

Sayonara Ivana Santos de Assis

A ativação prolongada da subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B sustenta o efeito persistente dos produtos de glicação avançada sobre a sensibilização inflamatória em macrófagos

São Paulo

2024

Sayonara Ivana Santos de Assis

A ativação prolongada da subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B sustenta o efeito persistente dos produtos de glicação avançada sobre a sensibilização inflamatória em macrófagos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Prof^a Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2024

Assis SIS. A ativação prolongada da subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B sustenta o efeito persistente dos produtos de glicação avançada sobre a sensibilização inflamatória em macrófagos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa da dissertação de mestrado em sessão pública realizada em: ____/____/____, considerou:

Aprovado (a)

Reprovado (a)

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento: _____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Assis, Sayonara Ivana Santos de
A ativação prolongada da subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B sustenta o efeito persistente dos produtos de glicação avançada sobre a sensibilização inflamatória em macrófagos / Sayonara Ivana Santos de Assis. -- São Paulo, 2024.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Produutos finais de glicação avançada 3.Diabetes mellitus 4.NF-kappa-B 5.Inflamação 6.Lipopolissacarídeos

USP/FM/DBD-014/24

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

- Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM-10), com a colaboração do Laboratório de Emergências Clínicas (LIM-51) do Hospital das Clínicas (HCFMUSP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia do Instituto de Ciências Biomédicas I (ICB-I) da Universidade de São Paulo.
- Este estudo contou com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPES) – [bolsa de Mestrado da aluna Sayonara Ivana Santos de Assis (2021/04989-3) e Projeto Temático (2016/15063-0)].

Dedico este trabalho à minha família, meus pais e minha irmã, que batalharam junto comigo por essa conquista e que não mediram esforços ao me auxiliar na realização dos meus maiores sonhos, sempre vibrando a cada vitória com muito entusiasmo.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa Passarelli, pela confiança no meu trabalho, paciência, ensinamentos e dedicação neste importante período de desenvolvimento pessoal e profissional, fazendo deste momento da minha vida uma experiência memorável.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, pelo ombro amigo com os melhores conselhos, acolhimento, companheirismo e companhia nas noites que passamos o tempo conversando entre as pausas do experimento, obrigada por ter me fortalecido tanto.

Ao Dr. Francisco Soriano e Dra. Denise Barbeiro, por serem tão solícitos e gentis ao tirar todas as minhas dúvidas e auxiliar no desenvolvimento teórico e prático deste trabalho, vocês foram essenciais na construção do meu aprendizado.

Ao Dr. Ubiratan Machado por disponibilizar seu laboratório, sendo sempre solícito e à Dra. Maristela Okamoto por disponibilizar seu tempo e enriquecer demais meu aprendizado, estando sempre atenta aos meus questionamentos e tornando o processo leve com sua simpatia e carisma.

Ao Dr. Rodrigo Iborra e Me. Kelly Gomes pelo auxílio na construção da metodologia, pela boa conversa e partilha de conhecimento durante todo o processo.

Ao Dr. Éder Quintão, por me abrir as portas do laboratório e inspirar com sua experiência de vida e trajetória.

À Dra. Aritânia Santos, Dra. Luciene Machado e Wagner Dominguez pelo apoio técnico, por se mostrarem interessados nos meus bons resultados, tirando dúvidas e se disponibilizando em horários extras para que eu pudesse realizar todas as minhas análises em tempo hábil.

Ao amigo e colega de trabalho Leonardo Amendola, minha dupla improvável que deu certo e que tem sido meu parceiro de experimentos, com quem tenho dividido os perrengues e as vitórias do mestrado, obrigada pelas boas risadas, confiança e aguentar minhas reclamações com paciência e bom humor.

Ao Dr. Guilherme Ferreira pelo acolhimento, conversas, conselhos, amizade e por me ensinar todos os princípios da RT-qPCR de forma descomplicada para que eu pudesse desenvolver plenamente meus experimentos.

A todos colegas de trabalho do laboratório que colaboraram de forma direta ou indireta com meu crescimento e com o desenvolvimento deste trabalho: Eduarda Palanca, Danielle Ribeiro, Elda Dantas, Vanessa Del Bianco, Lucas Pereira, Amarilis Campos, Vitória Pires, Isabela Sawada, Dra. Edna Nakandare, Dra. Valéria Nunes, Dra. Patrícia Cazita, Dra. Adriana Saldiba, Me. Monique Santana, Claudia Souza, Rosibel Sileide. Obrigada pelo companheirismo e pelo auxílio.

Aos meus pais Eliana Assis e Ivanildo Assis, por serem meu porto seguro e minha fortaleza, nunca medindo esforços para que eu pudesse vencer esta etapa, sonhando comigo e me incentivando todos os dias nas ligações diárias para matar a saudade, ouvir os desabafos e trazer toda a segurança que eu precisei para continuar firme. Vocês são minha inspiração e tudo que eu faço é por vocês e para vocês!

À minha irmã, Soraya Assis, por ser minha maior apoiadora e braço direito na vida, por me situar com suas palavras de zelo, me trazendo conforto, acolhimento e carinho e pelos conselhos antes de qualquer decisão importante, me trazendo paz e tranquilidade.

Aos amigos, Leandro Coutinho, João Matheus, Paulo Neto, Guilherme Souza, Gabriela Bueno, Mariana Ribeiro e Dr. Pedro Senger, que me fizeram companhia neste processo de aprendizado com conselhos, correções e palavras de apoio, me mantendo forte nos momentos mais desafiadores do mestrado.

À Tamara Souza que foi meu alicerce e minha família em São Paulo, segurando minha mão e me acolhendo com as melhores palavras de incentivo quando mais precisei, obrigada pelas lições de vida e momentos de descontração, você foi essencial nessa conquista.

À Rayanne Lopes, por cuidar de mim durante toda essa caminhada, me trazendo acolhimento através das palavras, ensinamentos e reflexões, obrigada por ter virado uma chave no meu processo de amadurecimento e autoconhecimento através do reconhecimento das minhas conquistas e aprendizados.

Aos que partilharam sua rotina e me motivaram nessa reta final, com carinho, cuidado e companheirismo, meus amigos do 5 andar da moradia dos residentes: Alex, Wender, Izabela, Eliza, Pâmela, Matheus, Yannky, Raphaela e Silvia, nunca irei me esquecer de vocês!!

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

(Leonardo Da Vinci)

RESUMO

Assis SIS. A ativação prolongada da subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B sustenta o efeito persistente dos produtos de glicação avançada sobre a sensibilização inflamatória em macrófagos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2024.

Produtos de glicação avançada (AGE) induzem estresse inflamatório por intermédio da ativação do fator nuclear NF-kappa-B (NFkB), mediante ligação ao receptor para AGE (RAGE). A sinalização do RAGE converge com a do receptor 4 do tipo toll (TLR4) e os AGE sensibilizam macrófagos à estimulação inflamatória por lipopolissacarídeos (LPS). Este efeito é sustentado em macrófagos, persistindo mesmo após longo tempo em meio isento de AGE e são dependentes do controle glicêmico em indivíduos com diabetes mellitus (DM). Testou-se a hipótese de que a persistência da ação da albumina-AGE seja decorrente da ativação nuclear sustentada de NFkB. Sendo assim, determinou-se em macrófagos, tratados com albumina controle (C) e albumina-AGE, o tempo de persistência da sensibilização à estimulação inflamatória por LPS inferido pela 1) secreção de citocinas inflamatórias; 2) conteúdo nuclear das subunidades de NFkB, p50 e p65; 3) expressão de genes inflamatórios. A albumina-AGE foi preparada *in vitro* pela incubação com glicolaldeído 10mM, durante 4 dias a 37°C, no escuro e a albumina-C, incubada apenas com solução tampão-fosfato. Macrófagos da linhagem RAW-264.7 sobrecarregados, por 24h com lipoproteínas de densidade baixa (LDL) acetilada, foram tratados com albumina-C ou AGE (2 mg/mL, 48 h), na presença ou ausência de HDL. A seguir, foram mantidos em meio isento dessas albuminas por diferentes intervalos de tempo e, posteriormente, incubadas por 24 h com LPS. Foram determinadas a expressão gênica de *RelA*, *Nfkb1*, *Ager*, *Tlr4*, *IL6*, *TNF*, *Abca1* e *Abcg1* por RT-qPCR, o conteúdo nuclear de p50 e p65 por Western blot e a secreção de citocinas inflamatórias TNF, IL-6 e IL-1beta, por ELISA. As comparações foram feitas por ANOVA de um fator ou teste t de *Student* (n=6). A albumina-AGE sensibilizou os macrófagos à estimulação por LPS, favorecendo maior secreção de TNF, IL-6 e IL-1 beta em, respectivamente, 1,5%, 9,4%, 5,6% em comparação à albumina-C (tempo zero). O aumento na secreção de TNF, IL-6 e IL-1beta permaneceu, respectivamente, até 24 h, 24 h e 12 h, mesmo após a remoção da albumina-AGE do meio, com uma área sob a curva maior em 1,6, 16 e 5,2 vezes, respectivamente; a incubação na presença de HDL não alterou o perfil inflamatório persistente. A expressão dos genes *Il6* e *RelA*, (após 8 h da remoção das albuminas do meio de cultura) *Il6* e *Abca1* (após 24 h da remoção das albuminas do meio de cultura) foi maior nas células tratadas com albumina-AGE, em comparação à albumina-C. O conteúdo nuclear de p50 foi semelhante entre os grupos, mas o p65 permaneceu aumentado 2,9 vezes, por até 24 h, nas células tratadas com albumina-AGE em comparação à albumina-C. Os resultados evidenciam que a ativação prolongada da subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B sustenta o efeito persistente dos AGE sobre alteração na expressão gênica e a secreção de citocinas inflamatórias em macrófagos desafiados com LPS, o que contribui para a memória metabólica celular.

Palavras-chave: Aterosclerose. Produtos de glicação avançada. Diabetes mellitus. NF-kappa-B. Inflamação. Lipopolissacarídeos.

ABSTRACT

Assis SIS. The prolonged activation of the p65 subunit of the nuclear factor NF-kappa-B sustains the persistent effect of advanced glycation end products on inflammatory sensitization in macrophages [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2024.

Advanced glycation end products (AGEs) elicit inflammation by triggering the activation of nuclear factor NF-kappa-B (NFKB) upon binding to the receptor for AGE (RAGE). Moreover, RAGE signaling converges with toll-like receptor 4 (TLR4) signaling, and AGEs prime macrophage to the lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation. This effect is sustained in these cells, persisting even after a long time in an AGE-free environment, and depends on glycemic control in individuals with diabetes mellitus (DM). The persistence of sensitization to inflammatory stimulation by LPS was determined in macrophages treated with control albumin (C) and AGE-albumin, inferred by 1) secretion of inflammatory cytokines; 2) nuclear content of NFKB subunits, p50, and p65; 3) expression of inflammatory genes. AGE-albumin was prepared by incubation with 10mM glycolaldehyde for 4 days at 37°C in the dark, and C-albumin was incubated only with a phosphate-buffered solution. RAW-264.7 macrophages overloaded for 24h with acetylated low-density lipoprotein were treated with C or AGE-albumin (2 mg/mL, 48 h), in the presence or absence of HDL. They were then kept in a medium free of these albumins for different intervals and subsequently incubated for 24 h with LPS. Gene expression of *RelA*, *Nfkb1*, *Ager*, *Tlr4*, *IL6*, *TNF*, *Abca1*, and *Abcg1* was determined by RT-qPCR, nuclear content of p50 and p65 by western blot, and secretion of inflammatory cytokines TNF, IL-6, and IL-1beta by ELISA. Comparisons were done by one-way ANOVA or Student t-test (n=6). AGE-albumin sensitized macrophages to LPS stimulation, favoring increased secretion of TNF, IL-6, and IL-1 beta by 1.5%, 9.4%, and 5.6%, respectively, compared to C-albumin (zero time). The increase in TNF, IL-6, and IL-1beta secretion persisted, respectively, up to 24 h, 24 h, and 12 h, even after the removal of AGE-albumin from the medium, with an area under the curve greater by 1.6, 16, and 5.2 times; incubation in the presence of HDL did not alter the persistent inflammatory profile. The expression of *Il6* and *RelA* genes (after 8h of albumin removal from the culture medium) and *Il6* and *Abca1* (after 24 h of albumin removal from the culture medium) was higher in cells treated with AGE-albumin compared to C-albumin. The nuclear content of p50 was similar between groups, but p65 remained increased 2.9 times for up to 24 h in cells treated with AGE-albumin. The results demonstrate that prolonged activation of the p65 subunit of nuclear factor NFKB sustains the persistent effect of AGE on gene expression alterations and the secretion of inflammatory cytokines in LPS-challenged macrophages, contributing to cellular metabolic memory.

Keywords: Atherosclerosis. Advanced glycated end products. Diabetes mellitus. NF-kappa-B. Inflammation. Lipopolysaccharides.

LISTA DE SIGLAS

ABCA-1	Proteína cassete A-1 de ligação ao ATP
ABCG-1	Proteína cassete G-1 de ligação ao ATP
ATF	Fator de transcrição ativador 2
AGE	Produto de glicação avançada
AGER-1	Receptor para produto de glicação avançada-1
AMP	Adenosina 3,5 monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP
ApoA-1	Apolipoproteína A-1
ARIC	Estudo de risco de aterosclerose em comunidades
ASC	Domínio de recrutamento de caspases
BAX	Proteína X associada a BCL
BCL	Proteína 2 do linfoma de células B
C	Controle
CANTOS	<i>Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study</i>
CCL2	Ligante 2 da quimiocina (motivo CC)
CD36	Cluster de diferenciação 36
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CHOP	Transcrito 3 induzível por dano de DNA
CPG	Citosina-fosfato-guanina
DAG	Diacilglicerol
DCCT	<i>Diabetes control and complications trial</i>
DCV	Doença cardiovascular
DLBCL	Células de linfoma difuso de grandes células B
DM	Diabetes mellitus
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eIF2alfa	Fator de iniciação eucariótica 2
ELISA	Ensaio imunoenzimático
eNOS	Óxido nítrico sintase
FAFA	Albumina isenta de ácidos graxos

Fas-L	Ligante Fas
GAD	glicolaldeído
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GFAT	Glucosamina-frutose-aminotransferase
GLUT4	Transportador de glicose 4
Grp78	Proteína regulada pela glicose 78
GSDM	Gasdermina
HAT	Histona acetiltransferase
HDL	Lipoproteína de densidade alta
H3K4me3	Histona H3 com três metilações na lisina 4
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
ICAM	Molécula de adesão intracelular 1
IL	Interleucina
IRAK	Cinase associada a IL-1
IKB	Inibidor de NFkB
IKK	Complexo cinase
IKKA	Subunidade alfa do complexo cinase IKK
IKKB	Subunidade beta do complexo cinase IKK
JAK2	Janus cinase 2
J774	Linhagem de macrófagos murina
KCI	Cloreto de potássio
K₂PO₄	Fosfato de potássio
LAL	Ensaio de Limulus Amebocyte Lysate
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferase
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de densidade baixa
LPS	Lipopolissacarídeo
LXR	Receptor hepático X
MCF7 ADR	Linhagem de células epiteliais de câncer de mama humano
MGO	Metilglioxal
MCP1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88

NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaCl	Cloreto de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NEMO	Modulador essencial de NFKB
NFKB	Fator nuclear NF-kappa-B
NRF2	Fator nuclear eritroide
NFKB1	Gene que codifica a subunidade p50 do fator nuclear NF-kappa-B
NFKB2	Gene que codifica a subunidade p52 do fator nuclear NF-kappa-B
NIK	Cinase indutora de NFKB
NLPR3	Domínio pirina da família NLR 3
NOX4	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase 4 - NADPH oxidase 4
PAI-1	Ativador de plasminogênio 1
PARP	Enzima poli ADP ribose polimerase
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PKC	Proteína cinase C
p50	Subunidade p50 do fator nuclear NF-kappa-B
p53	Proteína supressora tumoral
p65	Subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B
QM	Quilomícron
RAGE	Receptor para produto de glicação avançada
RAW-294.7	Linhagem de macrófagos murina
RelA	Gene que codifica para a subunidade p65 do fator nuclear NF-kappa-B
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RXR	Receptor retinoide X
Slc2a4	Gene que codifica o transportador GLUT4
SDIS	<i>Stockholm Diabetes Intervention Study</i>
sRAGE	Receptor RAGE solúvel
SR-B1	Receptor scavenger tipo B, classe 1
STAT-1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

STZ	Estreptozotocina
TAD	Domínio de transativação
TAK1	Quinase 1 ativada pelo fator de crescimento transformador beta
TBST	Solução salina tamponada com TRIS
TGF beta	Fator de crescimento transformador beta
THP-1	Linhagem monocítica de leucemia humana
TIRAP	Molécula adaptadora associada a domínio TIR
TLR-4	Receptor 4 do tipo toll
TRAF6	Proteína adaptadora 6 associada ao fator de necrose tumoral
TG	Triglicérides
TNF	Fator de necrose tumoral
TRC	Transporte reverso de colesterol
UDP	Uridina difosfato
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
VCAM	Proteína celular de adesão vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias deletérias relacionadas à hiperglicemia.....	4
Figura 2.	Reação de glicação ou Maillard.....	6
Figura 3.	Ativação da via canônica do NFKB e convergência das vias do RAGE e TLR4.....	12
Figura 4.	Protocolo experimental.....	20
Figura 5.	Atividade da lactato desidrogenase (LDH) em células RAW 294.7 tratadas com albumina controle ou modificada por glicação avançada e expostas a LPS.....	24
Figura 6.	Persistência do efeito da albumina-AGE sobre a resposta inflamatória em macrófagos RAW-264.7.....	25
Figura 7.	Persistência do efeito da albumina-AGE, na presença de HDL, sobre a resposta inflamatória em macrófagos RAW-264.7.....	27
Figura 8.	Perfil temporal da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e efluxo de colesterol após tratamento de macrófagos com albumina-C ou AGE.....	28
Figura 9.	Conteúdo nuclear das proteínas p50 e p65.....	31

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1	Diabetes mellitus, complicações macrovasculares e produtos de glicação avançada.....	1
1.2	Produtos de glicação avançada.....	5
1.3	Glicação e transporte reverso do colesterol.....	7
1.4	Albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE), efluxo de colesterol e mecanismos moleculares associados a memória metabólica.....	8
1.5	Produtos de glicação avançada e fator nuclear kappa B.....	11
1.6	Modulação diferencial das subunidades p50 e p65.....	14
2.	Justificativa.....	16
3.	Objetivos.....	17
4.	Materiais e métodos.....	17
4.1	Obtenção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).....	17
4.2	Acetilação de LDL.....	18
4.3	Preparo da albumina glicada <i>in vitro</i>	18
4.4	Cultura de macrófagos da linhagem RAW-294.7.....	19
4.5	Teste de viabilidade celular.....	19
4.6	Determinação da persistência do efeito da albumina-AGE em macrófagos via ativação de NFKB.....	19
4.7	Determinação da expressão gênica de <i>Nfkb1</i> , <i>RelA</i> , <i>Il6</i> , <i>Tnf</i> , <i>Abca1</i> , <i>Tlr4</i> e <i>Ager</i> por RT-qPCR em macrófagos tratados com albumina-C ou AGE.....	20
4.8	Extração de proteínas nucleares para determinação de NFKB.....	22
4.9	Determinação do conteúdo de proteínas por western blot.....	22
4.10	Análise estatística.....	23
5.	Resultados.....	24
5.1	Viabilidade celular.....	24
5.2	Persistência do efeito da albumina glicada sobre a resposta inflamatória em macrófagos.....	24

6.	Discussão.....	34
7.	Conclusão.....	43
8.	Referências.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus, complicações macrovasculares e produtos de glicação avançada

O diabetes mellitus (DM) se refere a um grupo heterogêneo de doenças metabólicas que apresentam em comum a elevação da concentração plasmática de glicose, condição causada pela deficiência na secreção da insulina, na vigência ou não de resistência à ação deste hormônio. A Sociedade Brasileira de Diabetes (Rodacki *et al.*, 2021 – Diretriz da Sociedade Brasileira de Diabetes) classifica o DM, em: tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), gestacional, monogênico e iatrogênico, sendo os dois primeiros os mais prevalentes.

