação entre os dois tipos de dieta experimental, seria interessante destacar que a AIN-93 envolve a utilização de óleo de soja, como fonte lipídica exclusiva, enquanto que a fórmula comercial inclui fontes lipídicas diversas. Adicionalmente, a utilização de ingredientes alimentares, na formulação da dieta comercial, em vez de componentes isolados, como na AIN-93, pode contribuir para uma maior proteção dos nutrientes contra os danos do tratamento térmico, bem como pode preservar a presença de substâncias antinutricionais e/ou com efeito quelante sobre metais oxidantes, de maior resistência ao tratamento térmico do que vitaminas, como a tiamina.

Torna-se conveniente ressaltar que Shangari et al (2007), a respeito dos efeitos fisiológicos do consumo da dieta termolizada, sugeriram a perda de tiamina, e mais especificamente de suas funções antioxidante e anti-glicante, mais do que a formação de AGEs, como causa das alterações histológicas detectadas no grupo tratado com esse modelo dietético. No presente caso, a repercussão da restauração dos níveis de referência de tiamina para roedores, com a dieta termolizada nível 1, e

da oferta de níveis suplementares, na forma da dieta termolizada nível 2, não pode ser testada, uma vez que a dieta termolizada, de composição mais comprometida, no que diz respeito ao teor da vitamina, não exibiu alterações fisiológicas.

Embora o protocolo utilizado no presente estudo se constitua um modelo experimental para promover a formação de AGEs, uma vez que o processo térmico seria a variável determinante na promoção desse resultado, conforme a literatura relata, a composição química da dieta utilizada pode não ter favorecido a formação dessas substâncias por ocasião do processamento térmico de modo a prevenir as alterações potenciais decorrentes do consumo de dieta submetida a temperaturas elevadas. Desafiante será, precisar, em uma proposta futura, que elementos concorreram para este efeito.

Os resultados aqui descritos, representam uma oportunidade adicional de enfatizar a importância de se estabelecer, mais precisamente, o impacto fisiológico das diferentes dietas experimentais, usadas indistintamente para satisfazer as necessidades de roedores, em protocolos de diversas naturezas, uma discussão ainda modesta. Mesmo a formulação AIN-93, formulação de referência em protocolos experimentais, tem promovido alterações inesperadas em se tratando de uma dieta controle.

Na análise da repercussão fisiológica de fontes exógenas de AGEs, ainda, é importante considerar a via de administração. Em outra investigação, em que se detectaram alterações, inclusive no tecido renal, AGEs foram injetados diretamente na circulação sanguínea (DAROUX et al., 2010), enquanto que o presente protocolo se propôs a investigar a repercussão dos AGEs dietéticos sobre a fisiologia renal, ou seja, considerando-se a barreira gastrointestinal na determinação de seu prejuízo.

Os rins são órgãos responsáveis pela depuração de muitas substâncias, incluindo AGEs, e um dos fatores responsáveis por sua alteração fisiológica é o envelhecimento. Em humanos, o rim senil apresenta diminuição do número de glomérulos e de túbulos. Frequentemente são encontrados atrofia tubular focal, fibrose intersticial e inflamação crônica, os quais podem eventualmente estar relacionados a áreas de esclerose glomerular. Essas alterações variam em intensidade, proporcionando graus variados de deterioração da função renal e acredita-se que um dos fatores de risco inclui a dieta, a qual pode acelerar este processo de deterioração. Fisiologicamente, há uma diminuição do fluxo plasmático renal e no ritmo de filtração glomerular (ABREU, SESSO & RAMOS, 1998). Apesar disso, na presente investigação, ainda que se tenha estudado animais que chegaram à idade de onze meses, o processo de envelhecimento não repercutiu em alterações nos parâmetros analisados.

