

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS  
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA - ESEF

**REGULAÇÃO DE RECEPTORES PARA PRODUTOS FINAIS DE  
GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) POR VITAMINA A**

Laura Milán Vasques

Porto Alegre  
2011

LAURA MILÁN VASQUES

**REGULAÇÃO DE RECEPTORES PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO  
AVANÇADA (RAGE) POR VITAMINA A**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Escola de Educação Física  
da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para a obtenção  
do título de graduado em Licenciatura –  
Educação Física.

Orientador: Daniel Pens Gelain

Porto Alegre

2011

LAURA MILÁN VASQUES

**REGULAÇÃO DE RECEPTORES PARA PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO  
AVANÇADA (RAGE) POR VITAMINA A**

Conceito final:

Aprovado em ..... de ..... de .....

BANCA EXAMINADORA

---

---

Orientador – Prof. Dr. Daniel Pens Gelain - UFRGS

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por todo o conhecimento e experiências cedidas.

Ao Departamento de Bioquímica da UFRGS, em especial ao Laboratório 32 – Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, por fornecer-me condições para que eu pudesse realizar meu trabalho.

Às agências financiadoras brasileiras e riograndenses de fomento à pesquisa – CAPES, CNPq, PROPESQ/UFRGS, FAPERGS E BIC.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade e por tornarem o ambiente de trabalho muito mais divertido.

Aos meus pais e irmãos, Alexandre e Ana Paula, pelo aconchego, carinho, paciência, educação e contribuição financeira.

Às minhas irmãs gêmeas, Andrea e Renata, pelo companheirismo, amor, fidelidade e segurança.

Aos meus sobrinhos, Leonardo, Mariana, João Vítor e Luíza, por fazerem a minha vida muito mais divertida e feliz.

Às amigas Débora Franco, Juliana Mastella e Lia Szuster, pelo contato diário, sinceridade, carinho, festas e gargalhadas.

Ao professor José Cláudio Fonseca Moreira pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa do Laboratório 32 e pelos ensinamentos.

Ao meu orientador Daniel Pens Gelain pela imensa dedicação, paciência e amizade, além da presença constante e conhecimentos compartilhados.

## RESUMO

O RAGE (receptor para produtos finais de glicação avançada) é expresso em baixos níveis em vários tipos celulares em homeostase. Já em situações de estresse, a expressão do RAGE é aumentada, desencadeando diversos danos celulares. Tem-se que o exercício físico aumenta a atividade celular via estresse oxidativo, e muitos atletas são recomendados a utilizar vitaminas como uma alternativa antioxidante. O objetivo desse estudo foi investigar a expressão de RAGE em células SH-SY5Y quando submetidas a tratamento com vitamina A. Para isso, as células foram cultivadas em meio DMEM/F12 e SFB 10%. Os tratamentos foram iniciados através da adição de AR (ácido retinóico) ou retinol na presença ou ausência de antioxidantes (Trolox e N-acetilcisteína). Após 24h., a expressão de RAGE e a produção de espécies reativas foram quantificadas. O imunoconteúdo de RAGE foi aumentado por ambos os compostos. No entanto, somente o efeito do retinol é dependente da indução de estresse oxidativo, sendo a indução de RAGE revertida por antioxidantes. Confirmando essa observação, foi constatado que somente o retinol aumenta a produção de espécies reativas, efeito não observado com o AR. Concluímos que a vitamina A, tanto na forma de retinol como na forma de AR aumenta a expressão de RAGE, apesar de diferentes formas de vitamina A atuarem por mecanismos distintos. Estes resultados sugerem que a suplementação vitamínica como forma antioxidante pode não ser segura, e ao invés de combater a produção de espécies reativas, pode colaborar para o estresse celular.

**PALAVRAS CHAVES:** RAGE, vitamina A, Estresse Oxidativo, Exercício.

## **ABSTRACT**

The RAGE (receptor for advanced glycation end products) is expressed at low levels in several cell types in homeostasis. Under stress, the expression of RAGE is increased, triggering severe cellular damage. It has been related that physical exercise increases cellular activity via oxidative stress, and many athletes are recommended to use antioxidant vitamins. The objective of this study was to investigate the expression of RAGE in SH-SY5Y cells when subjected to treatment with vitamin A. Cells were grown in DMEM/F12 medium and 10% FBS. The treatments were initiated by addition of RA (retinoic acid) or retinol in the presence or absence of antioxidants (Trolox and N-acetylcysteine). After 24 hours, the expression of RAGE and production of ROS were quantified. The immunoccontent of RAGE was increased by both compounds. However, only the effect of retinol is dependent on the induction of oxidative stress, as the induction of RAGE is reversed by antioxidants. Confirming this observation, we found that only the retinol increased the production of reactive species, an effect not seen with RA. We conclude that vitamin A, both as retinol or RA, increase the expression of RAGE, although they act by distinct mechanisms. These results suggest that antioxidant vitamin supplementation may not be safe as it may increase RAGE, which may contribute to cellular stress.

**KEY WORDS:** RAGE, vitamin A, Oxidative Stress, Exercise.

## LISTA DE ABREVIATURAS

RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
AR	Ácido Retinóico
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
DCFH-DA	Diclorohidrofluoresceína diacetato
ER	Espécies Reativas
NAC	N-acetilcisteína
SOD	Superóxido dismutase
Gpx	Glutathione Peroxidase
CAT	Catalase
AGE	Produtos Finais de Glicação Avançada
TNF alfa	Fator de Necrose Tumoral
HMGB-1	Proteína High-Mobility Group Box-1
RL	Radical Livre
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
TTBS	Solução salina tamponada de Tris e Tween-20
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 Vitamina A.....	12
3.2 Exercício Físico.....	13
3.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	14
3.4 Radical Livre (RL).....	15
3.5 Estresse Oxidativo (EO).....	16
3.6 Mecanismos Antioxidantes.....	16
3.7 Receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE).....	17
4 PROBLEMA.....	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Reagentes e Produtos Químicos.....	21
5.2 Cultura de células.....	21
5.3 Quantificação de RAGE por immunoblot.....	22
5.4 Ensaio de produção de ER por DCFH-DA.....	22
5.6 Análise estatística.....	23
6 RESULTADOS.....	24
7 DISCUSSÃO.....	27
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31



## 1 INTRODUÇÃO

É cada vez maior a preocupação da sociedade com a saúde da população. Ultimamente, vem sendo enfatizada a importância da prática do exercício físico e da alimentação equilibrada para a qualidade de vida das pessoas. Porém, essas recomendações são dadas de maneira generalizada, e acabamos sem saber, por exemplo, qual a intensidade correta da prática do exercício físico, e quando devemos incluir suplementos alimentares na nossa dieta, a fim de ter uma vida mais saudável.

Sabe-se que o exercício físico regular e de moderada intensidade estimula a expressão gênica de algumas enzimas antioxidantes, minimizando a ação deletéria das espécies reativas de oxigênio (ERO) por ampliar as defesas antioxidantes (Hollander J, et al., 1999). Porém, estudos mostram que exercícios de alta intensidade e/ou longa duração, podem elevar a produção de EROs oprimindo a defesa antioxidante (Bowles et al., 1991), incorrendo, assim, o estresse oxidativo, onde prevalece a formação dos oxidantes aos antioxidantes (Gandra et al.; 2004; Schneider; Oliveira, 2004). É estimado que para cada vinte e cinco moléculas de oxigênio reduzidas pela respiração normal, um radical livre é produzido. Durante o exercício essa taxa de consumo pode aumentar de dez a quinze vezes em todo o corpo e cerca de cem vezes no músculo em atividade (Banerjee et al.; 2003).