A doença cardiovascular (DCV) clinicamente representada, principalmente, pelo infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico, é uma complicação frequente do DM, e contribui como principal causa de morbimortalidade nesta população. Diversos componentes da síndrome metabólica bem como alterações bioquímicas diretamente resultantes da hiperglicemia favorecem o estabelecimento e a evolução da DCV (IDF, 2021).

A hiperglicemia é o principal fator etiopatogênico envolvido na gênese e evolução das complicações macro e microvasculares do DM (AN, *et al.*, 2021). Sua relação com as doenças cardiovasculares foi demonstrada nos clássicos estudos *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) e *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT), em indivíduos com DM2 e DM1, respectivamente. Neles, o controle rigoroso da glicemia foi fator protetor contra o desenvolvimento das DCV (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998; DCCT/EDIC Study Group, 2016).

O estudo *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC), uma continuação observacional do DCCT, reiterou a proteção conferida pela melhora metabólica em seguimento de 30 anos, e constatou que o grupo que adotou um controle glicêmico rigoroso (com mais aplicações de insulina ao longo do dia) apresentou uma menor incidência e mortalidade por eventos cardiovasculares em comparação ao grupo que realizou controle glicêmico convencional, mesmo após o término da intervenção e com a equiparação da hemoglobina glicada (DCCT/EDIC Study Group, 2016).

Em estudo prospectivo, Engerman e Kern (1987) realizaram experimentos em cães, observando o efeito de memória metabólica frente a retinopatia diabética. Os animais foram divididos em grupos controles não-diabéticos e tratados com aloxana para indução de diabetes, sendo acompanhados em controle glicêmico convencional (por 5 ou 2,5 anos) seguido de controle glicêmico rigoroso (por 5 ou 2,5 anos; com insulina administrada duas vezes ao dia). O estudo evidenciou que as lesões nos capilares da retina se desenvolveram no grupo que realizou controle glicêmico convencional por 2,5 anos mesmo após seguir por 2,5 anos de controle intensivo. Esses resultados demonstraram que a retinopatia se apresenta imediatamente quando em estado hiperglicêmico e também não regride imediatamente ao controle glicêmico adequado (ENGERMAN e KERN, 1987).

Posteriormente o mesmo foi observado em humanos no estudo *The Stockholm Diabetes Intervention Study* (SDIS) envolvendo indivíduos com DM1 dependentes de insulina e que apresentavam retinopatia não proliferativa. Esses indivíduos foram submetidos ao controle glicêmico convencional ou controle intensivo, e ao fim o estudo evidenciou-se que o controle intensivo foi mais eficaz na diminuição de eventos micro e macrovasculares (REICHARD *et al.*, 1991).

Em conjunto, as observações destes importantes estudos comprovaram que o controle glicêmico precoce é um fator importante na prevenção de complicações em longo prazo do DM. Além disso, estabeleceram o conceito de memória metabólica ou efeito legado, baseado na modificação de macromoléculas durante o período de desajustes no controle glicêmico e que se perpetua mesmo após a melhora metabólica (NATHAN *et al.*, 2005).

Os efeitos fisiopatológicos da hiperglicemia culminam no aumento do insulto oxidativo intracelular, apontado como elo para as complicações em longo prazo do DM. Eles são explicados pela ativação das seguintes vias: 1) via dos polióis; 2) via das hexosaminas; 3) via da proteína cinase C (PKC) e 4) formação dos produtos de glicação avançada (AGE) (figura 1) (BROWNLEE, 2001; GIACCO *et al.*, 2010; PAPACHRISTOFOROU, 2020).

O aumento do fluxo metabólico na via glicolítica e a sobrecarga na cadeia mitocondrial transportadora de elétrons condiciona o escape de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido (BROWNLEE, 2001). O aumento na atividade da enzima que favorece o reparo da quebra em fita única

do DNA - poliADP ribose polimerase (PARP) (EASTERDAY *et al.*, 2007; CHUNG *et al.*, 2003), protege o material genético contra o insulto oxidativo. Entretanto paralelamente, a PARP promove a poliribosilação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o que compromete sua função catalítica, reduzindo o fluxo na via glicolítica (BROWNLEE, 2001). Em decorrência, acumulam-se intermediários, como gliceraldeído-3-fosfato (G3P), que é desviado para a formação de metilglioxal (MGO), oxoaldeído que apresenta alta reatividade com macromoléculas intracelulares, especialmente proteínas, fosfatidiletanolamina, histonas e ácidos nucleicos, levando à sua modificação irreversível por glicação avançada (IHNAT *et al.*, 2007; GIACCO; BROWNLEE, 2010; DARENSKAYA *et al.*, 2021). A frutose gerada na via do sorbitol é mais reativa que a glicose, podendo contribuir também para a geração de AGE.

O acúmulo de G3P contribui para a maior síntese de diacilglicerol (DAG) e ativação da proteína cinase C (PKC), a qual aumenta 1) a atividade da nicotinamida adenina (NADPH oxidase) que acarreta maior produção de ROS, 2) a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a endotelina-1, ambos contribuindo para disfunção endotelial, 3) TGF-beta e PAI-1 e 4) ativação de NFkB que favorece vias inflamatórias (BESTERMAN *et al.*, 1986; SCIVITTARO *et al.*, 2000; IGHODARO, 2018).

Pela via dos polióis ocorre a metabolização da glicose pela aldose redutase (AR) com geração de sorbitol e frutose. Há consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), o que diminui poder redutor para ressíntese da glutatona, comprometendo, portanto, a geração de importante antioxidante intracelular. O aumento da razão NADH:NAD⁺, também contribui para maior geração de DAG e, conseqüentemente, ativação da PKC (DARLEY-USMAR *et al.*, 1995; REIS *et al.*, 2008).

A via das hexosaminas implica no metabolismo da frutose-6-fosfato. Esse processo envolve a atividade da enzima glucosamina-frutose-aminotransferase (GFAT), que converte a frutose-6-fosfato em glucosamina-6-fosfato, que posteriormente é transformada em uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) pela ação da UDP-N-acetilglucosamina sintase. O aumento desta via culmina no aumento do fator de crescimento transformante beta (TGF beta) e PAI-1 que são responsáveis pela oclusão capilar e vascular por meio da

proliferação da matriz de colágeno e espessamento da membrana basal (ROBERTSON, 2004; INOBUCHI et al., 2000; IGHODARO, 2018).

Todas estas vias incrementam o insulto oxidativo, o qual serve de base para perpetuar a formação dos AGE. Além disso, estresse oxidativo e glicoxidativo associam-se a alterações epigenéticas, que comprometem a expressão de genes e vinculam-se ao estabelecimento da memória metabólica (DARENSKAYA *et al.*, 2021).

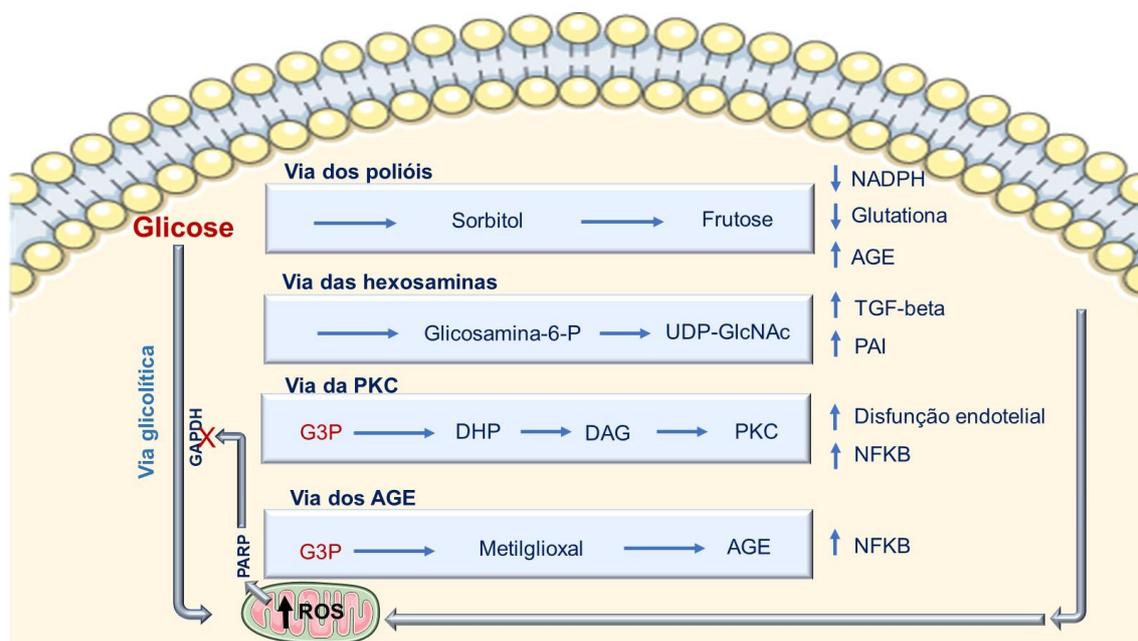


Figura 1. Vias deletérias relacionadas à hiperglicemia. Na hiperglicemia ocorre aumento do fluxo de glicose na via glicolítica, o que favorece o escape de ânion superóxido pela cadeia de transporte de elétrons. 1) Pela via dos polióis, há geração de sorbitol e frutose e redução de defesas antioxidantes; 2) por meio da via das hexosaminas, há indução da expressão do fator de crescimento transformante beta (TGF-beta) e do inibidor do ativador de plasminogênio 1; 3) A síntese de diacilglicerol, por meio da conversão de G3P, promove ativação da proteína cinase C (PKC), relacionada à disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo; 4) A consequente ativação da poli ADP-ribose polimerase (PARP) reduz a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, diminuindo o fluxo metabólico na glicólise e desviando intermediários para a síntese de metilglioxal (MGO), com rápida geração de produtos de glicação avançada (AGE) que altera irreversivelmente a estrutura e função de moléculas, ativando espécies reativas de oxigênio e o fator nuclear kappa B (NFKB). Adaptado de MATOBA *et al.*, 2020.

1.2 Produtos de Glicação Avançada

Os AGE são produtos finais da reação covalente não-enzimática (figura 2) entre a glicose, outros monossacarídeos ou oxoaldeídos com a porção amino terminal ou resíduos de lisina e arginina da cadeia polipeptídica. A reação se inicia com a formação de um produto instável, cuja constante de formação encontra-se em equilíbrio com a de dissociação, denominado Base de Schiff (BARLOVIC *et al.*, 2011; VISTOLI *et al.*, 2013; VLASSARA *et al.*, 2014), o qual pode progredir frente à descompensação glicêmica prolongada para um produto mais instável, denominado de Produto Amadori (frutosil-lisina). Por meio de rearranjos inter e intramoleculares da base de Schiff e do produto Amadori formam-se oxoaldeídos reativos (MGO, glioxal, glicolaldeído e 3-dexiglicosona) que propagam a reação de modo irreversível, com a formação dos AGE (carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, dímeros de glioxal e metilglioxal, pirralina, glicosepane, hidroimidazolonas, pentosidina e furosina).

Os oxoaldeídos encontram-se elevados no DM, especialmente no período pós-prandial, modificando rapidamente a estrutura de proteínas de meia-vida curta ou média. Isto ocorre devido à rápida reatividade destes compostos, o que desvincula a reação de glicação apenas às proteínas de meia-vida longa (LAPOLLA *et al.*, 2003; BEISSWENGER *et al.*, 2001, 2005; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2008; ODANI *et al.*, 1999). Os oxoaldeídos também se encontram elevados em reações inflamatórias, doença renal crônica e outras situações de estresse oxidativo, como a dislipidemia (HANSSEN *et al.*, 2018).

Além da hiperglicemia, fontes exógenas também contribuem para o *pool* de AGE corpóreo. As fontes exógenas de AGE, advém do tabaco e de alimentos preparados em alta temperatura em cocção a seco, principalmente aqueles enriquecidos em gorduras (CERAMI *et al.*, 1997; TWARDA-CLAPA *et al.*, 2022). Considerando-se o consumo elevado de alimentos processados e enriquecidos em AGE, e a capacidade do organismo em absorvê-los e transportá-los em associação à albumina e lipoproteínas, é crescente a preocupação da dieta como fonte extra de AGE e seus efeitos adversos sobre a saúde humana (TWARDA-CLAPA *et al.*, 2022; BAYNES, 2007; KOSCHINSKY *et al.*, 1997).

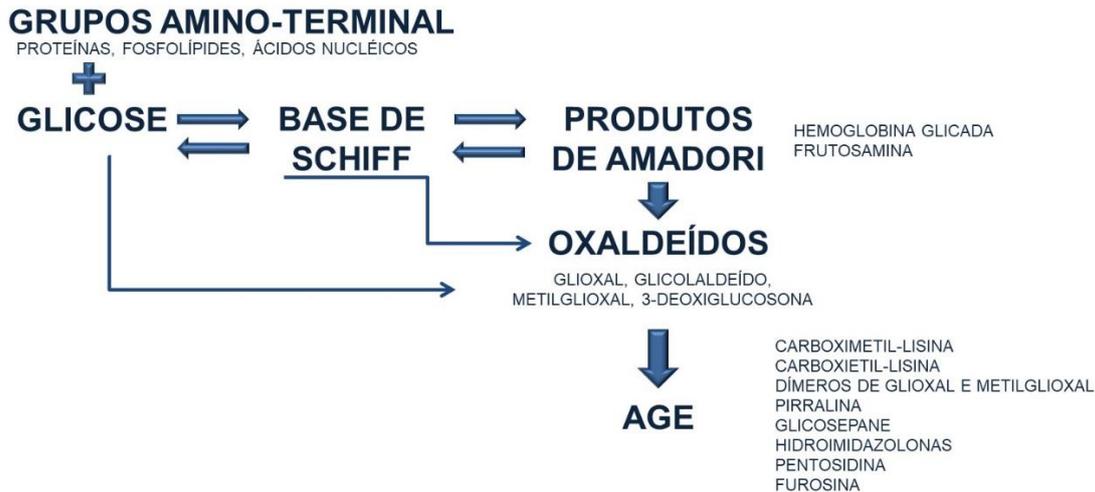


Figura 2. Reação de glicação ou Maillard. A reação de glicação ocorre pela reação não enzimática entre a glicose e o grupo amino-terminal de proteínas, fosfolípides e ácidos nucleicos que dão origem a uma reação reversível com formação da base de Schiff, que após rearranjos moleculares poderão formar produtos de Amadori em uma reação também reversível. Os produtos Amadori também são conhecidos como produtos de glicação precoce, como a frutossamina e a hemoglobina glicada, bastante comuns clinicamente na avaliação do controle glicêmico. A auto oxidação da glicose e a degradação da base de Schiff e do produto Amadori, dão origem a compostos altamente reativos que são os oxaldeídos como o glicolaldeído, metilglicolaldeído e 3-deoxiglicose. Estes conduzem à rápida e irreversível formação dos produtos de glicação avançada (AGE), como a carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, dímeros de glicolaldeído e metilglicolaldeído, pirralina, glicosepane, hidroimidazolonas, pentosidina e furosina.

Os AGE comprometem a matriz extracelular, principalmente pela formação de entrecruzamentos proteicos. Além disso, modulam as funções celulares, por meio da interação com o receptor para AGE (RAGE) (GOLDIN *et al.*, 2006).

A ativação do eixo AGE-RAGE dispara uma via de sinalização intracelular que se inicia pela ativação de NADPH oxidase, com subsequente ativação do fator nuclear KB (NFkB), o qual modula positivamente a transcrição de genes inflamatórios, vinculados ao dano vascular (YEH *et al.*, 2001). Outros receptores celulares também são capazes de se ligar aos AGE, como o receptor 4 do tipo toll (TLR-4). Este receptor apresenta vias de sinalização que se cruzam com as do RAGE, potencializando a ação dos AGE, dos lipopolissacarídeos (LPS) e outras moléculas inflamatórias e padrões moleculares associados a patógenos (YAMAMOTO *et al.*, 2011; OHTSU *et al.*, 2017).

1.3 Glicação e transporte reverso de colesterol

A remoção de colesterol dos macrófagos da íntima arterial é a primeira etapa de um processo antiaterogênico denominado transporte reverso de colesterol (TRC). Nele, o excesso de colesterol das células periféricas é removido, graças à interação das apolipoproteínas A-1 (apoA-1) livres com o transportador cassete A1 de ligação ao ATP (ABCA-1; *ATP binding cassette transporter A1*), processo que leva a formação de pré-beta HDL ou HDL nascente.

O colesterol livre removido é, rapidamente, esterificado pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), com o acondicionamento do colesterol esterificado, mais hidrofóbico, no núcleo da partícula (FORTE *et al.*, 1995; WRÓBLEWSKA, 2011). Desta forma, geram-se partículas esféricas de HDL, classificadas por tamanho, em ordem crescente, como HDL₃ e HDL₂.

As HDL₂ removem o excesso de colesterol celular, juntamente com óxidos de colesterol, por meio da interação com o transportador cassete G1 de ligação ao ATP (ABCG-1; *ATP binding cassette transporter G1*). O colesterol esterificado do núcleo das HDL pode ser transferido para LDL, VLDL e quilomícrons (QM), por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) (OHASHI *et al.*, 2010). Isto favorece a remoção de colesterol pelo fígado graças à elevada expressão de receptores B-E que reconhecem as lipoproteínas ricas em apoB (VLDL, LDL e QM). Além disso, o colesterol esterificado da HDL₂ pode ser diretamente removido pelos receptores SR-B1 hepáticos.

No fígado, o colesterol livre pode ser eliminado na bile, diretamente ou após conversão em ácidos biliares (TOSHEKA *et al.*, 2017). A excreção fecal de colesterol e ácido biliares representa a última etapa do TRC e configura sua principal forma de eliminação corporal.

Alterações no metabolismo das lipoproteínas são observadas frente à modificação por AGE, em particular, as lipoproteínas quando glicadas se tornam um pior substrato para várias enzimas que participam da sua metabolização no compartimento plasmático, e as apolipoproteínas glicadas perdem sua capacidade de atuar como cofatores enzimáticos ou de serem reconhecidas por receptores celulares.

Além disso, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e densidade baixa (LDL) são captadas mais rapidamente por receptores *scavenger* e pelo

RAGE expressos em macrófagos, o que contribui para a retenção de colesterol na íntima arterial, a despeito de sua menor remoção pelos receptores do tipo B-E (WONG *et al.*, 2018). Por outro lado, as lipoproteínas de densidade alta (HDL) modificadas por AGE perdem a capacidade de remover colesterol celular e de inibir a oxidação e inflamação (GOMEZ ROSSO *et al.*, 2017).