## **CONCLUSÃO**

No presente estudo, o consumo crônico de dieta termolizada, ou seja, submetida a tratamento térmico de elevada intensidade, não induziu o aparecimento de alterações morfológicas renais, bem como não promoveu diferenças bioquímicas, em parâmetros de função renal, em ratos adultos. É razoável inferir que a composição química e elementos antiglicantes da dieta podem não ter contribuído para aumentar expressivamente a formação de AGEs e, portanto, pode ter protegido o tecido das alterações promovidas pelo tratamento térmico. São necessários estudos adicionais a fim de se precisar a repercussão dos AGEs dietéticos para a fisiologia renal e possíveis implicações na determinação de quadros patológicos associados ao órgão. Necessário se faz, também, investigar a influência da composição dos diferentes tipos de alimentos ou refeições na formação dos

produtos finais da glicação avançada, de modo a contribuir para as recomendações de uma alimentação saudável que concorram para a prevenção de doenças.

## REFERÊNCIAS

ABREU, P. F.; SESSO, R. C. CINTRA.; RAMOS, L. R. Aspectos renais no idoso. **J. Bras. Nefrol.** v. 2, p. 158-165, 1998.

AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs) : surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-Nhydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Ne-carboxymethyl-lysineand Ne-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochem. J.** v. 364, p. 1-14, 2002.

BENGMARK, S.; GIL A. Productos finales de la glicación y de la lipoxidación como amplificadores de la inflamación: papel de los alimentos. **Nutr Hosp.** v. 22, p. 625-640, 2007.

BIERHAUS, A. et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end Products. **J Mol Med.** v. 83, p. 876–886, 2005.

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

BUSCH, M. et al. The Advanced Glycation End Product N-Carboxymethyllysine Is Not a Predictor of Cardiovascular Events and Renal Outcomes in Patients With Type 2 Diabetic Kidney Disease and Hypertension. **American Journal of Kidney Diseases.** v. 48, p. 571-579, 2006.

CAI, W. et al. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. **Am J Pathol.** v. 173, p. 327-336, 2004.

CAI, W. et al. Reduced Oxidant Stress and Extended Lifespan in Mice Exposed to a Low Glycotxin Diet: Association with Increased AGER1 Expression. **American Journal of Pathology.** v. 170, p. 1893-1902, 2007.

DAROUX, M. et al. Advanced glycation end-products: Implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. **Diabetes & Metabolism.** v. 36, p. 1–10, 2010.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Advanced Glycation End Products that Detour —around the side: Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **Clin Biochem Rev.** v. 26, p. 123-134, 2005.

GERRITS, E. G.; SMIT, A. J.; BILO, H. J. G. AGEs, autofluorescence and renal function. **Nephrol Dial Transplant.** v. 24, p. 710–713, 2009.

GOLDBERG, T. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci.** v. 99, p. 15596-601, 2002.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. **Diabetes Care.** v. 29, p. 1420-1432, 2006.

HYOGO, H. et al. Elevated levels of serum advanced glycation end products in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 22, p. 1112–1119, 2007.

JAKUŠ, V.; RIETBROCK, N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. **Physiol. Res**. v. 53, P. 131-142, 2004.

KANKOVA, K. Diabetic threesome (hyperglycaemia, renal function and nutrition) and advanced glycation end products: evidence for the multiple-hit agent? **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 67, p. 60–74, 2008.

KLURFELD, D. M. **Kidney and Bladder Stones in Rodents Fed Purified Diets. American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.** v. 132, p. 3784, 2002.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glicotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6476-6479, 1997.

McCARTY M. F. The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics – though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. **Medical Hypotheses**. V. 64, P.394–398, 2005.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. **Arch Biochem Biophys**. v. 419, p. 1-15, 2003.

NEADE, T.; URIBARRI, J. Diet, Inflammation, and Chronic Kidney Disease: Getting to the Heart of the Matter. **Seminars in Dialysis**. v. 21, p. 331-337, 2008.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin Diabetes**. v. 21, p. 186-7, 2003.

RAHBAR, S.; FIGAROLA, J. L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 419, p. 63-79, 2003.