Vitaminas, como os carotenóides (precursores da vitamina A), são compostos orgânicos disponíveis em grandes quantidades nos alimentos vegetais, especialmente nas frutas (Lopaczynsky; Zeisel, 2001), e são caracterizados como substâncias reativas e facilmente oxidáveis. Em quantidades fisiológicas podem funcionar como parte de defesa antioxidante não enzimática do organismo humano (Silva; Naves, 2001). Em atletas, o consumo dietético de carotenóides está relacionado ao importante papel na manutenção das concentrações plasmáticas dos antioxidantes, e na proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico (Groussard et al., 2003).

Em doenças como a diabetes ou alguns tipos de câncer, sabe-se que as ERO e o estresse oxidativo desempenham um papel central na progressão de sintomas e agravamento do quadro patológico (Gebhart et al., 2008). Tal relação levou ao aumento da recomendação do uso de suplementos antioxidantes para pacientes de diabetes e de câncer, ou para indivíduos saudáveis como forma de prevenção (Groussard et al., 2003).

Por outro lado, sabe-se também que o exercício físico auxilia na melhora do quadro clínico de indivíduos portadores de diabetes dos tipo I e II, por aumentar a captação da glicose em excesso na circulação (Damiano, 2007), e diferentes tipos de atividade física são recomendadas para auxiliar na prevenção da ocorrência de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular.

Entretanto, como foi exposto acima, diferentes níveis de exercício físico podem levar ao estresse oxidativo, principalmente na ausência de um acompanhamento adequado. Combinado com o uso não-controlado de suplementos de ação redox-ativa e com a ocorrência de modificações fisiológicas características a certas patologias, o estresse do exercício físico pode até contribuir para a intensificação do dano oxidativo e a deterioração do estado de saúde do indivíduo.

Uma via na qual o exercício físico induz ao estresse é através da ativação da citocina TNF alfa (fator de necrose tumoral) que, por sua vez, induz a produção de ERO, intensificando a inflamação e dano tecidual diversas condições fisiopatológicas. Os receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE) desempenham papel chave na expressão de sinalização de TNF alfa através do aumento da produção de TNF alfa circulante (Zhang et al., 2009). Sabe-se que a expressão de RAGE em todos os tecidos, exceto pulmão, está aumentada de forma significativa nas diabetes tipo I e tipo II, e que muitas das complicações clínicas observadas nessa doença estão relacionadas à ativação de RAGE (Hofmann et al., 1999). Apesar da ingestão de antioxidantes como a vitamina A e o exercício físico serem recomendados e prescritos para pacientes de diabetes, não se sabe qual o efeito da vitamina A sobre a expressão de RAGE.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo geral investigar se há relação entre RAGE e vitamina A, a fim de ter maior segurança a respeito sobre o uso de suplementos vitamínicos como antioxidantes.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar a expressão de RAGE em células tratadas com vitamina A (ácido retinóico e retinol) na presença ou não de antioxidantes (NAC e trolox).
- Investigar a produção de espécies reativas (radicais livres) em células tratadas com vitamina A (ácido retinóico e retinol), em tempo real de oxidação.

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Vitamina A**

A vitamina A possui função importante no ciclo visual, crescimento, manutenção da diferenciação epitelial, reprodução e desenvolvimento fetal. Porém, a ingestão excessiva de vitamina A pode resultar em má formação dos tecidos (Sapin et al, 2000).

Animais obtêm a vitamina A da dieta, sob a forma de pró-vitamina A, ou como vitamina A pré-formada. Exemplos de pró-vitamina A são os compostos carotenóides, que são encontrados em diversos vegetais. Por outro lado, a principal forma de vitamina A pré-formada encontrada na dieta é o retinol esterificado à ácidos graxos de cadeia longa, obtidos através de alimentos de origem animal (Olson, 2001).

Os ésteres de retinil ingeridos são hidrolizados a retinol por hidrolases entéricas. O retinol e os carotenóides são absorvidos por células da mucosa intestinal. A partir dos carotenóides, pode-se obter retinóides por dois meios: primeiro, o retinal pode ser sintetizado por clivagem oxidativa da ligação dupla central do carotenóide, seguido pela redução a retinol por uma retinal redutase microsomal. Segundo, apo-carotenóides são formados através de clivagens excêntricas seguidas por transformação dos ácidos apo-carotenóides em ácidos retinóicos. Após retinal ser reduzido a retinol, este é re-esterificado, nas células da borda em escova do intestino, e embalado em partículas de quilomícrons. Os quilomícrons são, então, parcialmente degradados através da ação de lípases, em tecidos extra-hepáticos, gerando remanescentes de quilomícrons, que contêm praticamente, todo o complemento original de ésteres de retinil. Os ésteres são captados a partir daqueles remanescentes por células hepáticas e, enzimaticamente, clivados, em endossomos, fornecendo vitamina A livre. A vitamina A formada pode ser, novamente, esterificada, no retículo endoplasmático, e

transferida às células estreladas hepáticas para estoque ou, inclusive, pode ser excretada da célula.

Sabe-se que a vitamina A atua no metabolismo intermediário, na síntese de ácido ribonucleico (RNA) e proteínas, enzimas, globulinas, glicoproteínas, queratina, permeabilidade celular e no metabolismo da hemoglobina (Iom, 2001). Ultimamente, a vitamina A ganhou destaque na sua ação antioxidante (Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003). Os carotenóides, antes vistos somente como compostos com atividade pró-vitamínica (Nagel et al, 1997), hoje são vistos como importantes antioxidantes plasmáticos (Baydas et al, 2002; Stahl & Sies, 2003; Ramalho et al, 2003). Os carotenóides são seqüestradores de EROs (Baydas et al, 2002; Stahl & Sies, 2003; Ramalho et al, 2003), interrompendo a geração de espécies reativas ainda nas etapas iniciais de sua formação (Nagel et al, 1997). Tal efeito também é atribuído ao próprio retinol, do qual alguns carotenóides são precursores (Baydas et al, 2002; Ramalho et al, 2003). Apesar dos benefícios atribuídos aos carotenóides, a indicação de suplementação é controversa. Em algumas situações a suplementação pode ser prejudicial. Em circunstância onde se observa altas concentrações de oxigênio ou alteração do estado redox intracelular, o  $\beta$ -caroteno apresenta propriedades pró-oxidantes (Palozza et al, 2003; Lowe et al, 2003). Os produtos de oxidação do  $\beta$ -caroteno podem alterar a sinalização dos retinóides e o status de fatores de transcrição nuclear (Lowe et al, 2003).

Estudo realizado em indivíduos tabagistas e expostos a amianto mostrou que, quando estes foram suplementados com vitamina A ( $\beta$ -caroteno e retinol), o risco de desenvolver câncer de pulmão e doenças cardiovasculares aumentou significativamente. Os participantes, que foram aleatoriamente escolhidos para receber a intervenção, tiveram um aumento de 28% na incidência dessas doenças, comparados àquelas que receberam placebo (Omenn et al., 1996)

### **3.2 Exercício Físico**

O papel da atividade física está bem estabelecido na prevenção e controle de

diversas doenças, como diabetes, hipertensão e obesidade (Albright et al., 2000). Por outro lado, sabe-se que a atividade física de alta intensidade é reconhecida como uma forma de estresse (Ji, 1995; Jenkins, 1993).