A concentração e funcionalidade da apoA-1 e da partícula de HDL são determinantes para o efluxo de colesterol. Entretanto, outros componentes parecem modular a remoção de colesterol celular via ABCA-1, por regularem a expressão e/ou funcionalidade do ABCA-1. A exportação de colesterol celular via ABCA-1, vinculada à ativação de LXR/RXR, limita a resposta inflamatória por reduzir o conteúdo intracelular de óxidos de colesterol, o estresse oxidativo e vias de sinalização relacionadas à inflamação, mediadas por TLR, via NFKB (ITO *et al.*, 2015). De outro, lado, o estresse inflamatório parece modular distintamente as vias de efluxo, sendo relatados aumento e diminuição conteúdo de ABCA-1 após ativação de NFKB, variando de acordo com o tipo celular e injúria (BARANOVA *et al.*, 2002; GERBOD-GIANNONE *et al.*, 2006; KAPLAN *et al.*, 2002).

1.4 Albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE), efluxo de colesterol e mecanismos moleculares associados a memória metabólica

A albumina é a proteína mais abundante na circulação, totalizando cerca de 60% das proteínas plasmáticas. Por apresentar muitos resíduos de lisina em sua estrutura ela é muito suscetível à modificação por glicação (BELINSKAIA *et al.*, 2021; RABBANI *et al.*, 2019). Seus domínios hidrofóbicos apresentam grande afinidade por ácidos graxos, embora a modificação por glicação avançada reduza sua capacidade de transportar ácidos graxos, enquanto aumenta sua ligação ao colesterol (ZHAO; MARCEL, 1996; LEE; MCMENAMY 1980; HENNING *et al.*, 2022).

A albumina-AGE é avidamente captada por macrófagos, induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio por meio da ativação da NADPH oxidase e sistema mitocondrial (DE SOUZA PINTO *et al.*, 2012). Este insulto, vincula-se ao estabelecimento de estresse de retículo endoplasmático, caracterizado pelo aumento da expressão de proteínas relacionadas à via de

proteínas mal enoveladas, como as chaperonas Grp78 e 94, ATF-6, eIF2alfa e CHOP (CASTILHO *et al.*, 2012).

Além disso, a albumina-AGE torna os macrófagos mais sensíveis a agentes inflamatórios clássicos, como calgranulinas e LPS, promovendo maior secreção de citocinas inflamatórias (OKUDA *et al.*, 2012). Estresse oxidativo, inflamatório e de retículo endoplasmático vinculam-se diretamente à redução do conteúdo proteico do receptor ABCA-1 em macrófagos expostos à albumina-AGE. Isto, em última instância, reduz drasticamente a remoção de colesterol celular pelas apoA-1 e HDL, mesmo na vigência de concentrações suficientes destas partículas aceptoras e da estimulação da expressão gênica de ABCA-1 por AMP cíclico ou agonistas de LXR. Estas observações levam ao conceito de que no DM, ou em outras condições onde prevaleça o estresse carbonila e a geração de AGE, independentemente das concentrações séricas e da funcionalidade da apoA-1 ou HDL, a hiperglicemia reduz a concentração do receptor de HDL, induzindo acúmulo intracelular de colesterol e seus derivados oxigenados, em particular óxidos de colesterol tóxicos que se vinculam ao agravamento da lesão aterosclerótica e eventos de ruptura da mesma.

O isolamento de albumina sérica de indivíduos portadores de DM, com controle glicêmico inadequado, evidenciou maior quantidade de AGE, notadamente, carboximetil-lisina, associada a esta proteína, em comparação àquela isolada de indivíduos saudáveis (DE SOUZA PINTO *et al.*, 2012; MACHADO-LIMA *et al.*, 2013). Semelhantemente ao descrito acima, observou-se menor remoção de colesterol celular e acúmulo intracelular de lípidos em macrófagos expostos à albumina dos indivíduos DM (DM1 e DM2), com alteração na expressão de genes envolvidos no fluxo de colesterol. Destaca-se a maior expressão de *Nox4* que codifica para a principal isoforma da NADPH oxidase em macrófagos (NOX-4) favorecendo o insulto oxidativo (MACHADO-LIMA *et al.*, 2013).

De outro lado, observou-se menor expressão de *Jak2* que codifica para a janus cinase 2, proteína que potencializa a ligação da apoA-1 ao receptor ABCA-1, impulsionando o efluxo de colesterol (MACHADO-LIMA *et al.*, 2013; MACHADO-LIMA *et al.*, 2015). Sendo assim, a albumina modificada *in vivo* por glicação avançada altera a expressão gênica, regulando negativamente o efluxo de colesterol. Em relação ao ABCA-1 não são observadas alterações na taxa de

transcrição gênica, embora a redução do conteúdo proteico seja diretamente resultante de sua maior degradação intracelular pelos sistemas proteasomal e lisossomal, independentemente de calpaínas de superfície. A melhora do controle glicêmico demonstrou-se capaz, quando comparadas à albumina isolada do mesmo indivíduo pré e pós adequação metabólica, de restabelecer o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol, com redução do conteúdo lipídico intracelular.

Demonstrando um efeito prolongado do insulto da albumina glicada, observou-se prejuízo na remoção de colesterol de macrófagos que persistiu mesmo após 8 h da retirada do insulto do meio de cultura. Esta mesma persistência de efeito é observada em relação à secreção de citocinas inflamatórias, a qual se mantém elevada por até 24 h, sugerindo a existência de um mecanismo de memória celular (MINANNI *et al.*, 2021).

De fato, a modificação de macromoléculas celulares por AGE é apontada como um dos mecanismos responsáveis pela memória metabólica ou efeito legado, descrito pelos estudos DCCT/EDIC e UKPDS. Juntamente com o estresse oxidativo e alterações epigenéticas, os AGE parecem contribuir para a incidência de complicações em longo prazo do DM previamente descompensado a despeito de sua compensação posterior (DCCT/EDIC, 2016; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998).

A modulação epigenética em células de linhagem mieloide, como monócitos e macrófagos, pode explicar a gênese de diversas complicações advindas do diabetes, como a retinopatia e a doença renal (CHEN *et al.*, 2020). Nesses tipos celulares foram observadas alterações devido a hiperglicemia transitória em estudo utilizando amostras de participantes do DCCT/EDIC, que evidenciou a presença de metilação em ilhas CPGs (Citosina-fosfato-guanina) de sequências de DNA associadas à hemoglobina glicada (CHEN *et al.*, 2020). Os monócitos e macrófagos, possuem o papel essencial de regular a resposta inflamatória, especialmente na via do NFkB, mas, essa mesma função pode causar danos por meio do aumento do estresse oxidativo e acúmulo destes em tecidos específicos (KOJIMA *et al.*, 2014).

Apesar do parâmetro utilizado para acompanhar o desbalanço da glicemia ser a hemoglobina glicada, que demonstra um valor referente de cerca de 3 meses na circulação, a albumina glicada tem sido descrita por alguns autores

como um parâmetro mais fidedigno ao analisar casos de DM, tendo em vista uma resposta imediata ao tratamento intensivo com insulina (TAKAHASHI *et al.*, 2007; INABA *et al.*, 2007).

1.5 Produtos de glicação avançada e fator nuclear kappa B

O NFkB consiste em uma família pequena de fatores de transcrição que regulam diversas funções celulares, especialmente relacionadas à função imunológica adaptativa e inata. Cinco proteínas estruturalmente relacionadas compõem esta família: NFkB1 ou p50, NFkB2 ou p52, RelA ou p65, RelB e c-Rel (BARNES *et al.*, 1997; KUMAR *et al.*, 2004).

No estado basal não-ativado, o NFkB encontra-se associado à família de proteínas citoplasmáticas inibitórias, IKB. A via canônica de ativação do NFkB, conhecida como via dependente de NEMO, envolve a sinalização por diferentes receptores de citocinas, mitógenos, fatores de crescimento e eixo AGE-RAGE. Nela, ocorre a fosforilação do IKB por um complexo de proteínas cinases IKK (IKKA e IKKB), particularmente da subunidade IKKB, que quando multimerizadas por NEMO facilita sinais transitórios que permitem subsequente degradação proteasomal da IKB por poliubiquitinação. Esse processo resulta na liberação do NFkB e rápida translocação nuclear, particularmente das subunidades que se heterodimerizam, *Nfkb1/RelA* (p50/p65) e *Nfkb1/c-Rel*, que se ligam às regiões promotoras gênicas. Este processo é determinante para a expressão de genes inflamatórios e para produção de citocinas e quimiocinas, estando sua ativação exacerbada vinculada a diversos processos fisiopatológicos (IWAI, 2012; MITCHELL *et al.*, 2016) (figura 3).

A ativação das IKK depende de sua fosforilação em resíduos de serina (Ser 177 e 181 na IKKB e Ser 176 e 180 na IKKA) o que muda sua conformação e torna a atividade cinase ativa. A via não-canônica, desvinculada de NEMO e dependente de NIK com fosforilação de IKKA é majoritariamente representada por RELB/p52 (NFkB2) (HINZ, 2014; COOPE *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2016).

A ativação da via do NFkB pode ocorrer de diferentes formas. Uma delas é diretamente através do eixo AGE-RAGE. Outra forma, é através de uma via dependente do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), que pode ser ativada tanto pelo eixo AGE-RAGE quanto pelo receptor TLR4. O TLR4 pode ativar essa

via mediante ligação de endotoxinas, como por exemplo, o LPS. A convergência dessas vias acaba por aumentar a translocação nuclear de NF κ B, o que amplifica ainda mais a resposta inflamatória (figura 3) (PRATNER, *et al.*, 2020; SARAGUCHI, M., 2011).

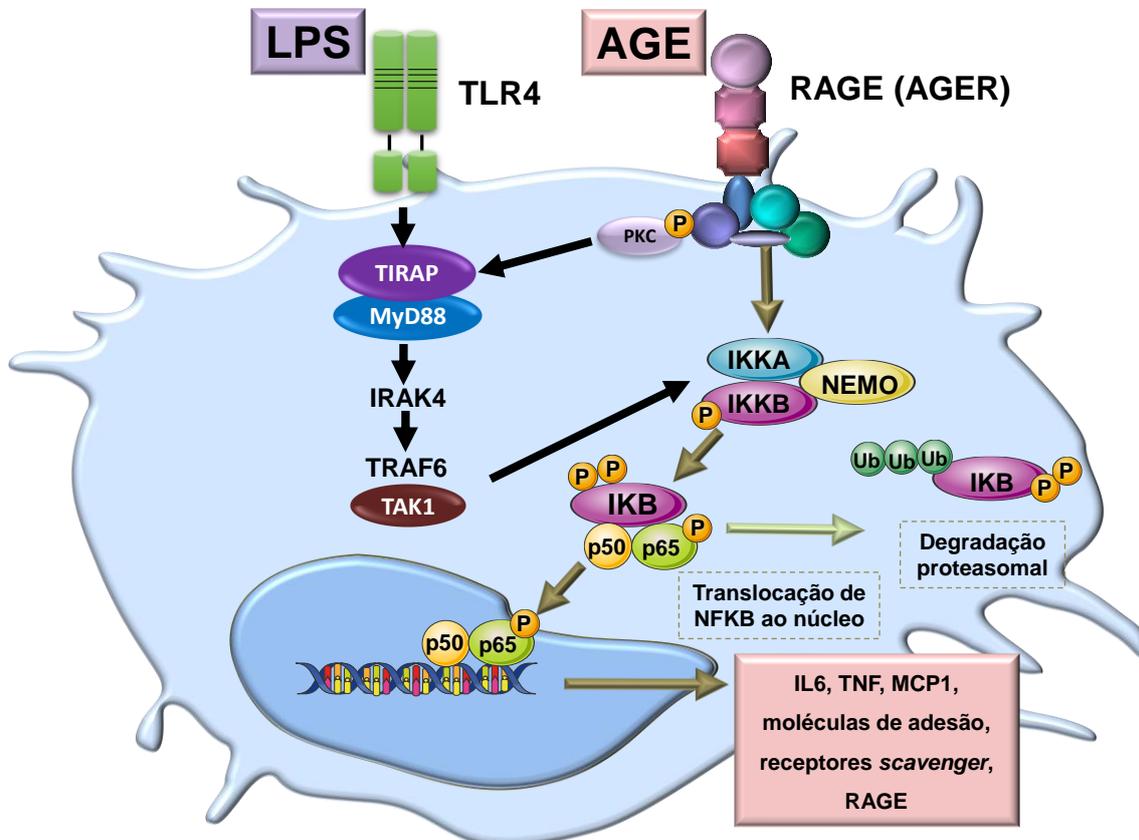


Figura 3. Ativação da via canônica do NF κ B e convergência das vias do RAGE e TLR4. A ativação canônica de NF κ B ocorre por meio da sinalização via RAGE ou TLR4, por AGE, citocinas, mitógenos, endotoxinas, entre outros. Ela se dá pela ativação da IKK α ou IKKB mediante fosforilação, as quais fosforilam a I κ B que se encontra ligada ao NF κ B (p50/p65) no citoplasma. A fosforilação de I κ B altera sua conformação o que favorece seu desligamento de p50/p65, com posterior degradação proteasomal. O heterodímero p50/p65 transloca-se ao núcleo, promovendo, entre outros efeitos, a ativação de genes relacionados à resposta inflamatória e dano vascular. Do lado direito da figura, pode-se visualizar a ativação da via do NF κ B diretamente via sinalização AGE-RAGE. Já do lado esquerdo pode-se visualizar a via sendo ativada por meio de um eixo dependente da molécula adaptadora MyD88, podendo acontecer tanto por RAGE como TLR4. A proteína MyD88 se torna ativa ao se ligar a proteína TIRAP, molécula também adaptadora, mas que possui um domínio citoplasmático TIR. TIRAP se liga a MyD88, que juntas convocam uma cinase associada a IL-1 (IRAK), que após sofrer autofosforilação, faz com que a proteína adaptadora associada a TNF (TRAF6) ative o complexo IKK da via do NF κ B. Quando a via dependente de MyD88 é ativada por RAGE, necessita da fosforilação anterior da proteína cinase C (PKC). Partes da figura foram obtidas do *Servier Medical Art* (<https://smart.servier.com>).

A sinalização desencadeada pelo eixo AGE-RAGE, tanto em modelos celulares quanto em animais de experimentação, favorece a translocação nuclear de NF κ B com consequente produção de moléculas inflamatórias, como TNF, IL-6, IL-1 β , CD36, MCP-1, que se vinculam ao dano vascular e as diversas complicações em longo prazo do DM (SURYAVANSHI e KULKARNI, 2017). Além disso, a atividade repressora de NF κ B sobre o gene *Sc12a4* que codifica para o transportador de glicose GLUT4, favorece o estabelecimento de resistência insulínica, comprometendo a homeostasia glicêmica em animais saudáveis tratados cronicamente com albumina-AGE e em músculo isolado (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2018).

A ativação sustentada de NF κ B e da resposta inflamatória é apontada como um dos mecanismos de base para a memória metabólica em ratos nos quais a normoglicemia foi atingida após período prolongado de hiperglicemia (CHAN *et al.*, 2010; KOWLURU, 2003; KOWLURU *et al.*, 2004; KOWLURU *et al.*, 2004; KOWLURU *et al.*, 2007).

Estudos *in vitro* evidenciaram a persistência da expressão, atividade de proteínas marcadoras de estresse oxidativo e inflamatório e mediadores de morte celular em células endoteliais e retinianas tratadas durante 14 dias com meio com alta concentração de glicose, seguindo-se a exposição por 7 dias a meio com baixa glicose (CERIELLO *et al.*, 2010; CERIELLO *et al.*, 2009). Na retina de ratos diabéticos, o controle glicêmico inadequado induziu o aumento de caspase-3, da atividade NF κ B e estresse oxidativo quando comparada a retinas de ratos saudáveis. Nos animais diabéticos, a reinstituição do bom controle glicêmico após 2 meses de mau controle foi capaz de reduzir esses parâmetros, o que não foi observado após de 6 meses prévios de descompensação (KOWLURU, 2003; KOWLURU *et al.*, 2004).

Estudo de Yao e colaboradores (2022), utilizando células epiteliais do cordão umbilical humano e microvasculares cardíacas de camundongos, também evidenciou os danos causados pela hiperglicemia transitória em complicações cardiovasculares. A hiperglicemia, seguida de normalização glicêmica, levou a um aumento da sinalização de NF κ B nessas células com a fosforilação da sua subunidade p65, desencadeando um *loop* inflamatório com o aumento da expressão de microRNA 27a-3p que regula negativamente o fator nuclear eritroide-2 (NRF-2). Por consequência, aumenta a geração de ROS,

levando novamente ao aumento do NFkB. Além disso, esse estudo mostrou que o aumento de ROS causado por essa memória celular também está relacionado à disfunção mitocondrial, aumentando a sinalização de TGF-beta e induzindo a transição epitélio mesenquimal, ocasionando assim danos cardiovasculares (YAO *et al.*, 2022).

Ademais, o aumento na geração de ROS em células epiteliais também mostrou ser responsável pelo aumento da metilação de histona (H3K4me1) na região promotora proximal do gene do NFkB (subunidade p65), que favorece a expressão de genes inflamatórios, como MCP1 e VCAM1. Essas alterações persistem por 6 dias após normalização da concentração de glicose no meio de cultura e, por meses, em animais diabéticos após recuperação da função das células beta pancreáticas. A redução da geração mitocondrial de ROS e da produção de superóxido induzida por MGO preveniram estas alterações epigenéticas e o aumento da transativação de NFkB. Em animais mantidos em curto prazo em hiperglicemia, ainda se observou, após controle metabólico adequado, elevação de metilação da histona (H3K4me1) e expressão de p65 em células endoteliais vasculares (EL-OSTA *et al.*, 2008).

1.6 Modulação diferencial das subunidades p50 e p65 do NFkB

Além do processamento clássico pela via canônica induzida por IKB alfa, a subunidade p50 de NFkB também pode ser translocada ao núcleo por meio da fosforilação de p105 nas serinas 927 e 932 pelo complexo IKK, com posterior ubiquitinação e proteólise (SALMERON *et al.*, 2001; LANG *et al.*, 2003). A via ativada por p105, que ancora p50 no citoplasma, está envolvida em respostas imunológicas e inflamatórias e, assim como na via canônica, é desencadeada por estímulos como TNF, IL-1 e LPS (BEINKE; LEY, 2004). O IKB alfa se liga efetivamente a p50 apenas quando está em heterodímero, enquanto a p105 é relacionada constitutivamente à subunidade p50, em homo ou heterodímero (LIOU *et al.*, 1992; BEINKE; LEY, 2004).

Em estudos realizados com camundongos nocaute para *Nfkb1* (p50/p105), Sha e colaboradores (1995) observaram que apesar de esses animais não apresentarem alterações no seu desenvolvimento, seu sistema imunológico era comprometido, visto que as células B desses animais eram mais susceptíveis a infecções por bactérias gram-positivas, possuindo baixo

reconhecimento ao LPS. Em contrapartida, tinham uma resistência maior a infecções por bactérias gram-negativas (SHA *et al.*, 1995). O mesmo não foi observado em nocautes para o gene *RelA* (p65), uma vez que os animais apresentaram morte intrauterina devido ao aumento da apoptose de hepatócitos (BEG *et al.*, 1995).

A utilização do nocaute para *Nfkb1* também foi importante para entender como este fator de transcrição pode atuar na resposta ao DM1. Ao tratar camundongos *Nfkb1*^{-/-} com estreptozotocina (STZ), Lamhamedi-Cherradi e colaboradores (2003), encontraram resistência na indução do diabetes, uma vez que os camundongos controles apresentaram uma taxa maior que 70% de desenvolvimento da doença com baixas doses de STZ, enquanto apenas 23% dos camundongos *Nfkb1*^{-/-} desenvolveram diabetes. Além disso, foram observadas alterações em respostas inflamatórias e imunológicas, dado que as células dendríticas destes animais tiveram maior morte celular por apoptose, produziram uma quantidade significativamente mais baixa de TNF e IL-12p40 (promotor de IL-12 importante na diferenciação de células Th-1) e seus macrófagos apresentaram baixa secreção de IL-12 e óxido nítrico, diminuindo também a expressão de STAT-1 nestas células. Esses resultados, em conjunto, demonstram a importância desse fator no desenvolvimento e complicações do DM (LAMHAMEDI-CHERRADI *et al.*, 2003).