RAJ, D. S. C. et al. Advanced Glycation End Products: A Nephrologist's Perspective. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 35, p. 365-380, 2000.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76Adiet. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 838-841, 1997.

SATO, T. et al. Effects of high-AGE beverage on RAGE and VEGF expressions in the liver and kidneys. **Eur J Nutr**. v. 48, p. 6–11. 2009.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCI, L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 65, p. 963-975, 2010.

SHANGARI, N. et al. A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma  $\alpha$ -aldehydes and colonic inflammation in the rat. **Chemico-Biological Interactions**. v. 169, p.100–10, 2007.

STIRBAN, A. et al. Benfotiamine prevents macro and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 29, p. 2064-71, 2006.

THORNALLEY, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. **Drug Metabol Drug Interact**. v. 23, p. 125-150, 2008.

URIBARRI, J. et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical guide to Their Reduction in the diet. **J Am Diet Assoc**, v. 110, p. 911-916, 2010.

URIBARRI, J. et al. Diet-derived Advanced Glycation End Products are Major Contributors to the Body's AGE Pool and Induce Inflammation in Health Subjects. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1043, p. 461-6, 2005.

VLASSARA, H. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 15596-601, 2002.

**3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A ingestão dietética constitui a principal fonte exógena de AGEs ou glicotoxinas dietéticas. Em condições fisiológicas normais, o organismo dispõe de estratégias para detoxificar essas moléculas e evitar, portanto, seu acúmulo excessivo. Entre os órgãos que desempenham um importante papel no processo de detoxificação dos AGEs no organismo estão os rins, que em condições normais, são os principais responsáveis pela excreção de AGEs, sobretudo as frações de baixo peso molecular conhecidas como adutos de glicação livres. Em condições de ingestão excessiva de AGEs, associada a insuficiente ingestão de antioxidantes/antiglicantes, e insuficiência renal, de quaisquer magnitudes, pode saturar a função de detoxificação de AGEs exercida pelos rins, ocasionando um aumento de seu *pool*, contribuindo para que esse processo se perpetue em um ciclo vicioso (HUEBSCHMANN et al., 2006; URIBARRI et al., 2010).

Nesse cenário, sugere-se que a associação entre uma reduzida formação de AGEs dietéticos através de métodos de cocção mais brandos e a suplementação de antioxidantes/antiglicantes a exemplo da tiamina protegem potencialmente tecidos biológicos a exemplo do intestino, conforme estabelecido no protocolo de Shangari et al (2007). Apesar disso, as evidências são ainda inconclusivas a esse respeito. A repercussão fisiológica da ingestão de AGEs dietéticos carece de maiores esclarecimentos acerca dos mecanismos de absorção e rotas metabólicas que esse grupo heterogêneo de moléculas é capaz de seguir. Novas informações possibilitarão traçar estratégias dietéticas terapêuticas em diferentes condições patológicas e avaliar a extensão dos benefícios que estas intervenções são capazes de promover.

Diante dos resultados da presente investigação é possível especular que o perfil nutricional de uma dieta – incluindo macronutrientes, micronutrientes e outros

componentes bioativos - é capaz de modular a formação e conseqüentemente a exposição orgânica aos AGEs, interferindo assim na magnitude de seus prejuízos. Elementos adicionais através da dosagem de CML pelo método de ELISA poderão identificar a presença de AGEs no plasma e uma possível correlação com o tratamento térmico ao qual a dieta foi submetida.

Atualmente, um dos desafios nas pesquisas sobre AGEs, é encontrar um método reprodutível e que identifique precisamente a quantidade total de AGEs em amostras biológicas, considerando-se que se trata de um grupo de biomoléculas extremamente heterogêneo. As perspectivas futuras incluem a necessidade de investigações adicionais, sobretudo na área de AGEs dietéticos, a fim de esclarecer os níveis de ingestão toleráveis pelos sistemas de detoxificação de que o organismo dispõe, a real taxa de absorção dessas substâncias e quais os interferentes desse processo. Outro alvo promissor de investigações na área de Nutrição inclui os antiglicantes, substâncias que podem estar naturalmente presentes em alimentos e podem fornecer uma proteção adicional contra a formação e prejuízos dos AGEs nos sistemas biológicos. Sendo assim, novas investigações possibilitarão estabelecer diretrizes terapêuticas que incluam a restrição dietética de AGEs como ferramenta para melhorar a qualidade de vida de portadores de doenças crônicas que sofrem a influência dos AGEs – conforme citado na literatura - como a insuficiência renal crônica.