O termo exercício prolongado é em geral utilizado para definir intensidades de exercícios que podem ser sustentados por períodos de 30 a 180 minutos. Na prática, são intensidades com consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  max) entre 60 a 85% (Maughan et al., 2000). Estudos tem indicado a possibilidade do exercício de alta intensidade e/ou longa duração, causarem estresse oxidativo ao organismo, por uma maior produção das EROs, devido a fatores como um elevado consumo de oxigênio aumentando o processo de fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, a produção de superóxido mitocondrial, via reações do oxigênio como os radicais flavina e ubisemiquinona (Cooper, 2002); aumento dos níveis de catecolaminas (Urso; clarkson, 2003); produção de ácido láctico (Demopoulos et al., 1986); elevada taxa de auto oxidação da hemoglobina (Cooper, 2002); e processo oxidativo das células inflamatórias recrutadas durante um evento de lesão tecidual (Sacheck; Blumberg, 2001; Evans, 2002; Urso; Clarkson, 2003) desta maneira, o equilíbrio entre a produção das espécies reativas, a produção de antioxidantes e o reparo, são afetados (Marshall et al., 2002; Svensson et al., 2002; Groussard et al., 2003), incorrendo em lesão potencial da membrana celular, e das organelas do músculo, fígado, coração e cérebro (Witt et al., 1992; Nakao et al., 2000; Metin et al., 2002).

### **3.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)**

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é parte do processo metabólico normal de todos os seres vivos aeróbios, e como benefícios fisiológicos, participam da síntese de componentes biologicamente essenciais para a regulação das funções celulares (Elsayed, 2001; Lachance; Nakat; Jeong, 2001; Marlin et al., 2002). As EROs são definidas como sendo uma espécie química independente que contém um ou mais elétrons não pareados em sua última órbita (Hill; Burk; Lane, 1987; Little; Gladen, 1999; Mehta; Li; Mehta, 1999; Lachance; Nakat; Jeong, 2001; Marlin et al.; 2002). A presença de um elétron não pareado tende a produzir uma

grande reatividade, levando a interação com numerosas moléculas do organismo e podendo, conseqüentemente, promover inúmeros danos aos sistemas biológicos e praticamente a todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. (Witt et al.; 1992; Marlin et al.; 2002) .

### 3.4 Radical Livre (RL)

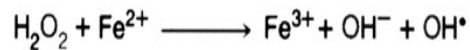
Um radical, por definição, é uma molécula que possui um elétron desemparelhado isolado em uma orbital. É aquele que pode existir de modo independente. Os radicais são altamente reativos e iniciam reações em cadeia por extrair um elétron de uma molécula das proximidades para completar seus próprios orbitais. O radical hidroxil ( $\text{OH}^\cdot$ ) provavelmente é o mais potente entre as ERO: ele inicia reações em cadeia que formam peróxidos lipídicos e radicais orgânicos. O ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ) também é bastante reativo, mas possui solubilidade limitada em lipídeos e não pode se difundir muito longe. Entretanto, ele pode gerar os radicais hidroxil e hidropoxi mais reativos por reagir não enzimaticamente com o peróxido de hidrogênio na reação de Haber-Weiss.

O peróxido de hidrogênio, embora não seja realmente um radical, é um agente oxidante fraco classificado como uma ERO porque pode gerar o radical hidroxil. Os metais de transição, como o  $\text{Fe}_2^+$  ou o  $\text{Cu}^+$ , catalisam a geração do radical hidroxil à partir do peróxido de hidrogênio na reação de Fenton. Como o peróxido de hidrogênio é lipossolúvel, ele pode se difundir através das membranas e gerar  $\text{OH}^\cdot$  em locais que contenham Fe ou Cu, como as mitocôndrias. O peróxido de hidrogênio também é precursor do ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), um agente oxidante potente que é produzido endógena e enzimaticamente por células fagocíticas.

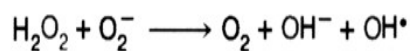
Radicais orgânicos são gerados quando o superóxido ou radical hidroxil extrai de forma indiscriminada elétrons de outras moléculas. Os radicais peróxi orgânicos são intermediários de reações em cadeia, como a lipoperoxidação. Um grupo adicional de radicais, denominados espécies reativas de nitrogênio (ERON), contêm nitrogênio além de oxigênio. Eles são derivados, principalmente do radical livre óxido

nítrico (NO), o qual é produzido de maneira endógena pela enzima óxido-nítrico-sintase. O óxido nítrico combina-se com O<sub>2</sub> ou superóxido para produzir ERO adicionais.

**Seqüência da reação de Fenton**



**Reação de Haber-Weiss**



### 3.5 Estresse Oxidativo (EO)

Pode-se dizer que um organismo encontra-se sob estresse oxidativo (EO), quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes (Sies, 1986).

### 3.6 Mecanismos Antioxidantes

Como as ERO são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células aeróbias possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores. A organização estrutural da célula é, por si só, importante para a separação dos reagentes das reações de formação de ERO (Dormandy, 1978)

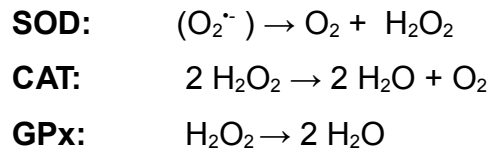
- **Sistema de defesa enzimático**

Inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), que numa interação cooperativa com outras enzimas e agentes



redutores, provêm proteção celular. Estas enzimas evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não exista produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (Pal Yu, 1994)

Reações:



- **Sistema de defesa não enzimático**

Este sistema inclui compostos de baixo peso molecular pelo organismo humano como bilirrubina, hormônios sexuais, coenzima Q, ácido purico, etc., ou ingeridos através da dieta como o ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), carotenóides (vitamina A) e polifenóis de plantas (flavanóides) (Silva; Naves, 2001).

### 3.7 Receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE)

O receptor para os produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma proteína de aproximadamente 45 kDa. É um membro da superfamília das imunoglobulinas de superfície celular. Possui três domínios: um tipo V (variável) e dois tipo C (constante). Além destes domínios, o RAGE possui uma região transmembrana de ancoragem que fixa o RAGE na membrana e uma pequena e altamente carregada cauda citosólica com 43 aminoácidos que são necessários para a sinalização intracelular (Schmidt e Stern, 2000).

O RAGE é expresso em vários tipos celulares como, por exemplo, endotélio vascular, músculo liso, monócitos, macrófagos, células do epitélio glomerular e células neuronais; mas em baixos níveis em homeostase. Em situações de aumento da atividade celular ou estresse, inflamação e doença de Alzheimer, a expressão do RAGE é aumentada nas células afetadas, desta maneira, mostrando-se um marcador de processos inflamatórios (Schmidt et al., 1999; Nishikawa et al., 2000;

Schmidt e Stern, 2000; Hudson et al., 2002, Roy et al., 2006). Recentemente, estudos mostraram que RAGE tem função central na regulação de tumores, mas ainda não identificaram as regiões responsáveis pelo aumento da expressão da proteína RAGE associados ao câncer (Arriero et al., 2006).