A subunidade p65, codificada pelo gene *RelA* é o principal alvo de fosforilação por cinases que estão presentes tanto no citoplasma quanto no núcleo, podendo ser induzidas por vários estímulos. Quando fosforilada tem menor afinidade por IKB alfa no citoplasma, sendo rapidamente translocada ao núcleo. Os locais de fosfoceptores nessa subunidade são os domínios de homologia REL (que possuem cerca de 300 aminoácidos responsáveis pelas interações do DNA com IKB) e os domínios de transativação na região carboxi-terminal (GANCHI *et al.*, 1993; SCHMITZ *et al.*, 1995; CHEN; GREENE, 2004). Diferentemente de *RelA*, *c-Rel* e *RelB*, *p50* e *p52* contém domínios de ligação ao DNA mas não possuem domínios de transativação, e, como homodímeros podem funcionar como repressores da transcrição do NFKB, o que por vezes pode conferir uma atividade também anti-inflamatória (GHOSH *et al.*, 1998; CHEN; GREENE, 2004).

Assim como a fosforilação é um fator importante na regulação funcional do *RelA*, a acetilação é um mecanismo essencial para a função nuclear do NFKB. Apesar de serem proteínas não-histonas, as histonas acetiltransferases (HATs) também atuam nesses fatores de transcrição, modificando *RelA* nuclear que, após transcrito, pode ou não se associar a IKB alfa ao serem exportados do núcleo (CHEN *et al.*, 2001; CHEN; TINI; EVANS, 2001; STERNER; BERGER, 2000).

A subunidade p65 tem sido bastante estudada na compreensão do papel do NFKB no câncer, que dependendo do tipo pode ser responsável por diferentes desfechos. Em um estudo de Ricca e colaboradores (2001) foi avaliado o efeito da superexpressão de p65 em camundongos nude transfectados com uma linhagem celular de câncer de mama (MCF7 ADR). Os resultados demonstraram que após essa superexpressão houve diminuição da proliferação celular e indução de apoptose (com aumento na expressão de *Fas-L*, *Bcl-2*, *Bcl-x_L* e *Bax*) associada à produção de ROS e à clivagem do substrato da PARP (RICCA *et al.*, 2001).

Zhang e colaboradores (2016) evidenciaram que a maior expressão nuclear de *RelA* associa-se a um pior prognóstico em indivíduos em estágio iniciais de linfoma difuso de grandes células B. Em células representativas deste tipo de tumor, o silenciamento de *RelA* reduziu o crescimento e a sobrevivência celular, o que não foi efetivamente observado com o silenciamento de genes que codificam para outras subunidades do NFKB.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos em humanos, modelos animais e celulares demonstram que as complicações micro e macrovasculares do DM podem se desenvolver mesmo após o controle glicêmico inadequado ser normalizado. Esses achados sugerem a existência de uma memória celular para o estado de hiperglicemia, para a qual os AGE contribuem por alterarem a estrutura de várias macromoléculas, perpetuarem o estresse oxidativo e vincularem-se a alterações epigenéticas (SHEN *et al.*, 2020).

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a albumina-AGE prejudica a remoção do colesterol celular mediada por ABCA-1, resultando em maior estresse oxidativo, inflamatório e de retículo

endoplasmático. Uma descoberta interessante foi que esse efeito prejudicial persiste em macrófagos, mesmo após a remoção da albumina-AGE do meio de cultura, o que leva a um prejuízo duradouro na remoção de colesterol celular pela apoA-1 e HDL. Isso também resulta em uma sensibilização dos macrófagos à inflamação, levando à uma secreção sustentada de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF).

A ativação do eixo AGE-RAGE é necessária para o comprometimento na homeostasia lipídica e modelos com silenciamento gênico do *Ager* ou *knockout* para RAGE mostram-se resistentes aos efeitos da albumina-AGE (MACHADO-LIMA *et al.*, 2020). A sinalização elicitada pelo RAGE converge na via canônica de ativação de NFκB, embora a persistência do efeito da albumina-AGE sobre a expressão e o conteúdo nuclear de Nfκb1/p50 e RelA/p65 não tenham sido avaliados, bem como a expressão de outros moduladores celulares envolvidos na ativação de NFκB, IKKα e IKKβ, TLR4 e RAGE.

Sendo assim, a hipótese do presente estudo é que a ativação sustentada de subunidades de NFκB, refletida por sua maior permanência no compartimento nuclear e alteração na expressão de genes inflamatórios, possa perdurar nas células estimuladas com albumina-AGE e ser responsável pela sensibilização inflamatória de macrófagos ao LPS.

3. OBJETIVO

Avaliar, em macrófagos, o tempo de persistência da ação da albumina modificada por glicação avançada sobre:

- a) o conteúdo nuclear de das subunidades de NFκB, p50 e p65;
- b) a secreção de citocinas inflamatórias (TNF, IL-6 e IL-1 beta);
- c) a expressão de *Nfκb1*, *RelA*, *Ager*, *Tlr4*, *IL6*, *Tnf*, *Abca1*, *Abcg1* e *Jak-2*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de lipoproteínas de densidade baixa (LDL)

Após jejum de 12h, foi coletado sangue venoso e o plasma imediatamente obtido após centrifugação a 3000 rpm, 4°C. Os seguintes conservantes foram adicionados ao *pool* de plasma (μL/mL de plasma): 20 μL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%) (Merck, Darmstadt, Alemanha); 5 μL de

benzamidina (2 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 5 µL de aprotinina (0,5%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 0,5 µL de PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonila) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), seguindo-se do ajuste de densidade com brometo de potássio. A fração de LDL ($d = 1,019 - 1,063$ g/mL), foi isolada por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Havel *et al.*, 1955), seguindo-se de esterilização em filtro 0,22 µm. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

4.2 Acetilação de LDL

A LDL foi acetilada de acordo com o protocolo descrito por Basu *et al.* (1976). Em cada 16 mg de proteína LDL, foi acrescentado 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de cloreto de sódio (NaCl 0,15 M), sob constante agitação e imerso em gelo. Anidrido acético em pequenas e múltiplas quantidades foi adicionado por um período de 1 h, seguido de 30 min de agitação e em imersão em gelo. O volume de anidrido acético utilizado foi de 1,5 vezes a massa de proteína de LDL. A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra tampão fosfato (PBS) com EDTA (pH = 7,4) por 24 h a 4°C e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

4.3 Preparo da albumina glicada in vitro

Albumina bovina isenta em ácidos graxos (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) (40 mg) foi incubada com 10 mM de glicolaldeído (GAD; Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha) dissolvidos em tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L) com EDTA (pH = 7,4).

A albumina controle (C) foi preparada apenas na presença de PBS. As incubações foram realizadas sob condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37°C, com agitação por 4 dias. A seguir, as amostras foram dialisadas contra PBS e esterilizadas em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). A quantidade de endotoxina nas amostras de albumina foi determinada por meio do ensaio da Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Cape Cod, Falmouth, MA, EUA). Apenas foram utilizadas amostras cuja concentração de endotoxinas era inferior

a 50 pg/mL, limite associado ao potencial inflamatório da albumina-AGE em modelos celulares (Valencia *et al.*, 2004; Isoda *et al.*, 2007).

4.4 Cultura de macrófagos da linhagem RAW-264.7

Macrófagos da linhagem murina RAW-264.7 foram doados gentilmente pelo Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano do Laboratório de Emergências Clínicas (LIM-51) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O cultivo celular foi realizado em garrafas de 75 cm² com o meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 2,5g de glicose, 2,6 g/L de HEPES e 0,11 g/L de piruvato de sódio. Para os experimentos, as células foram descoladas com *scraper*, cultivadas em placas de 24 *wells* (8x10⁵ células/*well*) ou 6 *wells* (2x10⁶ células/*well*), e incubadas por um período de 24 h para adesão, com meio RPMI suplementado sem soro fetal bovino.

4.5 Teste de viabilidade celular

Após a incubação com albumina-C ou AGE, o meio de cultura celular foi separado para avaliar a liberação de lactato desidrogenase (LDH), um marcador de citotoxicidade celular (CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay, *Invitrogen*). O ensaio consiste na avaliação da atividade da enzima LDH, que é uma enzima citosólica presente em diversos tipos celulares e dessa forma é um indicador de citotoxicidade celular confiável. Danos à membrana celular liberam a LDH citosólica ao meio de cultura e o conteúdo de LDH liberado pode ser avaliado por uma reação enzimática na qual a LDH catalisa a conversão de lactato para piruvato por meio da redução de NAD⁺ para NADH. A oxidação de NADH resultante pela diaforase leva à redução do sal tetrazólico para um produto de *red formazan*. O *formazan* resultante pode ser medido por espectrofotometria. A formação de *formazan* é diretamente proporcional à quantidade de LDH liberada ao meio de cultura.

4.6 Determinação da persistência do efeito da albumina-AGE em macrófagos via ativação de NFκB

Para determinar se a persistência do efeito da albumina-C ou AGE na indução do estresse inflamatório vincula-se à ativação de vias dependentes de NFκB, células RAW foram enriquecidas em colesterol (pela incubação com LDL

acetilada; 50 µg/mL) e incubadas por 48h na presença de albumina-C ou AGE. Após lavagem cuidadosa com PBS/FAFA, as células foram mantidas apenas com RPMI/FAFA por 0h, 4h, 8h, 12h ou 24h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e desafiadas mediante incubação por mais 24h mediante incubação com lipopolissacarídeo (LPS sorotipo E. Coli, 1 µg/mL de meio – Sigma). O meio de cultura foi isolado e congelado (-80°C) para posterior análise do conteúdo das citocinas inflamatórias, TNF, IL-1beta e IL-6, por ELISA (R&D System – Duo Set, Minneapolis, EUA).

As células foram lavadas e utilizadas para determinação da expressão gênica e análise do conteúdo de proteínas, conforme descrito na figura 4.

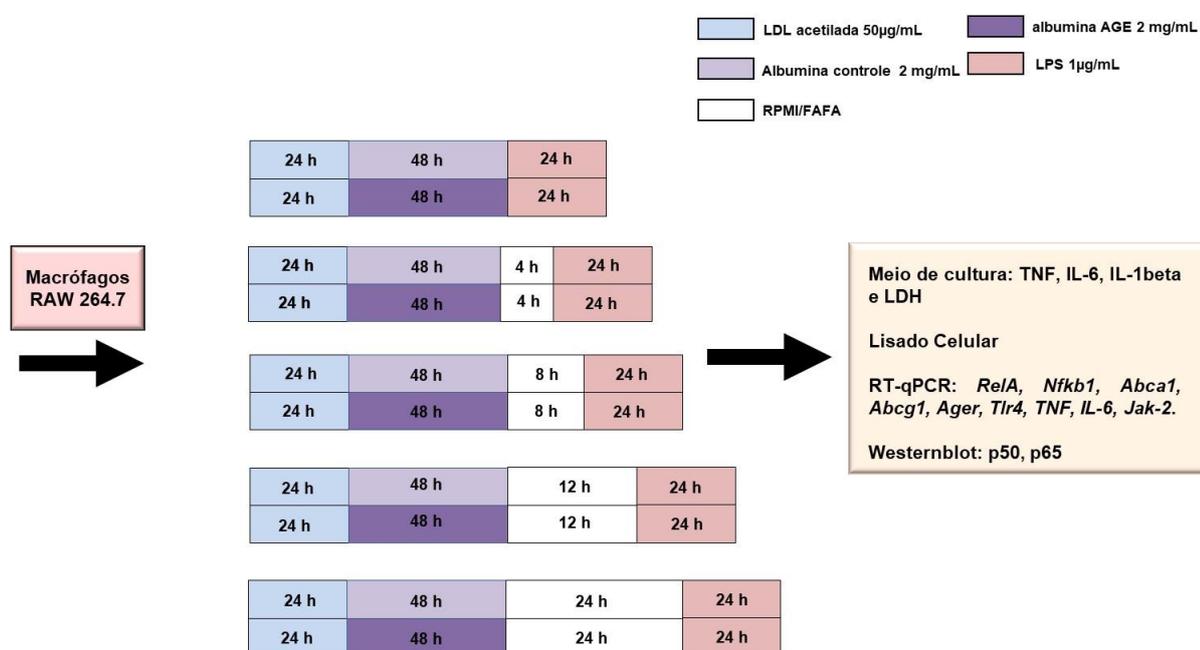


Figura 4. Protocolo experimental. Macrófagos das linhagens RAW foram incubados por 24h na presença de LDL acetilada e em seguida por 48h com albumina-controle ou albumina-AGE. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram mantidas apenas com RPMI/FAFA por 0 h, 4 h, 8 h, 12 h ou 24 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e tratadas, por mais 24h com LPS (1 µg/mL), como insulto inflamatório. A concentração de citocinas foi determinada no meio de cultura e a expressão gênica e conteúdo proteico, no lisado celular total ou extrato nuclear.

4.7 Determinação da expressão gênica de *Nfkb1*, *RelA*, *Il6*, *Tnf*, *Abca1*, *Tlr4* e *Ager* por RT-qPCR em macrófagos tratados com albumina-C ou AGE

O mRNA total dos macrófagos foi extraído, após os tratamentos descritos acima, utilizando o método Trizol® (Gibco BRL, Life Technologie Research

Products - Grand Island, NY., EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação das concentrações das amostras foi feita no equipamento Nanodrop (Spectrophotometer ND1000 - Thermo Scientific - Wilmington DE, EUA) e somente amostras com relação OD260/OD240 $\geq 1,8$ foram utilizadas. Para a síntese de cDNA a partir do RNA extraído foi utilizado o estojo comercial High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 400 ng de RNA. O cDNA sintetizado foi utilizado na análise de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA): *Abca1* (ATP binding cassette subfamily A member 1) (Mm00442646_m1), *Abcg1* (ATP binding cassette subfamily G member 1) (Mm00437390_m1), *Jak2* (Mm01208489_m1), *Tnf* (fator de necrose tumoral) (Mm00443258_m1), *Il6* (interleucina 6) (Mm00446190_m1), *Ager* (receptor para produtos de glicação avançada) (Mm00545815_m1), *Tlr4* (receptor 4 do tipo toll) (Mm00445273_m1), *RelA* (subunidade p65 do fator de transcrição NFkB) (Mm00501346_m1) e *Nfkb1* (subunidade p50 do fator de transcrição NFkB) (Mm00476361_m1). A expressão gênica relativa foi determinada pelo gene *Hprt* (Mm01545399_m1).

As reações de RT-qPCR foram realizadas no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems,) e os resultados foram analisados pelo software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems). Um gráfico colocando o valor de Ct (Threshold cycle, número do ciclo calculado no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção) de cada diluição de cDNA em função da diluição da amostra foi construído e a inclinação (“slope”) desta reta, utilizada para o cálculo de eficiência de amplificação conforme a fórmula: Eficiência de amplificação = $10(-1/SLOPE)$. A semelhança das eficiências de amplificação dos pares de *primers* dos genes-alvo e do gene controle interno permitiu a utilização do modelo matemático $\Delta\Delta CT$ (Yuan *et al.*, 2006). No caso das eficiências de amplificação que diferiram, foi utilizado o modelo matemático descrito por Pfaffl (2001).

4.8 Extração de proteínas nucleares para determinação de NFKB

O método de extração de proteínas nucleares foi adaptado de Andrews e Faller (1991). Após o tratamento das células, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS). A seguir, as células foram transferidas para tubos, lavadas novamente em PBS acrescido de DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM e inibidores de fosfatase (NaF 100 mM; pirofosfato de sódio decahidratado 10 mM e ortovanadato de sódio 10mM) e protease, seguindo-se de centrifugação a 2.000g, a 4° C, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, ressuspendido em tampão de lise (HEPES-KOH 10 mM pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM; KCl 10 mM; DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 5 µg/mL; aprotinina 15 µg/mL; NaF 100 mM; pirofosfato de sódio decahidratado 10 mM e ortovanadato de sódio 10 mM). As amostras foram incubadas em gelo por 15 min, seguindo-se a adição de Nonidet P-40 10%, com agitação vigorosa por 30 segundos e centrifugação de 11.000 g, a 4 °C por 20 min. O *pellet* foi ressuspendido em tampão de extração (HEPES-KOH 20 mM pH 7,9; MgCl₂ 1,5 mM; EDTA 0,25 mM; DTT 0,5 mM; NaCl 300 mM; glicerol 25%; PMSF 0,5 mM; leupeptina 5 µg/mL aprotinina 15 µg/mL) e incubado por 20 min em gelo. O extrato nuclear foi centrifugado a 11.000 g, a 4° C por 20 min e o sobrenadante recolhido, formando a fração enriquecida em proteínas nucleares que foram estocadas em freezer a -80° C.

4.9 Determinação do conteúdo de proteínas por western blot

Após a extração, a concentração de proteínas totais do extrato nuclear foi determinada pelo método de Bradford utilizando como reagente o corante “Coomassie brilliant blue” (Biorad Laboratories, Hercules, CA., EUA). As proteínas nucleares (10 µg) foram separadas por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Gel Electrophoresis*), de acordo com método desenvolvido por Laemmli, modificado por Garfin e colaboradores (1990), que envolve um sistema descontínuo de dois géis contíguos para o empacotamento (*stacking gel*) e separação (*resolving gel*) das amostras. Após eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose (Biorad Laboratories, Hercules, CA., EUA) overnight à 25mA, seguindo-se do bloqueio por meio de incubação com TBST (Tris Buffered Saline

Tween) contendo 5% de leite desnatado e Tween 0,1% por 2 h. As membranas foram lavadas com TBST com 0,1% de Tween (3 lavagens de 10 min) para retirar o excesso de leite. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários diluídos em TBST com 0,005% de Tween e 3% de leite desnatado (nas diluições indicadas pelos fabricantes): NFkB1 (1:1000) (Abcam) e RELA (1:1000) (Abcam) durante 19 h à 4°C e sob agitação em plataforma tipo gangorra (Platform varimix, Barnstead Thermolyne, Thermo Scientific, Waltham, MA., EUA). Após lavagem com TBST com 0,1% Tween (3 lavagens de 10 min), as membranas foram incubadas com anticorpo conjugado a peroxidase (Amersham ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey), Cytiva, Marlborough, EUA) (1:2000) por 1 h à 25°C. A visualização das bandas foi feita método de ECL (Enhanced chemiluminescence), que utiliza como substrato principalmente o luminol (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific Rockford, IL, EUA) e a captura de imagem realizada por fotodocumentador G:BOX (Syngene, Frederick, EUA).

As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria ótica (ImageQuant TL, Amersham Biosciences UK Limited), e normalizados pelas densitometrias óticas dos respectivos controles de carregamento (coloração por Ponceau S das respectivas bandas) (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995; ROMERO-CALVO et al., 2010).

Os resultados finais normalizados considerando-se a média dos valores controles como 1.

4.10 Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism (GraphPad Softwares, EUA). A normalidade das amostras foi analisada pelo teste de Shapiro Wilk e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de t de *Student* não- pareado, Mann- Whitney ou ANOVA de um fator. Foi considerado como significativa toda situação na qual o nível descritivo de significância for menor a 5% ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Viabilidade Celular

A liberação de lactato desidrogenase foi semelhante entre as células tratadas com albumina-C ou albumina-AGE. Embora tenha sido observada uma diminuição da atividade de LDH nos tempos 12h e 24h, os valores mantiveram-se semelhantes entre as duas condições experimentais (Figura 5).