ABREU, P. F.; SESSO, R. C. CINTRA.; RAMOS, L. R. Aspectos renais no idoso. **J. Bras. Nefrol.** v. 2, p. 158-165, 1998.

AHMED, N. et al. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-Nhydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nε-carboxymethyl-lysine and Nε-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. **Biochem. J.** v. 364, p. 1-14, 2002.

BEISSWENGER, P. J. et al. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. **Diabetes.** v. 7, p. 824-9, 1995.

BENGMARK, S.; GIL A. Productos finales de la glicación y de la lipoxidación como amplificadores de la inflamación: papel de los alimentos. **Nutr Hosp.** v. 22, p. 625-640, 2007.

BERG, T. J. et al. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism.** v. 6, p. 661-5, 1997.

BIERHAUS, A. et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end Products. **J Mol Med.** v. 83, p. 876–886, 2005.

BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. **Diabetologia.** v. 52, p. 2251–2263, 2009.

BOHLENDER, J. M. et al. Advanced glycation end products and the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 289, p. 645-659, 2005.

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

BUSCH, M. et al. The Advanced Glycation End Product N<sub>ε</sub>-Carboxymethyllysine Is Not a Predictor of Cardiovascular Events and Renal Outcomes in Patients With Type 2 Diabetic Kidney Disease and Hypertension. **American Journal of Kidney Diseases.** v. 48, p. 571-579, 2006.

CAI, W. et al. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. **Am J Pathol.** v. 173, p. 327-336, 2004.

CAI, W. et al. Reduced Oxidant Stress and Extended Lifespan in Mice Exposed to a Low Glycotxin Diet: Association with Increased AGER1 Expression. **American Journal of Pathology.** v. 170, p. 1893-1902, 2007.

CHUNG, S. H. et al. Identifying and managing malnutrition stemming from different causes. **Peritoneal Dialysis International.** v. 27, p. 239-244, 2007.

COCHRANE, S. M.; ROBINSON, G. B. *In vitro* glycation of glomerular basement membrane alters its permeability: a possible mechanism in diabetic complications. **FEBS Letters**. v. 375, p. 41-44, 1995.

COHEN, M. P. et al. Prevention of diabetic nephropathy in *db/db* mice with glycated albumin antagonists: a novel strategy. **J Clin Invest**. v. 95, p. 2338–2345, 1995.

COHEN, M. P. et al. Inhibiting albumin glycation ameliorates diabetic nephropathy in the *db/db* mouse. **Exp Nephrol**. v. 8, p. 135–143, 2000.

DAROUX, M. et al. Advanced glycation end-products: Implications for diabetic and non-diabetic nephropathies. **Diabetes & Metabolism**. v. 36, p. 1–10, 2010.

FORBES, J. M.; SOLDATOS, G.; THOMAS, M. C. Advanced Glycation End Products that Detour “around the side: Is HbA1c not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? **Clin Biochem Rev**. v. 26, p. 123-134, 2005.

GERRITS, E. G.; SMIT, A. J.; BILO, H. J. G. AGEs, autofluorescence and renal function. **Nephrol Dial Transplant**. v. 24, p. 710–713, 2009.

GOLDBERG, T. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci**. v. 99, p. 15596-601, 2002.

GROSS, S. et al. Low levels of sRAGE are associated with increased risk for mortality in renal transplant recipients. **Transplantation**. v. 5, p. 659–63, 2007.

GUGLIUCCI, A., BENDAYAN, M. Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats. An ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. **J Histochem Cytochem**. v. 43, p. 591–600, 1995.