Uma das peculiaridades da proteína RAGE é a sua capacidade de reconhecer vários ligantes, permitindo a sua participação em um amplo espectro de eventos fisiopatológicos, relacionados principalmente à propagação de disfunção celular (Schmidt et al., 2000). O receptor RAGE interage com ligantes estruturalmente distintos, mas com conformações semelhantes, permitindo reconhecimento de uma variedade de sequências primárias de resíduos de aminoácidos; este fato demonstra a importância do entendimento da estrutura do sítio de reconhecimento dos ligantes de RAGE (Schmidt et al., 2000).

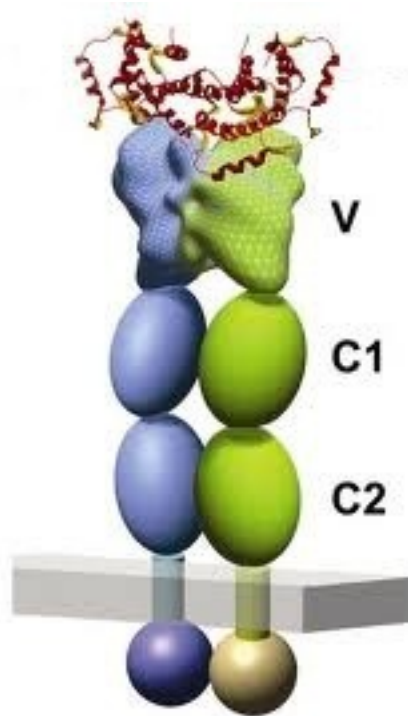
Os ligantes da proteína RAGE mais conhecidos são os produtos finais de glicação avançada (AGEs), que constituem um grupo heterogêneo de compostos responsáveis por efeitos adversos, incluindo redução de atividade enzimática, danos a ácidos nucleicos, formação de ligações cruzadas (*cross-linking*) entre proteínas, além de indução de vias citotóxicas (Brownlee, 1994). A formação de AGEs ocorre pela natureza reativa de açúcares redutores, como a glicose que, por meio de seus grupos aldeídos ou cetonas, reagem não-enzimaticamente com grupos amino livres de proteínas, produzindo uma ligação irreversível (Huttunen, 1996).

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são caracterizados como o principal ligante do RAGE (Neeper, 1992; Schmidt, 1992), entretanto por ser membro da superfamília das imunoglobulinas o RAGE apresenta outros tais como anfoterina/high-mobility group box-1 (HMGB-1), as proteínas da classe S100/calgranulinas e o peptídeo  $\beta$ -amilóide (Hofmann et al.; 1999)

Os radicais livres podem causar dano oxidativo aos componentes celulares, podendo, desta maneira, induzir a produção de espécies reativas (Halliwell et al., 1999). Condições relacionadas com o aumento da produção de espécies reativas favorece um aumento na expressão de RAGE, que por sua vez induz a condições

patológicas, como diabetes e processos neurodegenerativos. Por sua vez, uma alta expressão de RAGE induz a promoção de espécies reativas e como consequência, a manutenção de um ambiente pró-oxidante e inflamatório (Lee BW et al.; 2010).

### Interação do ligante com o domínio de RAGE



#### **4 PROBLEMA**

Considerando o fato de indivíduos utilizarem complementos vitamínicos como fonte de antioxidantes, e sabendo que a expressão e função de RAGE pode ser afetada de diferentes formas por EROs e estresse oxidativo, o presente trabalho tentará identificar se a vitamina A afeta a expressão de RAGE e se o seu mecanismo de ação está relacionado com a produção ou inibição de EROs. Para elucidar esse mecanismo, foi utilizado um modelo de cultura celular.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 Reagentes e Produtos Químicos**

N-acetilcisteína (NAC), Retinol, Ácido Retinóico (AR), 20,70-diclorohidrofluorescência (DCFH-DA) e Trolox foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA). O ácido retinóico e o retinol foram dissolvidos em etanol. As concentrações foram preparadas minutos antes do experimento, e a concentração final foi determinada por absorção UV. As soluções, durante todo os procedimentos, foram mantidas sem acesso à luz. Os tratamentos foram iniciados pela adição dos compostos nas concentrações: AR (0,01-10  $\mu$ M); Retinol (0,5 – 10  $\mu$ M); N-acetilcisteína (NAC, 1 mM) e Trolox (0,1 mM).

### **5.2 Cultura de células**

As células SH-SY5Y são derivadas de neuroblastoma humano e foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Foram cultivadas em placas de plástico de seis poços com “n” de 3 (controle; ácido retinóico; retinol; (AR) + Trolox; retinol + Trolox; (AR) + NAC; retinol + NAC), mantidas à 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37 graus com meio completo (DMEM/F12), gentamicina, fungizona e soro fetal bovino 10%; pH 7,4. Os tratamentos com ácido retinóico, retinol e antioxidantes (NAC e trolox) foram adicionados quando as células atingiram 70-80% de confluência. As células foram mantidas por 24h com o tratamento, meio completo, gentamicina, fungizona e soro fetal bovino 1%. Após as 24h, as células foram raspadas e congeladas com solução tampão Laemmli, 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris HCl e pH 6,8.

### 5.3 Quantificação de RAGE por immunoblot

Para determinar o imunoconteúdo de RAGE, as amostras de células foram aquecidas para que as proteínas fossem desnaturadas. As proteínas são separadas de acordo com seu peso molecular usando-se a eletroforese em gel (poliacrilamida). Após, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, e uma corrente elétrica é aplicada para que as proteínas se movam para a membrana. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração de Ponceau, e então as membranas foram bloqueadas em solução salina tamponada com Tris e Tween (TTBS; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo NaCl 0,9% e 0,1% Tween-20) e 5% albumina. Após, foram incubadas durante à noite com o anticorpo primário policlonal anti RAGE. A membrana foi lavada novamente com TTBS e incubada com anticorpo secundário anti-imunoglobulina complexado à uma peroxidase. Após a incubação com esse anticorpo, a membrana é incubada por 5 minutos com substrato quimioluminescente para peroxidase, e desta maneira a reação produz quimioluminescência proporcional a quantidade de proteína (RAGE). Um filme fotossensível foi colocado contra a membrana, e a impressão da quimioluminescência é realizada proporcionalmente à quantidade de anticorpo ligado ao RAGE presente na membrana. Análise densitométrica dos filmes foi realizada com o software ®Opti-Quant.

### 5.4 Ensaio de produção de ER por DCFH-DA

A produção intracelular de EROs foi determinada através de um ensaio em tempo real DCFH-DA. As células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 1h com DCFH-DA (solução em DMSO, 10 mM), em meio de cultura 1% de soro fetal bovino à 5% CO<sub>2</sub>, 37 graus C. Em seguida, as células foram lavadas e os tratamentos foram iniciados. Durante o tratamento, alterações na fluorescência foram monitorados em um leitor automático de microplaca (F2000, Hitachi Ltd., Tóquio, Japão) durante uma hora a 37 ° C. Peróxido de hidrogênio (1 mM) foi usado como controle positivo para a produção de ERO. Os dados foram registrados a cada 30 segundos e plotados no software Excel.