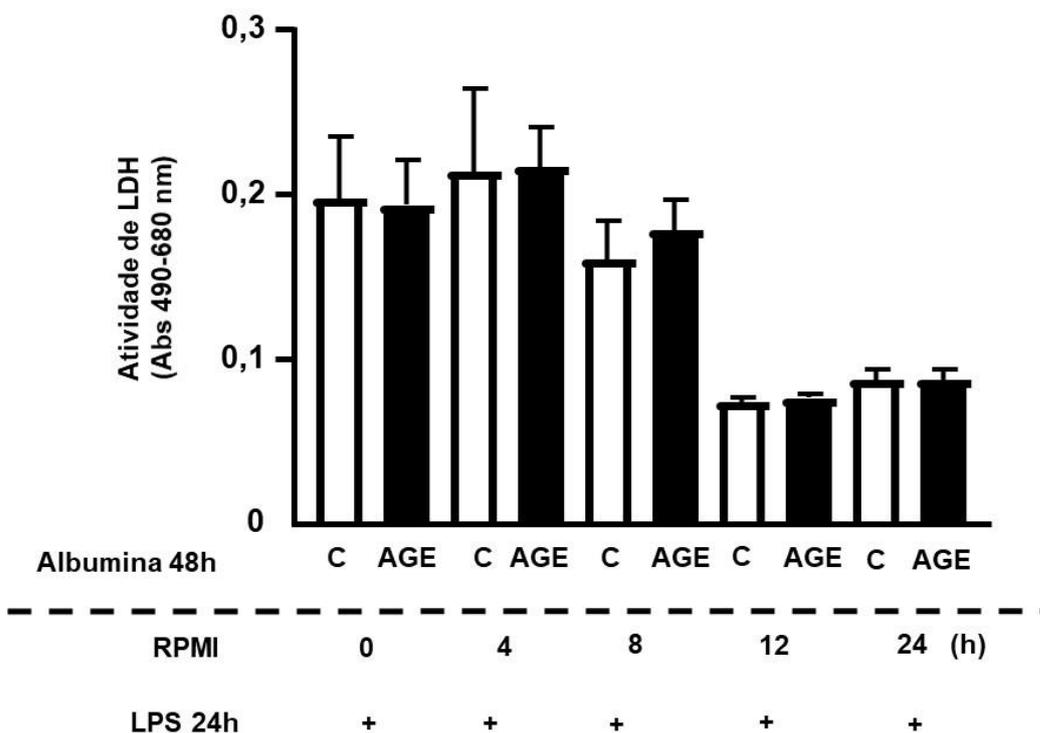
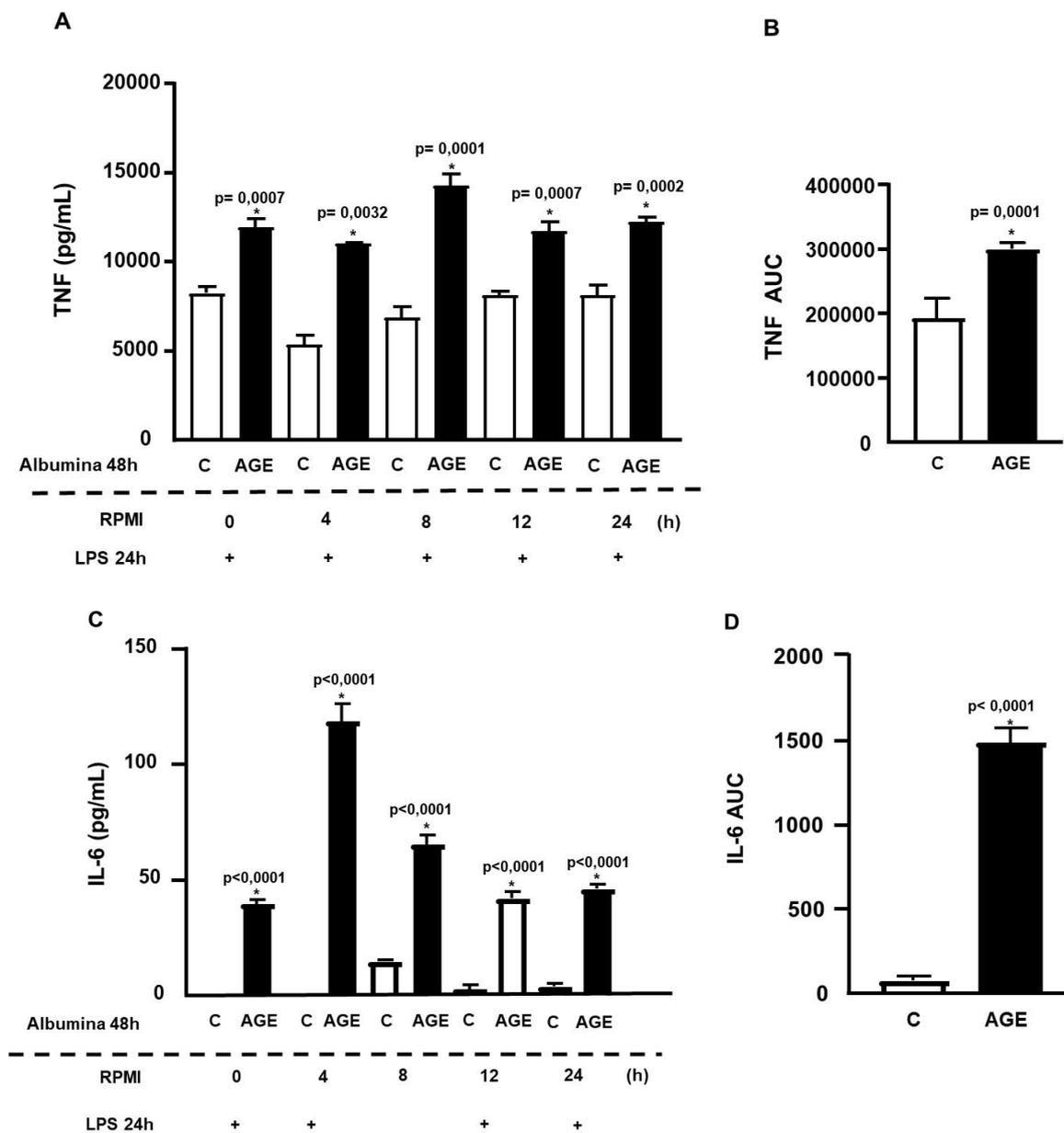


Figura 5- Atividade da lactato desidrogenase (LDH) em células RAW 294.7 tratadas com albumina controle ou modificada por glicação avançada e expostas a LPS. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados, por 24h, com LDL acetilada e, em seguida, com albuminas controle (C) ou AGE, por 48 h. Após diferentes intervalos de repouso em RPMI/FAFA, as células foram desafiadas com LPS, por 24h. Após a finalização dos tratamentos, o meio de cultura foi recolhido e utilizado para realização do ensaio colorimétrico. Os valores foram comparados por test t de *Student* e representados com média \pm EP (n = 6).

5.2 Persistência do efeito da albumina glicada sobre a resposta inflamatória em macrófagos

A figura 6 evidencia o papel da albumina-AGE na sensibilização imediata (tempo 0h) ao LPS, com maior secreção de TNF (figura 6, painel A), IL-6 (figura 6, painel C) e IL-1beta (figura 6, painel E). Além disso, observou-se um efeito persistente que foi sustentado por até 24 h em relação à secreção de TNF e IL-

6 e 12 h para a IL-1beta, com um incremento de área sobre a curva em 1,56, 16 e 5,2 vezes maior nas células incubadas com albumina-AGE em comparação à controle, respectivamente, para a secreção de TNF, IL-6 e IL-1beta (figura 6, painéis B, D e F).



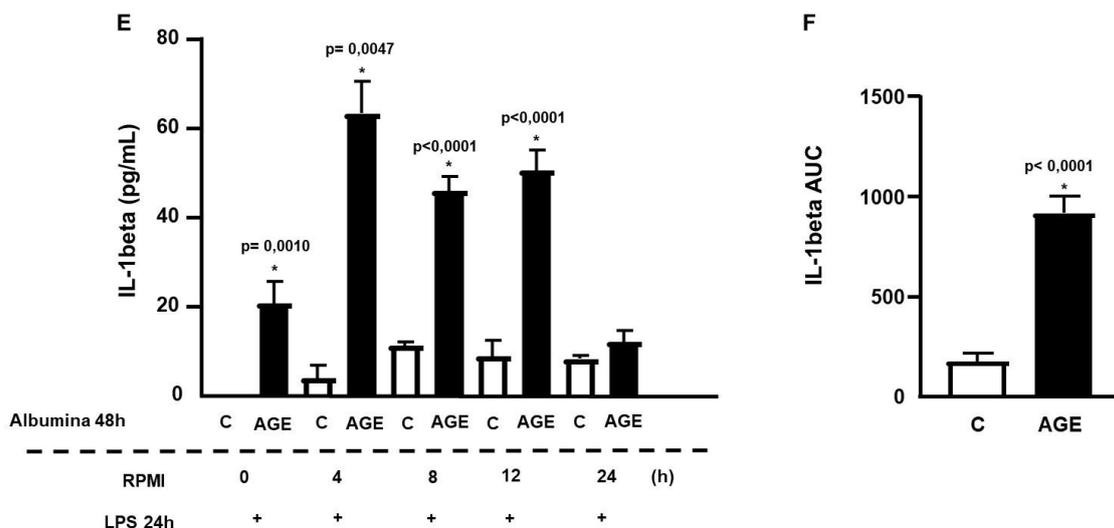


Figura 6- Persistência do efeito da albumina-AGE sobre a resposta inflamatória em macrófagos RAW-264.7. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados, por 24h, com LDL acetilada e, em seguida, com albumina-C ou albumina-AGE, por 48 h. Após diferentes intervalos de repouso em RPMI/FAFA, as células foram desafiadas com LPS, por 24h. As concentrações de TNF, IL-6 e IL-1 beta foram determinadas por ELISA (apresentadas respectivamente nos painéis A, B, C, D, E e F concentração e área sob a curva). Foi realizado teste de normalidade Shapiro Wilk e as comparações foram feitas pelo teste t de *Student* e os valores foram representados como média \pm DP (n = 6 para cada tempo de incubação).

Utilizando-se as mesmas condições experimentais, porém com acréscimo de HDL, juntamente com o tratamento com albumina-C e AGE, observou-se o mesmo perfil de liberação sustentada de citocinas. Sendo assim, nestas condições, a HDL não se contrapôs ao efeito da albumina-AGE na sensibilização prolongada de macrófagos à inflamação pelo estímulo com LPS, em até 24 h. (figura 7, painéis A e C). Houve um incremento de área sobre a curva em 4 e 3,6 vezes, respectivamente, para secreção de IL-6 e IL-1beta nas células incubadas com albumina-AGE em comparação à albumina- C (figura 7, painéis B e D).

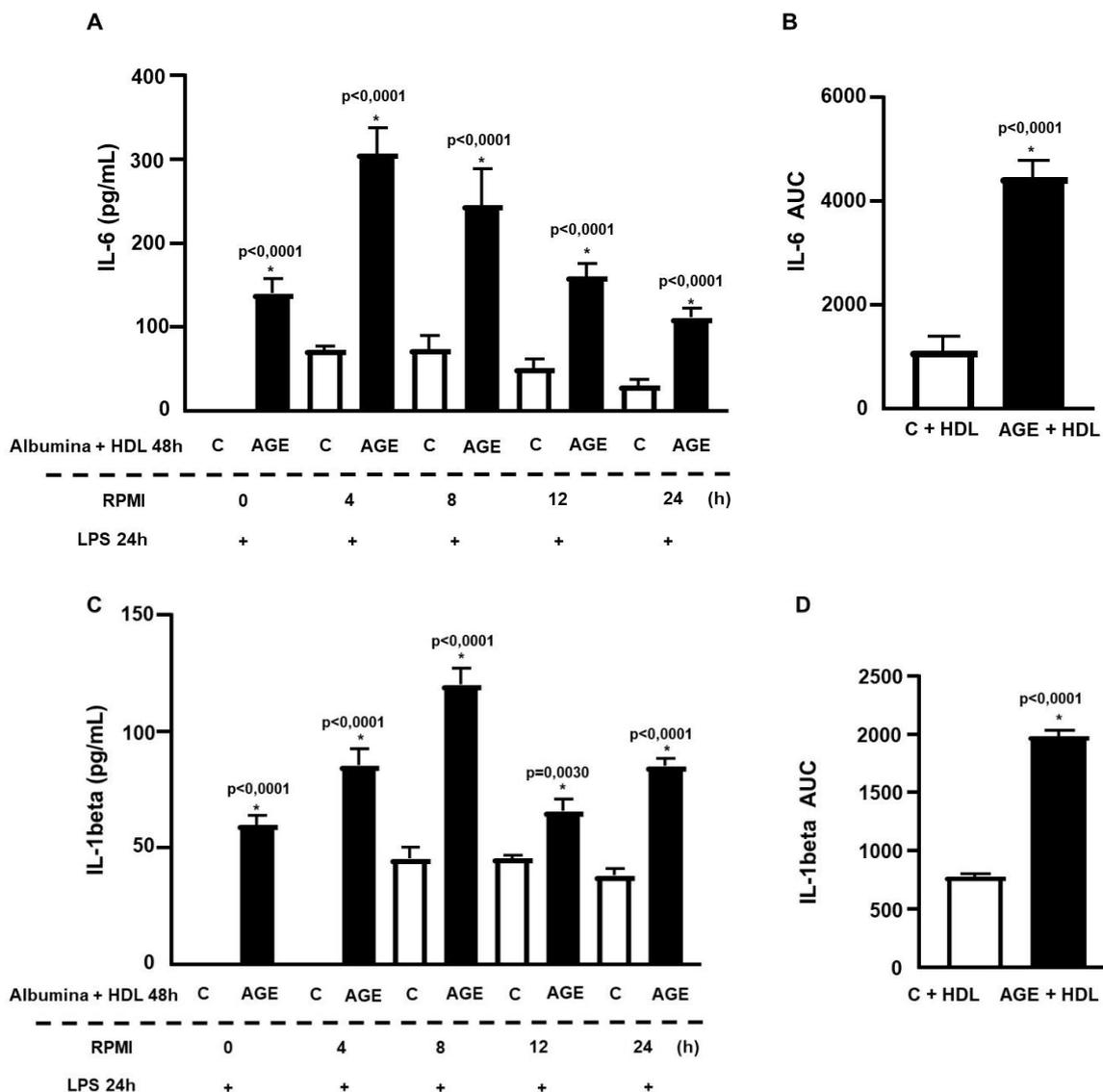
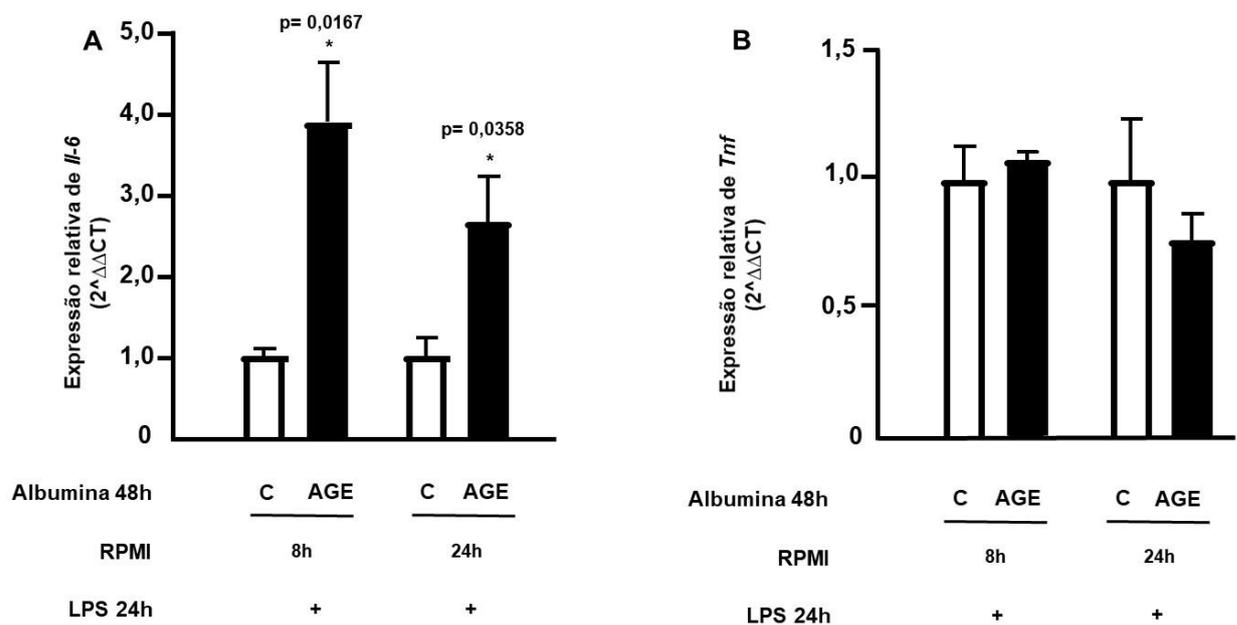