HUANG, J. S. et al. Effect of nitric oxidecGMP-dependent protein kinase activation on advanced glycation endproduct-induced proliferation in renal fibroblasts. **J. Am. Soc. Nephrol**. v. 16, p. 2318–2329, 2005.

HUANG, J. S. et al. Effects of Nitric Oxide and Antioxidants on Advanced Glycation End Products-Induced Hypertrophic Growth in Human Renal Tubular Cells. **Toxicological Sciences**. v. 1, p. 109–119, 2009.

HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. **Diabetes Care**. v. 29, p. 1420-1432, 2006.

HYOGO, H. et al. Elevated levels of serum advanced glycation end products in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 22, p. 1112–1119, 2007.

IKEDA, K. et al. N-(Carboxymethyl)lysine Protein Adduct Is a Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction. **Biochemistry**. v. 35, p. 8075-8083, 1996.

IMAI, N. et al. Histological Localization of Advanced Glycosylation End Products in the Progression of Diabetic Nephropathy. **Nephron**. v. 76, p. 153-160, 1997.

JAKUŠ, V.; RIETBROCK, N. Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. **Physiol. Res**. v. 53, p. 131-142, 2004.

KALOUSOVA, M. et al. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases—clinical chemistry and genetic background. **Mutation Research**. v. 579, p. 37–46, 2005.

KALOUSOVÁ, M. et al. RAGE polymorphisms, renal function and histological finding at 12 months after renal transplantation. **Clinical Biochemistry**. v. 42, p. 347–352, 2009.

KALOUSOVÁ, M. et al. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients With Decreased Renal Function. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 47, p. 406-411, 2006.

KANKOVA, K. Diabetic threesome (hyperglycaemia, renal function and nutrition) and advanced glycation end products: evidence for the multiple-hit agent? **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 67, p. 60–74, 2008.

KLURFELD, D. M. **Kidney and Bladder Stones in Rodents Fed Purified Diets**. **American Society for Nutritional Sciences. J. Nutr.** v. 132, p. 3784, 2002.

KOSCHINSKY, T. et al. Orally absorbed reactive glycation products (glicotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 12, p. 6476-6479, 1997.

LESLIE, R. D. G. et al. Level of an Advanced Glycated End Product Is Genetically Determined A Study of Normal Twins. **Diabetes**. v. 52, p. 2441-2444, 2003.

LI, Y. M. et al. Prevention of cardiovascular and renal pathology of aging by the advanced glycation inhibitor aminoguanidine. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 93, p. 3902-7, 1996.

LINDEN, E. et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. **Clin J Am Soc Nephrol**. v. 3, p. 691-8, 2008.

McCARTY M. F. The low-AGE content of low-fat vegan diets could benefit diabetics – though concurrent taurine supplementation may be needed to minimize endogenous AGE production. **Medical Hypotheses**. v. 64, p.394–398, 2005.

MONNIER, V. M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch Biochem Biophys.** v. 419, p. 1-15, 2003

MORALES, F. J.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. A Study on Advanced Maillard Reaction in Heated Casein/Sugar Solutions: Fluorescence Accumulation. **Int. Dairy Journal.** v. 7, p. 675-683, 1997.

NEADE, T.; URIBARRI, J. Diet, Inflammation, and Chronic Kidney Disease: Getting to the Heart of the Matter. **Seminars in Dialysis.** v. 21, p. 331-337, 2008.

NEEPER, M. et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem.** v. 267, p.14998–15004, 1992.

NUNES, C. S.; BAPTISTA, A. O. Implicações da reacção de Maillard nos alimentos e nos sistemas biológicos Implications of the Maillard reaction in food and in biological systems. **RPCV.** v. 96, p. 53-59, 2001.

OBBERG, B. P. et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney Int.** v. 65, p. 1009-16, 2004.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin Diabetes.** v. 21, p. 186-7, 2003.

RAHBAR, S.; FIGAROLA, J. L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 419, p. 63-79, 2003.