## **5.6 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P. (erro padrão) e analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

Sabendo que a vitamina A é utilizada como forma antioxidante por muitos praticantes de exercício físico e sendo o ácido retinóico e o retinol as duas formas mais ativas desta vitamina no nosso organismo, decidimos utilizar esses dois metabólitos para investigar a expressão do imunocónteuódo de RAGE nas células SHSY-5Y. As concentrações de vitamina A utilizadas para o experimento foram aquelas mais próximas das concentrações fisiológicas. Quando avaliado a expressão do imunocónteuódo RAGE nas células SHSY-5Y, os resultados mostraram que a expressão de RAGE foi aumentada por ambos os compostos após 24 horas de incubação: nas células tratadas com retinol (5 e 10  $\mu\text{M}$ ) houve maior expressão de RAGE (Figura 1A). Já nas células tratadas com ácido retinóico (0,001 $\mu\text{M}$ ; 0,01 $\mu\text{M}$ ; 0,1 $\mu\text{M}$ ; 1 $\mu\text{M}$ ), houve aumento na expressão de RAGE em todas as concentrações testadas (Figura 1B).

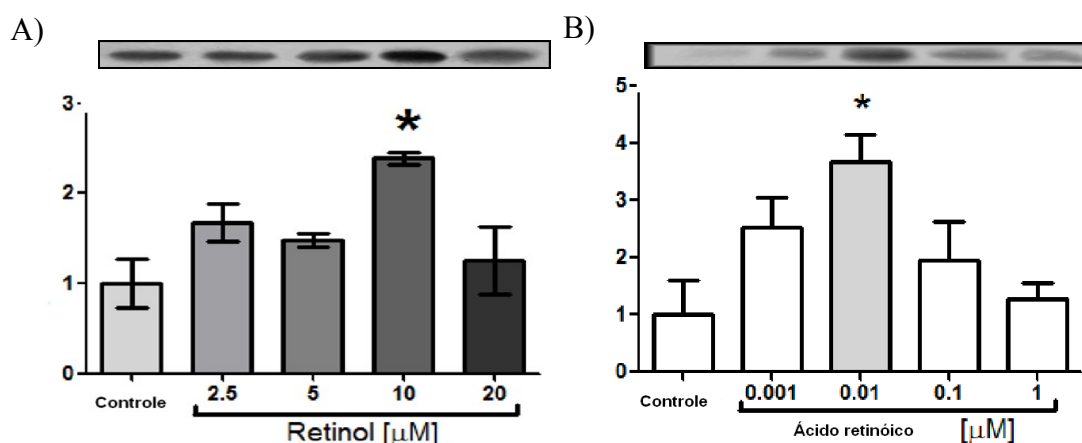


Figura 1- Expressão de imunocónteuódo RAGE em SH-SY5Y. Células SH-SY5Y foram incubadas com retinol (A) e ácido retinóico (B) por 24 h. Imunocónteuódo de RAGE foi quantificado com software normalizado com a imunoreatividade de b-actina. Os experimentos foram realizados com  $n=3$  e os resultados expressos como média  $\pm$  E.P.

A fim de certificar se esse aumento na expressão de RAGE poderia estar envolvido com espécies reativas, as células foram incubadas com os antioxidantes N-acetilcisteína (NAC, 1mM) e Trolox (0,1mM). Os resultados mostraram que



aquelas células tratadas com retinol (10  $\mu\text{M}$ ) quando co-tratadas com antioxidantes, apresentaram uma diminuição significativa na expressão do imunocontéudo de RAGE (Figura 2A). No entanto, as células tratadas com ácido retinóico (0,01 $\mu\text{M}$ ), quando co-tratadas com antioxidantes não apresentaram diminuição significativa na expressão de RAGE (Figura 2B).

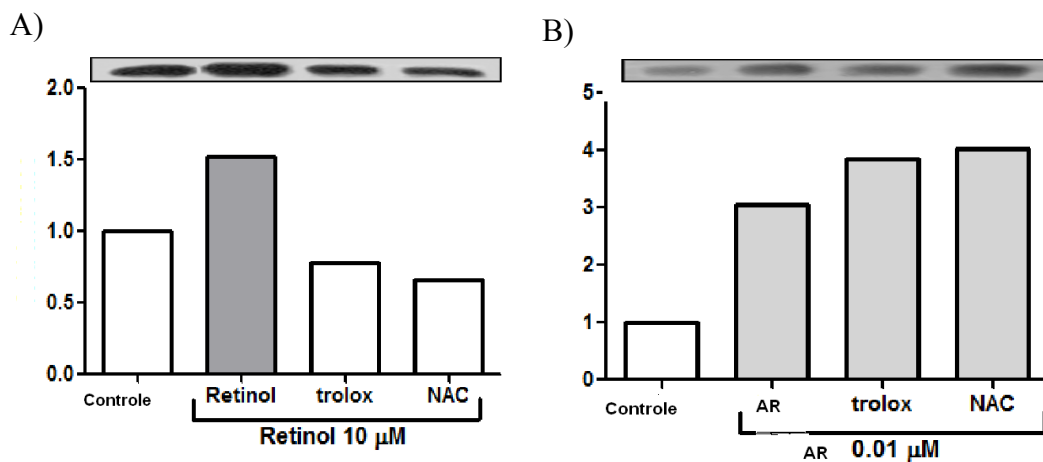


Figura 2 – Expressão de imunocontéudo RAGE em SH-SY5Y. Tratamento com antioxidantes (Trolox ou *N*-acetilcisteína) inibe o efeito do retinol 10 $\mu\text{M}$  (A), e não altera o efeito do AR (B). Imunocontéudo de RAGE foi quantificado com software normalizado com a imunoreatividade de b-actina. Os experimentos foram realizados com n=3 e os resultados expressos como média.

Através de um ensaio de produção de espécies reativas em tempo real de oxidação, se avaliou a produção intracelular de espécies reativas por retinol e AR nas células SH-SY5Y. A técnica quantifica a produção de espécies reativas dentro da célula, através do monitoramento da fluorescência produzida pela oxidação do DCFH em DCF, que é diretamente proporcional à produção intracelular de espécies reativas. Os resultados mostraram que as células tratadas com retinol acima de 5  $\mu\text{M}$ , quando submetidas ao método, apresentaram um aumento significativo na produção intracelular de espécies reativas (Figura 3A). Por outro lado, as células tratadas com ácido retinóico, quando avaliada a produção intracelular de espécies reativas, não apresentaram alterações com qualquer concentração testada (Figura 3B).

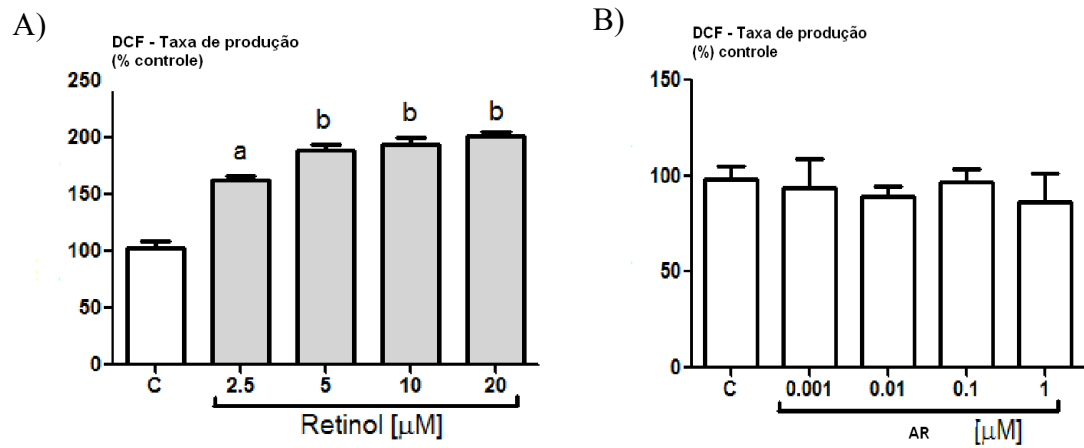


Figura 3 - Avaliação da produção de espécies reativas por retinol e AR em células SH-SY5Y através de um ensaio em tempo real de oxidação de DCFH que indicou: (A) o retinol aumentou a produção intracelular de espécies reativas, (B) porém o mesmo não foi observado por AR. Os experimentos foram realizados com  $n=3$  e os resultados expressos como média  $\pm$  E.P.