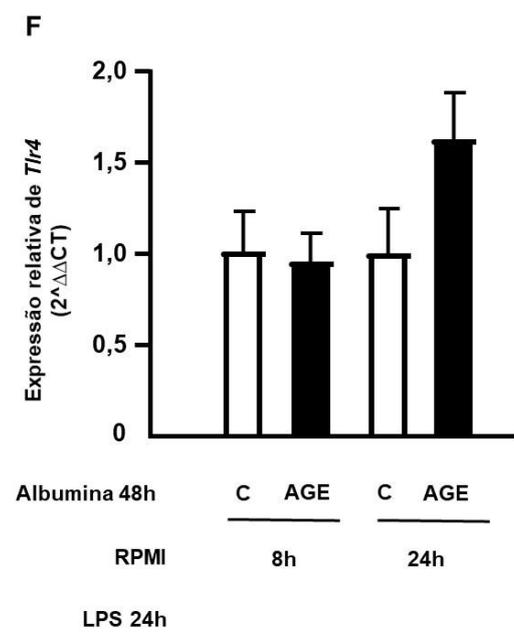
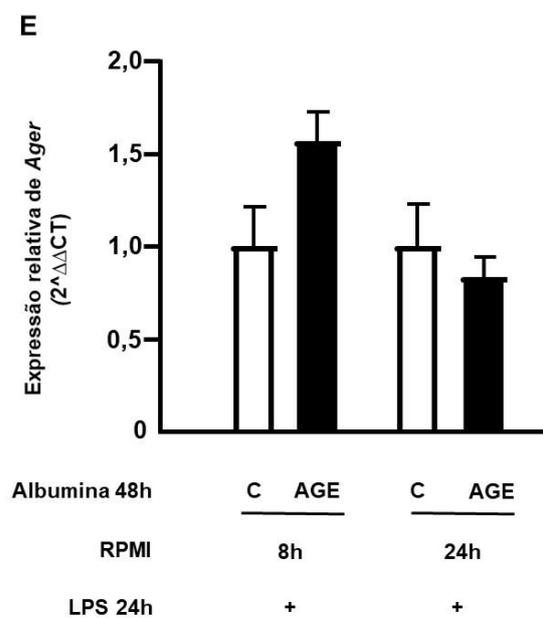
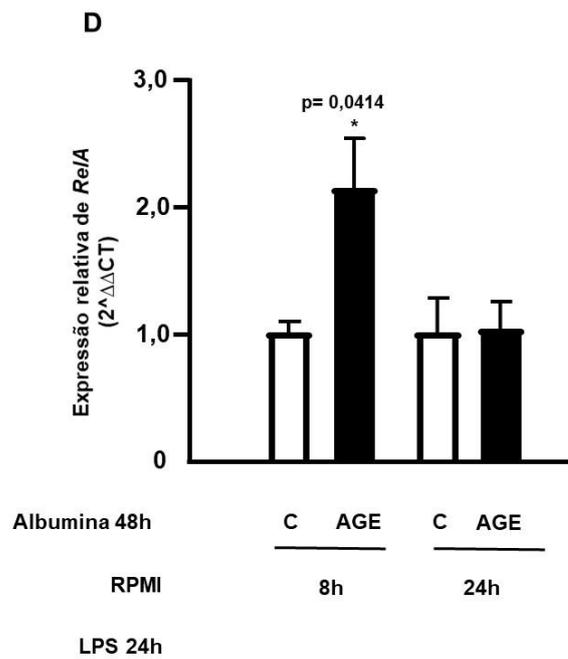
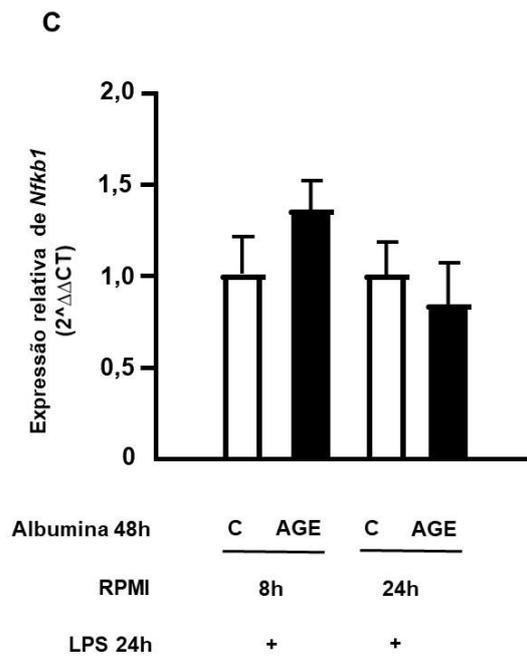
Figura 7- Persistência do efeito da albumina-AGE, na presença de HDL, sobre a resposta inflamatória em macrófagos RAW-264.7. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados, por 24h, com LDL acetilada e, em seguida, com albumina-C ou albumina-AGE, na presença de HDL (50 µg/mL), por 48 h. Após diferentes intervalos de repouso em RPMI/FAFA, as células foram desafiadas com LPS, por 24h. As concentrações de TNF, IL-6 e IL-1 beta foram determinadas por ELISA (apresentadas respectivamente nos painéis A, B, C, D, E e F concentração e área sob a curva). Foi realizado teste de normalidade Shapiro Wilk e as comparações foram feitas pelo teste t de *Student* e os valores foram representados como média ± DP (n = 6 para cada tempo de incubação).

A expressão de genes relacionados à inflamação foi determinada nos tempos 8h e 24h, após remoção de albumina-C ou AGE, seguida da incubação com LPS. Na figura 5, painel A, observa-se que a expressão de *Il6* permaneceu elevada após 8h e 24 h da remoção da albumina-AGE, seguindo-se desafio com LPS. A expressão de *Tnf*, entretanto, não foi alterada (figura 8, painel B).

O gene *Nfkb1* não apresentou diferença nos tempos de 8 e 24h (figura 8, painel C); Já *RelA* apresentou aumento da expressão em 8 h e normalização em 24 h (figura 2, painel D). *Ager* e *Tlr4* não apresentaram alteração no perfil de expressão nos tempos analisados (figura 8, painéis E e F).

Como os AGE já foram relacionados ao prejuízo no efluxo de colesterol, avaliou-se a expressão dos genes que codificam para os receptores ABCA-1 e ABCG-1 (figura 8, painéis G e H) que atuam no transporte reverso de colesterol e do gene que codifica a proteína JAK-2 (Figura 8, painel I) que modula a ligação de apoA-1 ao ABCA-1. Foi observado um aumento na expressão do gene *Abca1* (figura 8, painel G) no tempo de descanso de 24 h, na condição tratada previamente com albumina-AGE, sem diferença significativa entre os tratamentos durante os variados tempos de repouso na expressão do genes *Abcg1* (figura 8- painel H) e *Jak-2* (figura 8- painel I).





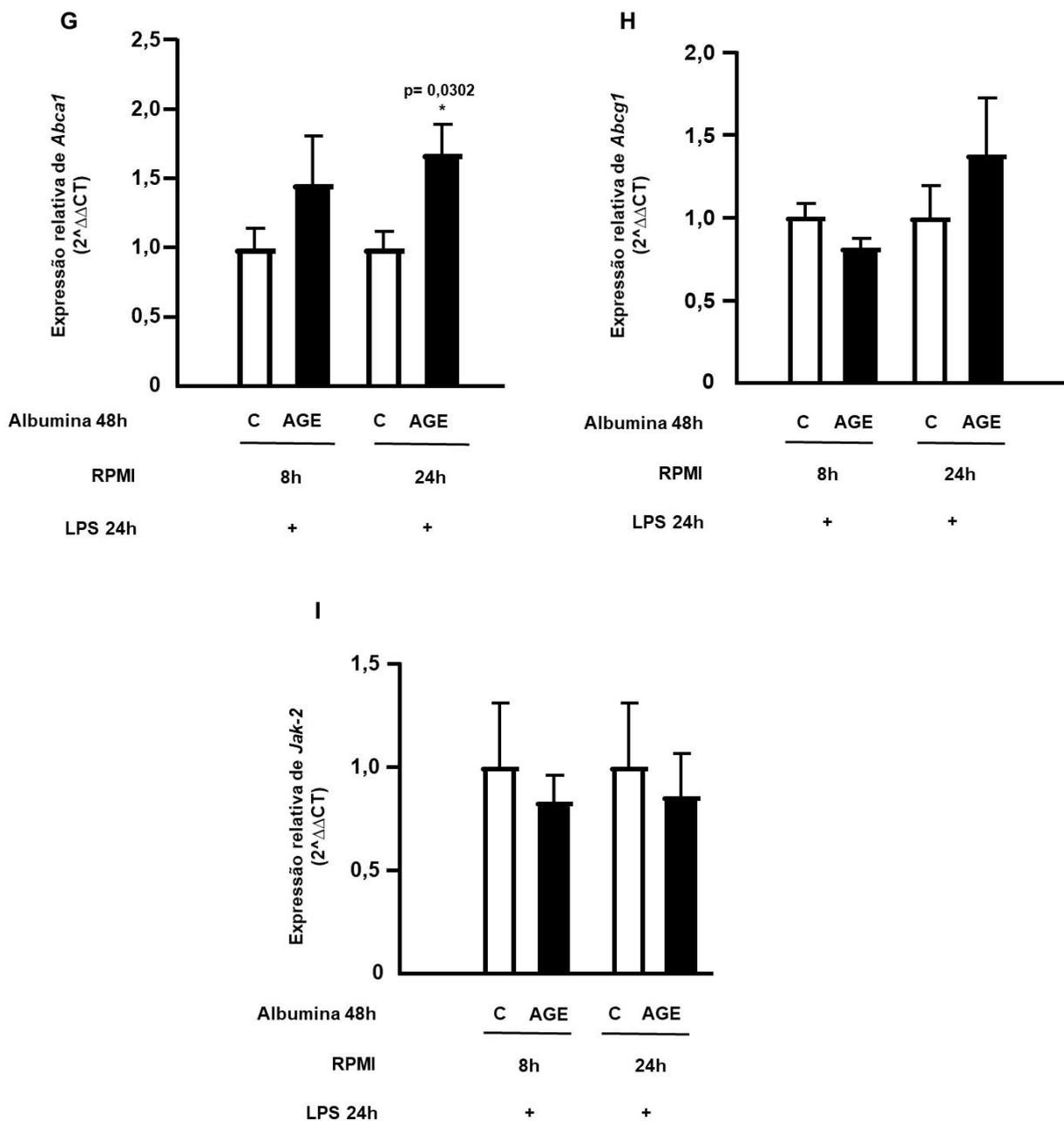
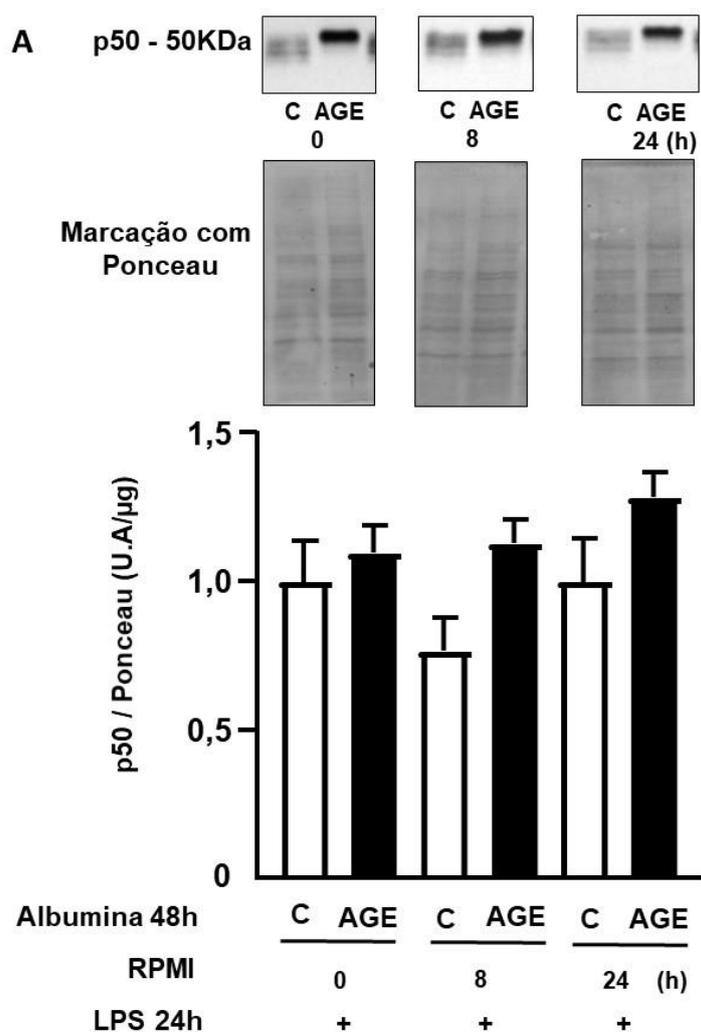
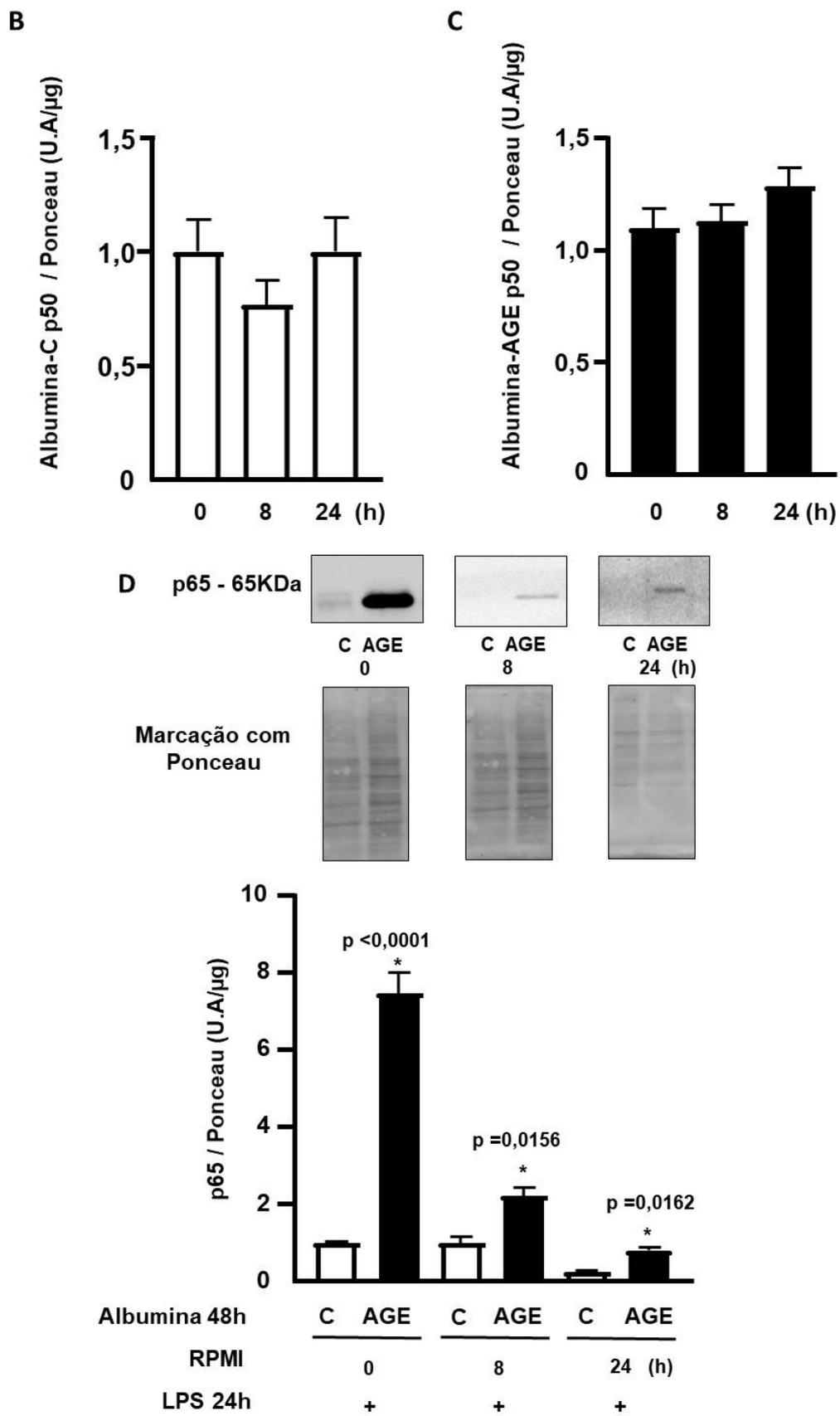


Figura 8 – Perfil temporal da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e efluxo de colesterol após tratamento de macrófagos com albumina-C ou AGE. Macrófagos RAW264.7 foram tratados, por 48 h, com albumina-C ou AGE (2mg/mL) e, após lavagem, mantidos ao longo do tempo apenas em meio de cultura contendo albumina isenta em ácidos graxos. A seguir, foram desafiados, por 24h, com LPS. A expressão gênica de *Il6* (A), *Tnf* (B), *Nfkb1* (C), *RelA* (D), *Ager* (E), *Tlr4* (F), *Abca1* (G), *Abcg1*(H) e *Jak2* (I) foi avaliada por RT-qPCR. As comparações foram realizadas pelo teste t de *Student*, com normalização dos dados pela condição controle de cada tempo; valores apresentados como média \pm DP (n= 5).

O conteúdo nuclear das proteínas p50 e p65 (subunidades do NFKB) foi determinado por western blot nos tempos 0h, 8h e 24h após remoção da

albumina-C ou AGE, seguida da incubação com LPS. O conteúdo nuclear de p50 não variou entre células tratadas com albumina-C ou AGE, durante os períodos citados (Figura 9, painéis A) e também entre os tempos considerando-se o mesmo tratamento (Figura 9, painéis B e C). O conteúdo nuclear de proteína p65 foi maior 2,9 vezes nas células tratadas com albumina-AGE em comparação àquelas expostas à albumina-C, permanecendo elevada até 24h (Figura 9, painel D). Em relação aos tempos, considerando o mesmo tratamento, as células tratadas albumina-C apresentaram decréscimo da proteína p65, apenas a partir de 24h (Figura 9, painel E). As células tratadas com albumina-AGE demonstraram um perfil decrescente ao longo do tempo, com menor concentração em 24h (Figura 9, painel F).





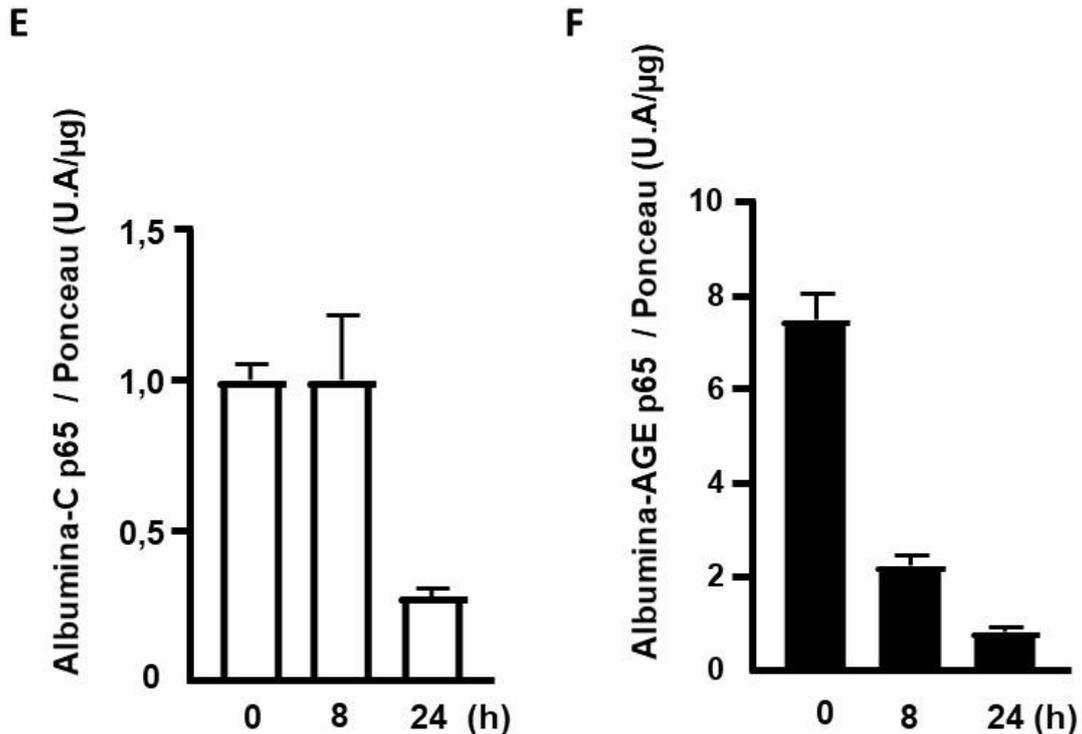


Figura 9 - Conteúdo nuclear das proteínas p50 e p65. Macrófagos RAW 264.7 foram tratados, por 48 h, com albumina-C ou AGE (2mg/mL) e, após lavagem, mantidos ao longo do tempo apenas em meio de cultura contendo albumina isenta em ácidos graxos. A seguir, foram desafiados, por 24h, com LPS. A determinação do conteúdo nuclear das proteínas p50 e p65 foi feita por western blot e a quantificação da intensidade das bandas determinada por densitometria ótica, com normalização pelos respectivos controles (coloração por Ponceau). Painéis A e E: proteínas p50 e p65 analisadas em cada tempo (0h, 8h ou 24h) comparando o tratamento com albumina-C ou AGE (teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido por t de *Student*, com os valores apresentados como média \pm EP; n = 5) Painéis B, C, E e F: comparações realizadas entre os diferentes tempos (0h, 8h ou 24h) sob o mesmo tratamento (albumina-C ou albumina-AGE) por teste de normalidade Shapiro Wilk, seguido por ANOVA de um fator (valores apresentados como média \pm EP; n=5).