RAJ, D. S. C. et al. Advanced Glycation End Products: A Nephrologist's Perspective. **American Journal of Kidney Diseases.** v. 35, p. 365-380, 2000.

REDDY, V. P.; BEYAZ, A. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. **Drug Discovery Today.** v. 11, p. 646-54, 2006.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76Adiet. **The Journal of Nutrition,** v. 127, n. 5, p. 838-841, 1997.

ROUBIN, S. R. et al. Productos de glicación avanzada: nuevo marcador de disfunción renal en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. **Medicina clínica,** v. 136, p. 513-521, 2011.

SATO, T. et al. Effects of high-AGE beverage on RAGE and VEGF expressions in the liver and kidneys. **Eur J Nutr.** v. 48, p. 6–11. 2009.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does Accumulation of Advanced Glycation End Products Contribute to the Aging Phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.** v. 65, p. 963-975, 2010.

SHANGARI, N. et al. A thermolyzed diet increases oxidative stress, plasma  $\alpha$ -aldehydes and colonic inflammation in the rat. **Chemico-Biological Interactions**. v. 169, p.100–110, 2007.

SOULIS, T. et al. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. **Diabetologia**. v. 40, p. 619–628, 1997.

STIRBAN, A. et al. Benfotiamine prevents macro and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v. 29, p. 2064-71, 2006.

SUZUKI, D. et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesion. **J Am Soc Nephrol**. v. 10, p. 822–832, 1999.

TANJI, N. et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. **J Am Soc Nephrol**. v. 11, p. 1656–1666, 2000.

THORNALLEY, P. J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. **Drug Metabol Drug Interact**. v. 23, p. 125-150, 2008.

URIBARRI, J. et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical guide to Their Reduction in the diet. **J Am Diet Assoc**, v. 110, p. 911-916, 2010.

URIBARRI, J. et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. v. 62, p. 427-33, 2007.

URIBARRI, J. et al. Diet-derived Advanced Glycation End Products are Major Contributors to the Body's AGE Pool and Induce Inflammation in Health Subjects. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1043, p. 461-6, 2005.

URIBARRI, J. et al. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. **J Am Soc Nephrol**. v. 14, p. 728-31, 2003.

VERBEKE, P. et al. Effect of glycation of albumin on its binding to renal brush-border membrane vesicles: influence of aging in rats. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**. v. 1282, p. 93-100, 1996.

VLASSARA, H. et al. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 11704–11708, 1994.

VLASSARA, H. et al. Identifying Advanced Glycation End Products as a Major Source of Oxidants in Aging: Implications for the Management and/or Prevention of Reduced Renal Function in Elderly Persons. **Seminars in Nephrology**, v. 29, p. 594-603, 2009.

VLASSARA, H. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc Natl Acad Sci.** v. 99, p. 15596-601, 2002.

VLASSARA, H. et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low AGE intake; role of a new antiinflammatory AGE-receptor-1. **Endocrinology.** 2009. In press.

VLASSARA, H. Protein glycation in the kidney: role in diabetes and aging. **Kidney Int.** v. 49, p. 1795-804, 1996.

WENDT, T. et al. Glucose, glycation and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol.** v. 14, p. 1383–1395, 2003.

WILCOX, C. S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: A critical link to hypertension? **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 289, p. 913–935, 2005.

YUAN, Y. et al. Advanced glycation end products (AGEs) increase human mesangial foam cell formation by increasing Golgi SCAP glycosylation in vitro. **Am J Physiol Renal Physiol.** v. 1, p. 236-43, 2011.

ZHENG, F. et al. Glomerular aging in females is a multi-stage reversible process mediated by phenotypic changes in progenitors. **Am J Pathol.** v. 162, p. 355-63, 2005.

ZHENG, F. et al. The glomerulosclerosis of aging in females: contribution of the proinflammatory mesangial cell phenotype to macrophage infiltration. **Am J Pathol.** v. 165, p. 1339-48, 2004.