## 7 DISCUSSÃO

O uso de vitaminas tem sido defendido em diversas condições, desde a suplementação para esportistas até a prescrição para indivíduos idosos (Correia, 2001). Inúmeras pesquisas sugerem que os indivíduos fisicamente ativos envolvidos em programas de exercícios agudos ou crônicos, podem ser beneficiados pelo consumo de nutrientes antioxidantes (Aguiló et al., 2003).

A captação diária equilibrada de macronutrientes em associação com o fornecimento adequado de vitaminas são considerados como requisito essencial para manter o metabolismo de energia e construir uma estrutura adequada para a prática de exercícios físicos dos indivíduos. No entanto, a captação descuidada e irrestrita de suplementos podem ser prejudiciais à saúde (Marcelo Barros et al., 2008).

Atualmente, a suplementação vitamínica, tem sido adotada em larga escala em complexos esportivos, como: ginásios, pistas de atletismo, piscinas, quadras cobertas e campos ao ar livre, na tentativa de melhores resultados (Marcelo Barros et al., 2008). Sendo assim, a influência da alimentação em condições de exercícios, tem despertado a atenção de pesquisadores no desempenho e/ou no estresse oxidativo dos suplementos vitamínicos (Oliveira et al., 2002). Alguns estudos têm relacionado o uso de vitaminas como agentes de proteção em sistemas biológicos (Silva; Naves, 2001). Porém, outros estudos mostram que determinadas doses de suplementos alimentares podem induzir a danos teciduais (Reid, M. B. et al., 2001).

Dessa forma, nossos experimentos foram realizados a fim de estabelecer a eficiência da vitamina A (retinol e AR) como agentes antioxidantes. Para isto, investigamos a expressão do imunocito RAGE (marcador de processos inflamatórios) nas células SH-SY5Y quando tratadas com vitamina A, e possível relação com ERO. Os dados do nosso estudo indicaram que o retinol é capaz de induzir o estresse oxidativo em sistema de células, aumentando a produção intracelular de radicais livres, favorecendo desta maneira, um aumento na expressão de RAGE. O aumento da expressão de RAGE, por sua vez, induz a produção de

espécies reativas, via NADPH oxidase, que mantem a expressão do imunoconteúdo RAGE (feedback positivo); (Lee BW et al.; 2010). Por outro lado, o ácido retinóico, não influenciou a produção de espécies reativas nas células, nem a expressão de imunoconteúdo RAGE quando tratadas com os antioxidantes NAC e Trolox. Todavia, Ochoa et al. (2003) mostrou que o aumento da expressão de RAGE em células tratadas com AR seria mediada através de receptores nucleares específicos que, uma vez ativados, interagem com fatores de transcrição, modulando a transcrição de genes da molécula alvo.

Desde os estudos iniciais de (Cammoner et al., 1954), uma quantidade crescente de evidências indicam que o músculo esquelético produz ERO durante a atividade contrátil e mesmo em repouso. Na década de 80, relatos de (Davies et al., 1982) mostraram que a produção de ERO é elevada após o exercício extenuante em músculo esquelético de ratos. A elevada taxa de produção de ERO intracelular impõe um estado mais oxidado durante a alta intensidade de contração muscular (Jackson et al., 1985). As ERO podem ser produzidas por fontes variadas, incluindo a xantina oxidase (McCord, J.M et al., 1969), fosfolipase-A (Gong, M.C et al., 2006), e NADPH oxidase (Zuo, L. et al., 2004).

Um dos mecanismos de formação das ERO durante o exercício envolve a interrupção temporária das bombas de ATP dependentes de cálcio ( $Ca^{++}$ ) levando ao aumento das concentrações intracelulares de cálcio, que durante o exercício podem ativar a via da xantina oxidase. A xantina oxidase usa o oxigênio molecular ao invés do  $NAD^+$  como acceptor de elétrons e assim gera o radical superóxido. No exercício extenuante e processos inflamatórios, ocorre o aumento de leucócitos, principalmente neutrófilos. Estes podem reduzir o oxigênio molecular a radical superóxido via NADPH oxidase, a qual está inativa durante o repouso (Subudhi Aw et al., 2001). Assim, o exercício físico extenuante induz ao aumento excessivo da produção de radicais livres, levando ao desequilíbrio nos sistemas de defesa antioxidantes e pró-oxidantes, resultando em dano tecidual ou na produção de compostos tóxicos (Ebellig, et al., 1989).

Após o exercício extenuante, as concentrações circulantes de linfócitos e neutrófilos aumentam drasticamente (Wierzba, T.H. Et al., 2006). Células

inflamatórias como neutrófilos podem infiltrar no músculo esquelético danificado após o exercício (Gleeson, M. et al., 2006). Prostaglandinas, TNF alfa, e as interleucinas IL-1 e IL-6 são fatores quimiotáticos de neutrófilos e responsável pela infiltração de macrófagos no tecido danificado (Pedersen, B.K. Et al., 2000). Ambos IL-1 e IL-6 são conhecidos por aumentar a concentração na corrente sanguínea em resposta ao exercício (Pedersen, B.K. Et al., 2000).

A ativação do receptor RAGE gera aumento nas concentrações de citocinas de resposta pró-inflamatória, como as interleucinas IL-1 $\alpha$  e IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) entre outros (Hofmann et al., 1999). Tem-se também, que o acúmulo de ligantes de RAGE, como os AGEs, reforça o aumento da expressão de RAGE, portanto, receptor e ligante acumulam-se em processo indutores de inflamação como os observados durante o diabetes (Soulis et al., 1997).

Os estudos acima citados nos permitem concluir que o exercício físico extenuante e a expressão de RAGE induzem a produção de espécies reativas, por exemplo via NADPH oxidase, no qual o desbalanço redox induz o predomínio de agentes pró-oxidantes. Nossos dados corroboram com os resultados de Murata (2000), no qual diz que determinadas concentrações de retinol induzem a danos oxidativos. Nestas circunstâncias, a adição de antioxidantes exógenos, ao invés de combater os efeitos nocivos causados pelo exercício intenso, podem favorecer a ocorrência de lesões oxidativas, indicando um aumento nas concentrações de agentes pró-oxidantes (Sacheck et al., 2001), visto que, pode induzir aumento na expressão de RAGE, que por sua vez, gera aumento na produção de espécies reativas. Temos assim, duas variáveis que tendem a produzir danos oxidativos, e consequentemente acelerar os processos de deterioração da saúde dos indivíduos.