6. DISCUSSÃO

O conceito de memória metabólica também chamado de efeito legado foi introduzido a partir de estudos como DCCT/EDIC e UKPDS, ajudando na elucidação da relação entre hiperglicemia e complicações crônicas do DM. Ele se baseia na modificação química de macromoléculas, por oxidação, glicação avançada e alterações epigenéticas, comprometendo sua funcionalidade em longo prazo, mesmo após melhora do controle glicêmico. De fato, estes estudos epidemiológicos evidenciaram que o aumento dos AGE durante eventos recorrentes de hiperglicemia e excursões glicêmicas contribuem para as complicações micro e macrovasculares (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998; DCCT/EDIC Study Group, 2016; NATAN *et al.*, 2005). Neste estudo, investigamos, em modelo de cultura celular, a memória de macrófagos ao insulto glicoxidativo pela incubação com albumina-AGE e a sensibilização à posterior estimulação inflamatória por LPS.

Os resultados evidenciaram a sensibilização exercida pelos AGE à secreção de TNF, IL-6 e IL-1 beta estimulada por LPS, a qual persistiu em longos intervalos de tempo (12 a 24h após a remoção do insulto glicoxidativo). Estes resultados vão ao encontro daqueles apresentados por Minanni e colaboradores (2021) que demonstraram essa mesma resposta em macrófagos derivados da medula óssea que apresentaram uma resposta inflamatória de até 8h na secreção aumentada das citocinas TNF e IL-6.

A maior produção de TNF e IL-6 relaciona-se à maior atividade do NFKB, já que no estado hiperglicêmico, a atividade deste fator de transcrição é intensificada, levando à secreção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão. Uma dessas citocinas é o TNF, que quando em circulação interage com seu receptor TNFR1, desencadeando uma cascata de sinalização que ativa a via canônica do NFKB e a via da proteína cinase ativadora de mitógeno (MAPK) por meio de poliubiquitinação. Nesta situação, o TNF sofre uma regulação positiva, podendo levar a apoptose celular e ao aumento do processo inflamatório (SURYAVANSHI e KULKARNI, 2017; VAN LOO e BERTRAND, 2022). Observou-se maior expressão de *RelA* no tempo de 8 h, a qual se vincula à maior secreção das citocinas que se mantiveram elevadas em tempos posteriores entre os macrófagos tratados com albumina-AGE.

A atividade pró-inflamatória da IL-6 vem sendo relacionada a uma gama de doenças, dentre elas a aterosclerose e complicações do diabetes. Um estudo realizado em células de Muller da retina humana, demonstrou a presença significativa dessa citocina em fluídos oculares derivados de uveíte refratária crônica e retinopatia diabética proliferativa em que a IL-1beta teve um papel fundamental na regulação positiva da IL-6, além da ativação da via de sinalização p38 MAPK/NFKB (MESQUIDA et al., 2014; YUUKI et al., 2001; KAUFFMANN et al., 1994; LIMB et al. 1991; LIU et al., 2015). Os resultados desse estudo demonstraram que após o tratamento das células de Muller com diferentes citocinas (IL-1beta, TNF, IL-6, VEGF e IFN-gama), glicose e pressão osmótica elevadas, apenas a IL-1beta, dentre as condições citadas, aumentou significativamente sua expressão, demonstrando também não existir uma regulação autócrina dessas citocinas, uma vez que a IL-1beta não teve sua secreção estimulada pela IL-6 (LIU et al., 2015).

Diversos estudos evidenciaram que a ativação do inflamassoma NLRP3 vincula-se a complicações crônicas do DM (WAN et al, 2022). Em particular, na aterosclerose, camundongos diabéticos quando tratados com inibidor de NLRP3 (MCC950), apresentaram diminuição nas lesões ateroscleróticas associadas à diminuição do conteúdo de monócitos e macrófagos, com menor expressão dos genes que codificam para IL-1beta, TNF, molécula de adesão intracelular (MCP-1) e molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) (SHARMA et al., 2020).

Os AGE por aumentarem o conteúdo de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente o eixo inflamatório de NFKB, bem como o acúmulo intracelular de colesterol, também atuam na ativação do inflamassoma. Desta forma, observa-se maior transcrição de NLRP3 que, por meio da proteína que contém um domínio de recrutamento de caspases (ASC), ativa a caspase-1, que cliva as pró-isoformas de IL-1beta e IL-18 em suas formas maduras. Estas citocinas, por sua vez, abrem poros na membrana celular, causando um desbalanço osmótico que culmina no rompimento da membrana, com morte celular por piroptose (BERTHELOOT et al., 2021; KORDES, M. et al., 2011).

No estudo de Perregaux e Gabel (1994) foi demonstrado que macrófagos peritoneais de camundongos, estimulados, por cerca de 30 min com LPS, exibiram um padrão de liberação de IL-1beta. As células apresentaram mudança na sua conformação, ficando numa forma arredondada, pelo desbalanço

osmótico que acontece na piroptose, seguindo-se a liberação de lactato desidrogenase (LDH), que indica morte celular. Apesar desse efeito ter sido visualizado, foi relatado que, na ausência de um estímulo secundário, pouca quantidade dessa citocina é processada proteoliticamente ao seu estado maduro (LOPEZ-CASTEJÓN; BROUGH, 2011; PERREGAUX; GABEL, 1994).

Em células do núcleo pulposo dos discos vertebrais foi demonstrado que os AGE ativam o inflamassoma NLRP3, provocando a produção de pró-IL-1beta, caspase-1 clivada e IL-1beta de forma tempo-dependente. Quanto maior o tempo de exposição aos AGE, maior foi a ativação do inflamassoma. Esta mesma ativação também foi observada em células epiteliais da córnea de camundongos diabéticos, onde o maior acúmulo de AGE no tecido epitelial da córnea, vinculou-se à maior expressão de NLRP3, caspase-1, ASC e gasdermina (GSDMD), quando comparado ao grupo controle. Os achados desse estudo reiteraram que os AGE são um estímulo significativo na manutenção da resposta celular inflamatória por NLRP3 (SONG et al, 2018; WAN, 2022).

Na presente investigação, em todos os tempos a IL-1beta se manteve elevada, o que pode estar relacionado com a ativação sustentada do inflamassoma, podendo, assim, explicar o efeito de inflamação persistente na memória metabólica, uma vez que essa citocina aumenta a expressão de moléculas de adesão celular, como, VCAM-1, ICAM-1 e MCP-1 em células endoteliais dos vasos, que são responsáveis por recrutar os macrófagos (LIBBY, 2017; CHEN et al., 2001; O' CARROLL et al., 2015; SHARMA et al., 2020).

A manutenção da resposta inflamatória em macrófagos, analisada pela expressão gênica e secreção de citocinas, tem sido bastante estudada a fim de compreender como ocorre a dinâmica de transcrição e estabilidade dos genes que medeiam e mantém a inflamação. Isto porque após a ativação máxima da transcrição, pode ocorrer um período de atraso ao período em que a concentração máxima de mRNA é observada. (HAO e BALTIMORE, 2009; RABANI et al., 2011; BHATT et al., 2012). Hao e Baltimore (2009) demonstraram como ocorre a cinética da expressão gênica dos mRNA de *Tnf*, *Il6* e repressores de NFkB em fibroblastos estimulados com TNF, a fim de compreender como ocorre a manutenção do processo inflamatório. Os mRNA de *Nfkbia* e *Nfkbie*, que transcrevem as proteínas citoplasmáticas inibitórias de IKKA (IkB alfa) e IKKB (NFkB Inhibitor Epsilon), apresentam rápido decaimento após estimulação

com TNF, com pico de produção após 0,5h e queda após 2h de estimulação. Esses dados podem justificar o aumento na transcrição de mRNA de *RelA*, visto que estes não estariam com sua transcrição inibida, corroborando nossos dados de manutenção da expressão desses genes com a secreção contínua de TNF.

Quanto à expressão de *Il6* foi mostrado que seu mRNA possui um pico de expressão em 0,5h, seguido de uma queda e rápida recuperação após 2h, se mantendo constantemente alto, sendo condizente com nossos achados que demonstram um aumento crescente e manutenção da sua expressão em ambas as condições. Além disso, em células tratadas com LPS houve estabilização na cinética de produção de mRNA de *Tnf*, *Il-1beta* e *Nfkbia*, quando comparada a instabilidade evidenciada em células tratadas com TNF (HAO e BALTIMORE, 2009).

Ao avaliar o perfil de expressão de genes que codificam para o NFKB, nos tempos 0h, 8h e 24h, é importante considerar que, além da possível modulação deste fator de modo curso-temporal outras variáveis, incluindo alterações pós-transcricionais podem dificultar a análise (RABANI et al., 2011). Em relação aos genes *Abca1*, *Abcg1*, *Tlr4*, *Rage* e *Jak-2* que também foram avaliados na presente investigação, faz-se também necessária uma análise mais detalhada do conteúdo proteico, a fim de entender a dinâmica de transcrição e de formação dos receptores, citocinas e proteínas que atuaram na ativação do processo inflamatório.

Em células intestinais da linhagem Caco-2, Field e colaboradores (2010) observaram que, na presença de TNF, o efluxo de colesterol mediado por ABCA-1 é atenuado. Isto ocorre porque o TNF altera a expressão gênica de *Abca1*, além de favorecer maior taxa de degradação da proteína (FIELD *et al*, 2010). Os inibidores de NFKB (AICAR e metformina), por sua vez, atenuaram o efeito inibitório do TNF sobre a expressão de *Abca-1*. Em macrófagos, os resultados da ação do TNF e NFKB sobre a transcrição de *Abca1* ainda não está esclarecido, uma vez que houve o mesmo efeito de diminuição deste mRNA induzido por TNF em células da linhagem J774, o que não foi confirmado em macrófagos peritoneais (KHOVIDHUNKIT et al., 2003; GERBOD-GIANNONI, 2006; FIELD *et al.*, 2010).

Adicionalmente, Iborra e colaboradores (2018) mostraram que a albumina glicada captada pelo RAGE favorece a degradação do ABCA-1 pelo sistema

ubiquitina-proteassoma e lisossomal. Nesse estudo, foi avaliada a taxa de decaimento de ABCA-1, em macrófagos das linhagens J774 e THP-1, na presença de albumina-C ou AGE, demonstrando-se diminuição do conteúdo proteico de ABCA-1 em 20 a 30%, quando as células foram incubadas com albumina-AGE. Isto foi prevenido parcialmente por inibidores de proteassoma e lisossoma. Além disso, quando o RAGE foi silenciado em 54%, as células tratadas com albumina-AGE mantiveram o conteúdo de ABCA-1, evidenciando que o RAGE medeia as alterações na homeostase de lípidos induzidas pelos AGE (IBORRA *et al.*, 2018).

Em relação ao transportador ABCG-1, sua atividade também está atrelada ao efluxo de colesterol, principalmente em células que atuam na periferia, como os macrófagos. O efluxo por intermédio deste transportador favorece a exportação do excesso de colesterol celular e óxidos de colesterol para partículas de HDL₂. Além disso, quando o ABCA-1 tem sua atividade diminuída, o ABCG-1 pode auxiliar na compensação da exportação de lípidos celulares. Na presente investigação não foram encontradas alterações na expressão de *Abcg1*, podendo ser explicado por não haver diferença na quantidade de ABCA-1 intracelular e pelo fato de que, nem sempre, a quantidade de mRNA reflete o conteúdo proteico total (OHASHI *et al.*, 2010).

Ao incubar macrófagos RAW-294.7 com albumina bovina glicada numa concentração de 300 µg/mL por tempos de 15min, 30min e 60 min, Wu e colaboradores (2002) observaram elevação do conteúdo citosólico e nuclear da proteína p65 (subunidade do NFκB) por western blot e ensaios de mobilidade eletroforética. O tempo de 15 min resultou numa translocação acentuada da subunidade p65 do citosol para o núcleo, atingindo seu máximo em 30 min e decaindo em 60 min (WU *et al.*, 2002).

Semelhantemente, Lan e colaboradores (2015) demonstraram que os produtos de glicação avançada induzem apoptose em células endoteliais de ilhotas pancreáticas MS1 e a fosforilação de p65 nessas células de maneira dose-dependente. Nesse estudo foi avaliado o efeito dos AGE na viabilidade celular de MS1, assim como a expressão das proteínas capase-3 clivada e PARP, que estão envolvidas no processo de apoptose. Concentrações crescentes de AGE (25-200µg/mL) por 24h aumentaram a morte por apoptose e o conteúdo proteico de caspase-3 clivada e PARP. O conteúdo de p65 nuclear

total não foi alterado dentre as diferentes concentrações, porém o conteúdo do lisado celular total de p65 fosforilado aumentou a partir de 100µg/ mL.

No presente estudo, o conteúdo nuclear de p65 foi sustentado mesmo após 24h da remoção da albumina glicada do meio de cultura quando comparado ao controle, o que pode ser justificado pelo aumento da secreção de citocinas (TNF, IL-6 e IL-1beta) por meio da produção inicial de NFκB, que por fim pode ter sustentado sua produção por retroalimentação positiva, uma vez que a secreção dessas citocinas também contribuem para o aumento de NFκB intracelular. Além disso, o LPS também participa da ativação de diversas vias inflamatórias, contribuindo para produção de citocinas e aumento de receptores como RAGE e TLR4, colaborando com a sensibilização das células à albumina glicada nesse efeito de memória metabólica. Para entender de forma mais efetiva os mecanismos de ativação da via do NFκB na memória metabólica são necessários estudos adicionais para quantificar as proteínas fosforiladas (p50/p65) e compará-las com o conteúdo proteico total, para compreender o quanto dessas proteínas são formadas mesmo na ausência do estímulo dos AGE, além de avaliar sua subunidade inibitória IκB para entender como ocorre a ativação sustentada do NFκB.

O NFκB e, particularmente sua subunidade p65, podem ser ativados frente a diferentes estímulos que levam à translocação nuclear, mas seu papel pró-inflamatório dependerá de modificações pós-traducionais ou das histonas que regulam seus genes alvo, determinando assim a força e a duração da resposta transcricional desse fator (CHEN e GREENE, 2004). Uma das modificações pós-traducionais importantes é a fosforilação da subunidade p65, em resíduos de serina, pela atividade de diferentes cinases, sendo os principais estimuladores desse processo a IL-1, LPS, TNF, p53 e TAX (proteína codificada pelo vírus linfotrófico T humano-1) (ZHONG *et al.* 1997; ZHONG *et al.*, 2002; VERMEULEN *et al.*, 2003). Além disso, é importante citar que a fosforilação de RelA pode ocorrer de forma constitutiva em alguns tipos celulares, como observado em células endoteliais, porém, ainda não foi compreendido como a especificidade da fosforilação pode variar de acordo com o tipo celular e as cinases responsáveis por esse processo nos diferentes resíduos de serina (CHEN e GREENE, 2004).

Em relação ao bloqueio da via dos AGE para evitar o aumento da produção de NFκB, pode-se citar alguns fatores que estão relacionados com a modulação dessa resposta. Um desses fatores é a regulação do receptor RAGE, que além de estar envolvido na patogênese do diabetes ao se ligar aos AGE, também estão fortemente atrelados a complicações cardiovasculares, ao diminuir a capacidade dos macrófagos de remover colesterol devido ao aumento de marcadores inflamatórios, como MCP-1, VCAM-1, CCL2 e MMP, ocasionados pela captação de AGE e de LDL modificada por glicação avançada.

Ao avaliar o papel do RAGE na resposta angiogênica prejudicada devido ao aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Shoji e colaboradores (2006) utilizaram camundongos nocaute para *Ager* (que codifica o RAGE) com diabetes induzido por tratamento com STZ e camundongos não diabéticos. Não foi observada diferença na função vascular por VEGF em ambos os grupos, tendo em vista que em ambos a expressão desta proteína estava diminuída, sendo a alteração desta resposta celular vinculada a ativação do NFκB em células vasculares (SHOJI *et al.*, 2006; KOYAMA *et al.*, 2007).

Alguns estudos já têm demonstrado que a utilização de RAGE solúvel (sRAGE) pode diminuir a progressão da aterosclerose no diabetes, como uma estratégia frente a sinalização celular aumentada do receptor RAGE de forma a tornar-se um alvo competitivo, diminuindo assim a resposta a inflamação. Para confirmar esta hipótese, Bucciarelli e colaboradores (2002) trataram camundongos machos ApoE/null com STZ ou tampão citrato por 14 semanas, sendo alguns sacrificados nesse período e outros seguindo com tratamento uma vez ao dia com sRAGE até completarem 20 semanas de idade. Ao serem comparados com os animais de 14 semanas, os camundongos sRAGE tiveram a área e a complexidade da lesão vascular significativamente reduzidas em comparação aos de 14 semanas, demonstrando a capacidade do sRAGE em desacelerar a formação e estabilizar a lesão aterosclerótica (BUCCIARELLI *et al.*, 2002).

No intuito de observar este efeito em humanos, Al-Rifai e colaboradores (2015) estudaram em uma subamostra da coorte do estudo *Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study* como sRAGE atua na prevenção de complicações cardiovasculares, como a fibrilação atrial. Foram observadas associações entre baixas quantidades de sRAGE e aumento de marcadores inflamatórios, como

também com a fibrilação atrial, porém apenas antes dos ajustes a outros fatores de risco cardiovascular desta população. A falta de associação prospectiva de sRAGE com marcadores inflamatórios demonstra que este pode ser produzido apenas em resposta imediata à inflamação causada pelos AGE, podendo não refletir na diminuição da inflamação crônica da aterosclerose (AL-RIFAI *et al.*, 2015).

Atualmente, o medicamento mais utilizado no tratamento da resistência à insulina e que também atua impedindo a geração de AGE e favorecendo a destoxificação de oxoaldeídos, é a metformina. Por diminuir a ação dos AGE, reduz a inflamação causada pelo aumento do estresse oxidativo, declínio da disponibilidade de óxido nítrico, além das modificações causadas pela glicação nas lipoproteínas, auxiliando assim na redução de riscos cardiovasculares (DUTTA *et al.*, 2023). Em relação ao seu papel na regulação da atividade das lipoproteínas, a metformina ao diminuir os AGE, reduz o estresse oxidativo que pode levar a atividade disfuncional da paroxonase-1 (PON-1), responsável pela atividade antioxidante da HDL. Modificações nesta enzima levam à disfuncionalidade na HDL, que pode perder seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e de realizar o efluxo de colesterol (SORAN *et al.*, 2015; DUTTA *et al.*, 2023). Resultados preliminares desta presente investigação não foram capazes de evidenciar uma ação da HDL na proteção contra a sinalização persistente dos AGE na via inflamatória mediada pelo NFkB. Estudos adicionais com curva temporal e dose-resposta de HDL ainda são necessários para melhor elucidação.

Para entender o potencial anti-inflamatório da metformina nas complicações cardiovasculares relacionadas ao diabetes, Zhou e colaboradores (2016) avaliaram a capacidade deste medicamento em inibir a resposta inflamatória causada pelos AGE em macrófagos da medula óssea por meio da via da AMPK, suprimindo a via RAGE/NFkB. As células foram tratadas com 200 mg/L de AGE ou BSA por 24h na presença ou ausência de inibidores de RAGE e NFkB, em seguida foi medida a expressão gênica dos mRNA de IL-1beta, IL-6, TNF e IL-10. Os resultados demonstraram a capacidade da metformina de diminuir a expressão de todas as citocinas inflamatórias estudadas e aumentar a citocina anti-inflamatória IL-10, porém não inibindo completamente os efeitos

pró-inflamatórios dos AGE, constatando que esse pode atuar por via de outros receptores (ZHOU *et al.*, 2016).