Por outro lado, sabemos que o exercício físico regular e moderado, é capaz de disparar adaptações em resposta a uma maior produção dos radicais livres. Neste sentido, estudos mais recentes estabelecem o papel da atividade física na prevenção e controle de diversas doenças, como câncer (Marret LD et al., 2000), diabetes e hipertensão (Albright A et al., 2000).

Na diabetes mellitus do tipo I, o exercício físico auxilia no melhor controle da

pressão arterial, no perfil lipídico, na redução do colesterol total e na redução triglicéridos. Na diabetes mellitus do tipo II, o treinamento tem importância, pois aumenta a sensibilidade à ação da insulina, diminuindo os quadros hiperglicêmicos que estão associados ao aumento de AGEs, além da melhora na capacidade física geral do portador (Damiano, 2007). Porém, como dito ao longo deste trabalho, a suplementação com derivados da vitamina A, que são recomendados aos praticantes de atividade física como prevenção e combate a doenças como diabetes, podem estar diminuindo os benefícios do treinamento físico moderado, pois podem induzir o aumento na expressão do imunocito RAGE, que conseqüentemente, desencadeia aumento na produção de espécies reativas.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Buscou-se por meio deste estudo avaliar a segurança do uso da vitamina A como forma antioxidante.

Levando em consideração os resultados obtidos nesse estudo, juntamente com a literatura, nossos resultados mostram que a suplementação com vitamina A em determinadas concentrações, pode acentuar ainda mais os danos causados pelos exercícios extenuantes e também favorecer o aumento da expressão do imunociteína RAGE via espécies reativas.

Conclui-se que os resultados aqui presentes serão úteis para trabalhos futuros, sugerindo-se que sejam realizados mais estudos para melhor avaliar os efeitos do uso de vitaminas como forma de antioxidantes.

## REFERÊNCIAS

Hollander J, Fiebig R, Gorge M, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL. Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle, fiber-specific adaptation to endurance training. *Am. J. Physiol.* 1999, v277, p R856-R862.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford, 1999.

Banerjee, AK.; Mandal, A; Chanda, D.; Chakraborti, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol. Cell. Biochem.* v.253, p.307-312, 2003.

Bowles, D.K.; Torgan, C.E.; Ebner, S.; Kehrer, J.P.; Ivy, J.L.; Starne, J.W. Effects of acute, submaximal exercise on skeletal muscle. *Free Radic. Res. Commun.* v.14, n.2, p.139-143, 1991.

Groussard, C.; Machefer, G.; Rannou, F.; Faure, H.; Zouhal, H.; Sergent, O; Chevanne, M.; Cillard, J.; Gratas-Delamarche, A Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can. J. Appl. Physiol.* v.28, n.1, p.79-92, 2003.

Lopaczynski, W.; Zeisel, S.H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutr. Res.* v.21, p.295-307, 2001.

Gandra, P.G.; Alves, A.A.; Macedo, D.V.; Kubota, L.T. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. *Quim. Nova.* v.27, n.6, p.980-985, 2004.

Silva, C.R.M.; Naves, M.M.V. Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer. *Rev. Nutr. Campinas.* v.14, n.2, p.135-143, 2001.

Schmidt, A.M., S.D. Yan, S.F. Yan, and D.M. Stern. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 108:949–955.

Gebhardt, C., J. Nemeth, P. Angel, and J. Hess. 2008. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem. Pharmacol.* 72:1622–1631.

Hofmann, M. A.; Drury, S.; Fu, C.; Qu, W.; Taguchi, A.; Lu, Y.; Avila, C.; Kambham, N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Neurath, M. F.; Slattery, T.; Beach, D.; McClary, J.; Nagashima, M.; Morser, J.; Stern, D.; Schmidt, A. M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, v. 97, p. 889-901, 1999.

Hudson, B.I.; Stickland, M.H.; Futers, T.S.; Grant, P.J. Effects of novel polymorphisms in the AGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*, v. 50, p. 1505–1511, 2001.



Hudson, B. I; Stickland, M. H.; Grant, P. J. Identification of polymorphisms in the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Gene. *Diabetes*, v. 47, 1998.

Zhang L, Postina R, Wang Y. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Dec;66(24):3923-35. Review. Ectodomain shedding of the receptor for advanced glycation end products: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease.

Sapin, V., Alexandre, M.C., Chaib, S., Bournazeau, J.A., Sauvant, P., Borel, P., Jacquetin, B., Grpplier, P., Lemery, D., Dastugue, B., Azais-Braesco, V. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000a; 71: 537-543.

Sapin, V., Chaib, S., Blanchon, L., Alexandre-Gouabau, M.C., Lémery, D., Charbonne, F., Gallot, D., Jacquetin, B., Dastugue, B., Azais-Raesco, V. Esterification of vitamin A by the human placenta involves villous mesenchymal fibroblasts. *Pediatric Research*, 2000b; 48: 565-572.

Palozza, P., Serini, S., Nicuolo, F.D., Piccioi, E., Calviello, G. Prooxidant effects of  $\beta$ -carotene in culture cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 2003; 24: 353-362.

Baydas, G., Karatas, F., Gursu, F., Bozkurt, HA., Ilhan, N., Yasar, A., Canatan, H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Archive of Medical Research*, 2002; 33: 276-280.

IOM. Dietary References Intakes for vitamin A vitamin K, arsenic, boron, and chromium. 2001.

Copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington: National Academy Press, 2001; cap 4.

Lowe, G.M., Vlismas, K., Young, A. Carotenoids as prooxidants? *Molecular Aspects of Medicine*, 2003; 24: 363-369.

Yang, R., Li, R., Mao, S., Sun, L., Huang, X., Ji, C., Zhu, Z., Wu, L., Qin, Y., Zhao, Z. The survey of serum retinol of the children aged 0~4 years in Zhejiang Province, China. *BMC Public Health*, 2007; 7:264.

Zhang,C., Williams, M.A., Sanchez, S.E., King, I.B., Ware-Jauregui, S., Larrabure, G., Bazul V., Leisenring, W.M. Plasma concentrations of carotenoids, retinol, and tocopherols in preeclamptic and normotensive pregnant women. *American Journal of Epidemiology*, 2001;153:572–80.

Zhang D.Q. & McMahon D.G. (2000). Direct gating by retinoic acid of retinal electrical synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 14754-14759.

Omenn G.S., Goodman G.E., Thornquist M.D., Lund B., Metch B., Gylys-Colwell I. (1994). The beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET) for chemoprevention of lung cancer in high risk populations: smokers and asbestosexposed workers. *Cancer*

Research 54, 2038s-2043s.

Olson J.A. (1996). Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *Journal of Nutrition* 126, 1208S-12012S.

Olson, J.A. (2001). Vitamin A. In: Present knowledge in nutrition, eds. E.E. Ziegler, L.J. Filer Jr. 7a. edição, International Life Sciences Institute Press, 109-119.

Murata M. & Kawanishi S. (2000). Oxidative DNA damage by vitamin A and its derivative via superoxide generation. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2003-2008.

Albright, A; Franz, M.; Hornsby, G.; Kriska, A; Marrero, D.; Ullrich, I.; Verity L. S. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.32, n.7 p.1345-1360, 2000.

Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 1995;72:549-54.

Cooper, C.E.; Vollaard, N.B.; Choueiri, T.; Wilson, M.T. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Bioche. Soc. Trans.* v.30, n.2, p.280-285, 2002.

Demopoulos, H.B.; Santomier, J.P.; Seligman, M.L.; Pietronigro, D. D. Free radical pathology: rationale and toxicology of antioxidants and other supplements in sports medicine and exercise science. Katch, F. I., (ed). *Sports, Health and Nutrition*. Champaign, IL: Human kinetics Publishers. p.139-189, 1986.

Marshall, R.J.; Scott, K.C.; Hill, R.C.; Lewis, D.D.; Sundstrom, .; Jones, G.L; Harper, J. Supplemental vitamin appears to slow racing greyhounds, *J. Nutr.* v.132, p.1616S-1621S, 2002.

Sacheck, J.M.; Blumberg, J.B. Role of vitamin and oxidative stress in exercise. *Nutrition*. V17, p.809-814, 2001.

Urso, M.L.; Clarkson, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. v.189, p.41-54, 2003.

Witt, E. H.; Reznick, A.Z.; Viguie, C.A.; Starke-Reed, P.; Packer, L. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J. Nutr.* v.122, p.766-773, 1992.

Elsayed, N.M. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition*. v.17, p.828-834, 2001.

Hill, K.E.; Burk, R.F.; lane, J.M. Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *J. Nutr.* v.117, p.99-104, 1987.

Maughan, R.; Gleeson, M.; Greenhaff, P. *Bioquímica do exercício e do treinamento*. São Paulo. Editora Manole; 2000.

Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, v.25, p.1058-1071, 1986.

Dormandy, T.L. Free radical oxidation and antioxidants. *Lancet*, v.1, n.8065, p.647-650, 1978.

Pal Yu, B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. V.74, n.1, p.139-162, 1994.

Schmidt, A. M.; Hori, O.; Brett, J.; Yan, S. D.; Wautier, J. L.; Stern, D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 14, p. 1521–1528, 1994.

Schmidt, A. M.; Stern, D. M. RAGE: A new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 11, p.368-375, 2000.

Schmidt, A. M.; Yan, S. D.; Yan, S. F.; Stern, D. M. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1498, p. 99-111, 2000.

Brownlee, M. Advanced Protein Glycosylation in Diabetes and Aging. *Annual Review of Medicine*, v. 46, p. 223-234, 1995.

Huttunen, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE). Tese. University of Helsinki, p. 42, 1996.

Yonekura, H.; Yamamoto, Y.; Sakurai, S.; Petrova, R. G.; Abedin, M. D. J.; Li, H.; Yasui, K.; Takeuchi, M.; Makita, Z.; Takasawa, S.; Okamoto, H.; Watanabe, T.; Yamamoto, H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochemical Journal*, v. 370, p. 1097-109, 2003.

Neeper, M.; Schmidt, A. M.; Brett, J.; Yan, S. D.; Wang, F.; Pan, Y. C.; Elliston, K.; Stern, D.; Shaw, A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *Journal Biological Chemistry*, v. 267, p. 14998–15004, 1992.

Arriero, M; Harja, E; Yang, Hojim; Cronk, K; Schmidt, AM; HudsonN, BI. Identification of a novel gene enhancer region upstream of the RAGE gene: implications for tumor biology. *The FASEB Journal*. v. 20, p. A228, 2006.

Hudson, BI; Stickland, MH; Grant, PJ. Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. Prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups. *Diabetes*. v. 47, p. 1157, 1998.

Hofmann, M. A.; Drury, S.; Fu, C.; Qu, W.; Taguchi, A.; Lu, Y.; Avila, C.; Kambham,

N.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Neurath, M. F.; Slattery, T.; Beach, D.; McClary, J.; Nagashima, M.; Morser, J.; Stern, D.; Sscmidt, A. M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, v. 97, p. 889-901, 1999.

Lee B. W. 2010 Dec;26(6):813-8. RAGE ligands induce apoptotic cell death of pancreatic  $\beta$ -cells via oxidative stress. Department of Internal Medicine, Hallym University College of Medicine, 896 Pyungchon-dong, Kyonggi-do, Republic of Korea.

Aguiló, A; Tauler, P.; Guix, M.P.; Villa, G.; Córdova, A; Tur, J.A.; Pons, <sup>a</sup> Effect of exercise intensity and training on antioxidants and cholesterol profile in cyclists. *J. Nutr. Biochem.* v.14, p.319-325, 2003.

Marcelo P. Barros et al.; Review; Phytochemicals, herbs and antioxidants currently used as supplements for endurance and resistance exercise: facts, foes, and misconceptions. *Phytochemistry* Vol. 9, 2008.

Oliveira, S.I.; Diniz, D.B.; Amaya-Farfan, J. Carbohydrate-energy retriiction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. *British J. Nutr.* v.89, n.1, p.89-96, 2003.

Ebelling CB, Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med* 1989;7:207-34.

Marret LD, Theis B, Ashbury FD. Workshop report: physical activity and cancer prevention. *Chronic Dis Can* 2000;21:143-9.

Albright A, Franz M, Hornsby G, Kriska A, Marrero D, Ullrich I, et al. American college of sports medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1345-60.

Subudhi AW, Davis SL, Kipp RW, Askew EW. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001;11:32-41.

Commoner, B., Townsend, J., and Pake, G. E. 1954, *Nature*, 174, 689.

Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., and Packer, L. 1982, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107, 1198.

Jackson, M. J., Edwards, R. H. T., and Symons, M. C. R. 1985, *Biochim. Biophys. Acta*, 847, 185.

McCord, J. M., and Fridovich, I. 1969, *J. Biol. Chem.*, 244, 6049.

Gong, M. C., Arbogast, S., Guo, Z., Mathenia, J., Su, W., and Reid, M. B. 2006, *J. Appl. Physiol.*, 100, 399. 19. Zuo, L., Christofi, F. L., Wright, V. P., Bao, S., and Clanton, T. L., 2004, *J. Appl. Physiol.*, 97, 661.

Reid, M. B. 2001, *Med. Sci.*, 33, 371.

Gleeson, M. 2006, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 9, 659.

Pedersen, B. K., and Toft, A. D. 2000, *Br. J. Sports Med.*, 34, 246.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (Eds.) 2007, *Free Radicals Biology and Medicine*, Biosciences Oxford, London, 704.

Soulis, T.; Thallas, V.; Youssef, S.; Gilbert, R. E.; McWilliam, B. G.; Murray-Mcintosh, R. P.; Cooper, M. E. Advanced glycation end products and their receptors co-localize in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia*, v. 40, p. 619-628, 1997.

Sasheck, J.M.; Blumberg, J.B. Role of vitamin E and oxidative stress in exercise. *Nutrition*. v.17, p.809-814, 2001.

Ochoa W.F., Torrecillas A., Fita I., Verdaquer N., Corbalan-Garcia S., Gomez-Fernandez J.C. (2003). Retinoic acid binds to the C2-domain of Protein Kinase C( $\alpha$ ). *Biochemistry* 42, 8774-8779.

Bioquímica Médica de Marks. Uma abordagem clínica. Colleen Smith; Alla Marks; Michael Lieberman. 2ª Edição.

Damiano AP, Carvalho T., 2007, Efeitos do exercício físico na claudicação intermitente de portadores de doença. *Arq Bras Cardiol* 89 (6), 238.