Outras estratégias terapêuticas têm sido estudadas a fim de combater esta resposta inflamatória impedindo a ativação do inflamassoma, incluindo-se a utilização de anticorpos monoclonais, como o canacinumabe, que atua como inibidor da IL-1beta, interleucina que também regula a produção de IL-6. Utilizando a coorte do estudo CANTOS (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study*), Everett e colaboradores (2020) trataram cerca de 10 mil pacientes com placebo e diferentes doses de canacinumabe (50 mg, 150 mg ou 300 mg), uma vez a cada três meses, para entender como seriam os desfechos cardiovasculares com a redução da inflamação independentemente da regulação lipídica. Ao realizar a terapia a cada 3 meses e acompanhar os indivíduos por cerca de 3,7 anos, o estudo demonstrou se tratar de uma estratégia eficaz nos desfechos totais, sendo a maioria não fatal, trazendo a utilização de anticorpos como uma possível nova estratégia terapêutica frente a inflamação.

Na presente investigação, nossos achados embasam uma melhor compreensão das vias metabólicas e sinalização que favorecem o processo inflamatório persistente mediado pelos AGE, podendo nortear a busca e otimização de terapias de controle glicêmico e a prevenção da aterogênese e sua evolução.

7. CONCLUSÃO

1) Os produtos de glicação avançada sensibilizam macrófagos à estimulação inflamatória, promovida por LPS, favorecendo uma maior secreção de citocinas inflamatórias;

2) A sensibilização inflamatória promovida pela albumina-AGE é prolongada, permanecendo até 24h após a remoção da albumina-AGE do meio de cultura;

3) A secreção de IL-6, TNF e IL-1 beta, induzida pelo LPS, após tratamento com albumina-AGE evidencia a ativação de diferentes vias inflamatórias, incluindo o sistema inflamassoma;

4) A ativação prolongada do NFkB, evidenciada pela maior expressão de *RelA* e pelo maior conteúdo nuclear da subunidade p65, após, respectivamente, 8h e 24h de repouso das células na ausência de albumina-AGE, sustenta a memória metabólica induzida em macrófagos pelos produtos de glicação avançada.

8. REFERÊNCIAS

Advance collaborative group. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 2008; 358(24):2560–2572.

Al Rifai M, Schneider AL, Alonso A, Maruthur N, Parrinello CM, Astor BC, Hoogeveen RC, Soliman EZ, Chen LY, Ballantyne CM, Halushka MK, Selvin E. sRAGE, inflammation, and risk of atrial fibrillation: results from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Diabetes Complications*. 2015 Mar;29(2):180-5.

An J, Nichols GA, Qian L, Munis MA, Harrison TN, Li Z, Wei R, Weiss T, Rajpathak S, Reynolds K. Prevalence and incidence of microvascular and macrovascular complications over 15 years among patients with incident type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2021 Jan;9(1):e001847.

Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1991 May 11;19(9):2499.

Baranova I, Vishnyakova T, Bocharov A, Chen Z, Remaley AT, Stonik J, Eggerman TL, Patterson AP. Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. *Infect Immun*. 2002 Jun;70(6):2995-3003.

Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm KA. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Jul;121(2):43-55.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997 Apr 10;336(15):1066-71.

Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(9):3178–3182.

Bhatt DM, Pandya-Jones A, Tong AJ, Barozzi I, Lissner MM, Natoli G, Black DL, Smale ST. Transcript dynamics of proinflammatory genes revealed by sequence analysis of subcellular RNA fractions. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):279-90.

Baynes JW. Dietary ALEs are a risk to human health--NOT! *Mol Nutr Food Res*. 2007 Sep;51(9):1102-6.

Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Baltimore D. Constitutive NF-kappa B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I kappa B alpha-deficient mice. *Genes Dev*. 1995 Nov 15;9(22):2736-46.

Beinke S, Ley S. Functions of NF-kB1 and NF-kB2 in immune cell

biology. *Biochem J* 2004, 382: 393–409

Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood ME, Touchette AD, Szwegold BS. alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):726-32.

Beisswenger PJ, Drummond KS, Nelson RG, Howell SK, Szwegold BS, Mauer M. Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress. *Diabetes*. 2005 Nov;54(11):3274-81.

Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV. Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 25;22(19):10318.

Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. 2021 May;18(5):1106-1121. doi: 10.1038/s41423-020-00630-3. Epub 2021 Mar 30. PMID: 33785842; PMCID: PMC8008022.

Besterman JM, Duronio V, Cuatrecasas P. Rapid formation of diacylglycerol from phosphatidylcholine: a pathway for generation of a second messenger. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Sep;83(18):6785-9.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):813-20.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.

Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, Lu Y, Lalla E, Rong LL, Goova MT, Moser B, Kislinger T, Lee DC, Kashyap Y, Stern DM, Schmidt AM. RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. 2002 Nov 26;106(22):2827-35.

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005 Jun;34(3):597-601.

Castilho G, Okuda LS, Pinto RS, Iborra RT, Nakandakare ER, Santos CX, Laurindo FR, Passarelli M. ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycated albumin - reversal by a chemical chaperone. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Jul;44(7):1078-86.

Cerami C, Founds H, Nicholl I, Mitsuhashi T, Giordano D, Vanpatten S, Lee A, Al-Abed Y, Vlassara H, Bucala R, Cerami A. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13915-20.

Ceriello A, Ihnat MA. 'Glycaemic variability': a new therapeutic challenge in diabetes and the critical care setting. *Diabet Med*. 2010 Aug;27(8):862-7.

Ceriello A, Ihnat MA, Thorpe JE. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? *J Clin Endocrinol Metab.* 2009

Ceriello A, Zarich SW, Testa R. Lowering glucose to prevent adverse cardiovascular outcomes in a critical care setting. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Feb 3;53(5 Suppl):S9-13.

Chan PS, Kanwar M, Kowluru RA. Resistance of retinal inflammatory mediators to suppress after reinstatement of good glycemic control: novel mechanism for metabolic memory. *J Diabetes Complications.* 2010 Jan-Feb;24(1):55-63.

Chen H, Liu C, Sun S, Mei Y, Tong E. Cytokine-induced cell surface expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *J Tongji Med Univ* 2001;21:68–71

Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004 May;5(5):392-401.

Chen Z, Miao F, Braffett BH, Lachin JM, Zhang L, Wu X, Roshandel D, Carless M, Li XA, Tompkins JD, Kaddis JS, Riggs AD, Paterson AD; DCCT/EDIC Study Group; Natarajan R. DNA methylation mediates development of HbA1c-associated complications in type 1 diabetes. *Nat Metab.* 2020 Aug;2(8):744-762.

Chen H, Tini M, Evans RM. HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001, 13, 218–224.

Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S233-6.

Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Nov 1;419(1):25-30.

Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, Klaus GG, Johnston LH, Ley SC. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 2002 Oct 15;21(20):5375-85.

De Souza Pinto R, Castilho G, Paim BA, Machado-Lima A, Inada NM, Nakandakare ER, Vercesi AE, Passarelli M. Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycated albumin. *Lipids.* 2012 May;47(5):443-50.

Darenskaya MA, Kolesnikova LI, Kolesnikov SI. Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction. *Bull Exp Biol Med.* 2021 May;171(2):179-189.

Darley-Usmar V, Wiseman H, Halliwell B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* 1995 Aug 7;369(2-3):131-5.

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study Research Group. Intensive Diabetes Treatment and Cardiovascular Outcomes in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Study 30-Year Follow-up. *Diabetes Care*. 2016 May;39(5):686-93.

Dutta S, Shah RB, Singhal S, Dutta SB, Bansal S, Sinha S, Haque M. Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes. *Drug Des Devel Ther*. 2023 Jun 26;17:1907-1932.

Easterday A, Keil N, Subramaniam R. Mechanism of inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by glucose. *Faseb J.*, p. A1015, 2007.

El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med*. 2008 Sep 29;205(10):2409-17.

Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes*. 1987 Jul;36(7):808-12.

Everett BM, MacFadyen JG, Thuren T, Libby P, Glynn RJ, Ridker PM. Inhibition of Interleukin-1 β and Reduction in Atherothrombotic Cardiovascular Events in the CANTOS Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Oct 6;76(14):1660-1670. doi: 10.1016/j.jacc.2020.08.011. PMID: 33004131.

Field FJ, Watt K, Mathur SN. TNF-alpha decreases ABCA1 expression and attenuates HDL cholesterol efflux in the human intestinal cell line Caco-2. *J Lipid Res*. 2010 Jun;51(6):1407-15.

Forte TM, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J, McCall MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J Lipid Res*. 1995 Jan;36(1):148-57.

Ganchi PA, Sun SC, Greene WC & Ballard DW. A novel NF- κ B complex containing p65 homodimers: implications for transcriptional control at the level of subunit dimerization. *Mol. Cell. Biol*. 1993, 13, 7826–7835.

Gerbod-Giannone MC, Li Y, Holleboom A, Han S, Hsu LC, Tabas I, Tall AR. TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 28;103(9):3112-7. doi: 10.1073/pnas.0510345103.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*.

2010 Oct 29;107(9):1058-70.

Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597-605.

Gomez Rosso L, Lhomme M, Meroño T, Dellepiane A, Sorroche P, Hedjazi L, Zakiev E, Sukhorukov V, Orekhov A, Gasparri J, Chapman MJ, Brites F, Kontush A. Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2017 Feb;1862(2):188-195.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol*. 1998, 16, 225–260.

Hanssen NMJ, Westerink J, Scheijen JLJM, van der Graaf Y, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG; SMART Study Group. Higher Plasma Methylglyoxal Levels Are Associated With Incident Cardiovascular Disease and Mortality in Individuals With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2018 Aug;41(8):1689-1695.

Hao, S., Baltimore, D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nat Immunol* 2009, 10, 281–288.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955 Sep;34(9):1345-53.

Henning C, Stübner C, Arabi SH, Reichenwallner J, Hinderberger D, Fiedler R, Girndt M, Di Sanzo S, Ori A, Glomb MA. Glycation Alters the Fatty Acid Binding Capacity of Human Serum Albumin. *J Agric Food Chem*. 2022 Mar 9;70(9):3033-3046.

Hinz M, Scheidereit C. The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep*. 2014 Jan;15(1):46-61.

Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008 Oct 9;359(15):1577-89.

Ighodaro OM. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018 Dec;108:656-662.

Iborra RT, Machado-Lima A, Okuda LS, Pinto PR, Nakandakare ER, Machado UF, Correa-Giannella ML, Pickford R, Woods T, Brimble MA, Rye KA, Lu R, Yokoyama S, Passarelli M. AGE-albumin enhances ABCA1 degradation by ubiquitin-proteasome and lysosomal pathways in macrophages. *J Diabetes Complications*. 2018 Jan;32(1):1-10.

Ilnat MA, Thorpe JE, Kamat CD, Szabó C, Green DE, Warnke LA, Lacza Z, Cselenyák A, Ross K, Shakir S, Piconi L, Kaltreider RC, Ceriello A. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia*. 2007 Jul;50(7):1523-31. doi: 10.1007/s00125-007-0684-2.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000 Nov;49(11):1939-45. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1939.

Isoda K, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. AGE-BSA decreases ABCG1 expression and reduces macrophage cholesterol efflux to HDL. *Atherosclerosis*. 2007 Jun;192(2):298-304.

Inaba M, Okuno S, Kumeda Y, Yamada S, Imanishi Y, Tabata T, Okamura M, Okada S, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y, Osaka CKD. Expert Research Group. Glycated albumin is better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(3):896-903.

International diabetes federation. *IDF Diabetes Atlas*. [s.l: s.n.]. v. 10th edn, 2021.

Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, Gratton E, Parks J, Tontonoz P. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife*. 2015 Jul 14;4:e08009.

Iwai K. Diverse ubiquitin signaling in NF- κ B activation. *Trends Cell Biol*. 2012 Jul;22(7):355-64.

Kaplan R, Gan X, Menke JG, Wright SD, Cai TQ. Bacterial lipopolysaccharide induces expression of ABCA1 but not ABCG1 via an LXR-independent pathway. *J Lipid Res*. 2002 Jun;43(6):952-9.

Karner G, Perktold K. Effect of endothelial injury and increased blood pressure on albumin accumulation in the arterial wall: a numerical study. *J Biomech*. 2000 Jun;33(6):709-15.

Kauffmann DJH, Van MJC, Mertens DAE, Peperkamp E, Master C, Gerritsen ME. Cytokines in vitreous humor: interleukin-6 is elevated in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative ophthalmology and visual science*, 1994, 35(3): 900-906.

Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in

J774 murine macrophages: differential role of LXR. *J Lipid Res.* 2003 Sep;44(9):1728-36.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int.* 1995 May;36(1):59-66.

Kojima H, Kim J, Chan L. Emerging roles of hematopoietic cells in the pathobiology of diabetic complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Apr;25(4):178-87.

Kordes M, Matuschewski K, Hafalla JC. Caspase-1 activation of interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 is dispensable for induction of experimental cerebral malaria. *Infect Immun.* 2011 Sep;79(9):3633-41. doi: 10.1128/IAI.05459-11.

Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10;94(12):6474-9.

Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes.* 2003 Mar;52(3):818-23.

Kowluru RA, Abbas SN, Odenbach S. Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: effect of reinstatement of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. *J Diabetes Complications.* 2004 Sep-Oct;18(5):282-8.

Kowluru RA, Chakrabarti S, Chen S. Re-institution of good metabolic control in diabetic rats and activation of caspase-3 and nuclear transcriptional factor (NF-kappaB) in the retina. *Acta Diabetol.* 2004 Dec;41(4):194-9.

Kowluru RA, Kanwar M, Kennedy A. Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:21976.

Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med.* 2007 Nov-Dec;13(11-12):625-35. doi: 10.2119/2007-00087.Koyama.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögren B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2004 Jul;82(7):434-48.

Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN; DCCT/EDIC Research Group. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes.*

2008 Apr;57(4):995-1001.

Lamhamedi-Cherradi S.-E., Zheng S., Hilliard B. A., Xu L., Sun J., Alshehadat S., Liou H.-C., Chen Y. H. Transcriptional regulation of type I diabetes by NF- κ B. *J. Immunol.* 2003;171:4886–4892.

Lan KC, Chiu CY, Kao CW, Huang KH, Wang CC, Huang KT, Tsai KS, Sheu ML, Liu SH. Advanced glycation end-products induce apoptosis in pancreatic islet endothelial cells via NF- κ B-activated cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 up-regulation. *PLoS One.* 2015 Apr 21;10(4):e0124418.

Lang V, Janzen J, Fischer GZ, Soneji Y, Beinke S, Salmeron A, Allen H, Hay RT, Ben-Neriah Y, Ley SC. β TrCP-mediated proteolysis of NF- κ B1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Mol. Cell. Biol.* 2003;23:402–413.

Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Sep;41(9):1166-73.

Lee IY, McMenamy RH. Location of the medium chain fatty acid site on human serum albumin. Residues involved and relationship to the indole site. *J Biol Chem.* 1980 Jul 10;255(13):6121-7.

Libby P. Interleukin-1 beta as a target for atherosclerosis therapy: biological basis of CANTOS and beyond. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2278–2289

Limb, G., Little, B., Meager, A. et al. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye*, 1991, 5, 686–693.

Liou HC, Nolan GP, Ghosh S, Fujita T, Baltimore D. The NF- κ B p50 precursor, p105, contains an internal I κ B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J.* 1992;11:3003–3009.

Liu X, Ye F, Xiong H, Hu DN, Limb GA, Xie T, Peng L, Zhang P, Wei Y, Zhang W, Wang J, Wu H, Lee P, Song E, Zhang DY. IL-1 β induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of p38 MAPK/NF- κ B signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2015 Feb 1;331(1):223-231.

Livak, K. J., and Schmitgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using rea-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Aug;22(4):189-95.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Sartori CH, Oliveira ER, Nakandakare

ER, Stefano JT, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML, Passarelli M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1-mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013 Jan;29(1):66-76.

Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Castilho G, Sartori CH, Oliveira ER, Okuda LS, Nakandakare ER, Giannella-Neto D, Machado UF, Corrêa-Giannella ML, Traldi P, Porcu S, Roverso M, Lapolla A, Passarelli M. In type 2 diabetes mellitus glycated albumin alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Cell Physiol*. 2015 Jun;230(6):1250-7.

Machado-Lima A, López-Díez R, Iborra RT, Pinto RS, Daffu G, Shen X, Nakandakare ER, Machado UF, Corrêa-Giannella MLC, Schmidt AM, Passarelli M. RAGE Mediates Cholesterol Efflux Impairment in Macrophages Caused by Human Advanced Glycated Albumin. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 1;21(19):7265. doi: 10.3390/ijms21197265.

Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Yokota T, Utsunomiya K, Nishimura R. Targeting Redox Imbalance as an Approach for Diabetic Kidney Disease. *Biomedicines*. 2020 Feb 22;8(2):40.

Mesquida M, Leszczynska A, Llorenç V, Adán A. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases, *Clinical and Experimental Immunology*, Volume 176, Issue 3, June 2014, Pages 301–309.

Minanni CA, Machado-Lima A, Iborra RT, Okuda LS, de Souza Pinto R, Santana MFM, Lira ALA, Nakandakare ER, Côrrea-Giannella MLC, Passarelli M. Persistent Effect of Advanced Glycated Albumin Driving Inflammation and Disturbances in Cholesterol Efflux in Macrophages. *Nutrients*. 2021 Oct 17;13(10):3633.

Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF κ B system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016 May;8(3):227-41.

Mukhopadhyay S, Ghosh A, Kar M. Methylglyoxal increase in uremia with special reference to snakebite-mediated acute renal failure. *Clin Chim Acta*. 2008 May;391(1-2):13-7.

Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group (2005). Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2643-53.

O'Carroll SJ, Kho DT, Wiltshire R, et al. Pro-inflammatory TNF α and IL-1 β differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells. *J Neuroinflammation* 2015;12:131

Odani H, Shinzato T, Matsumoto Y, Usami J, Maeda K. Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo

determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Mar 5;256(1):89-93.

Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM.* 2005 Dec;98(12):845-56.

Ohtsu A, Shibutani Y, Seno K, Iwata H, Kuwayama T, Shirasuna K. Advanced glycation end products and lipopolysaccharides stimulate interleukin-6 secretion via the RAGE/TLR4-NF- κ B-ROS pathways and resveratrol attenuates these inflammatory responses in mouse macrophages. *Exp Ther Med.* 2017 Nov;14(5):4363-4370.

Okuda LS, Castilho G, Rocco DD, Nakandakare ER, Catanozi S, Passarelli M. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Dec;1821(12):1485-92.

Papachristoforou E, Lambadiari V, Maratou E, Makrilakis K. Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. *J Diabetes Res.* 2020 Oct 12;2020:7489795.

Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J.* 2013 Aug;34(31):2436-43.

Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* 1994 May 27;269(21):15195-203.

Pinto-Junior, D.C., Silva, K.S., Michalani, M.L. *et al.* Advanced glycation end products-induced insulin resistance involves repression of skeletal muscle GLUT4 expression. *Sci Rep* 8, 8109 (2018).

Pratner D, Nallar S, Vogel SN. The role of RAGE in host pathology and crosstalk between RAGE and TLR4 in innate immune signal transduction pathways. *FASEB J.* 2020 Dec;34(12):15659-15674.

Rabani M, Levin JZ, Fan L, Adiconis X, Raychowdhury R, Garber M, Gnirke A, Nusbaum C, Hacohen N, Friedman N, Amit I, Regev A. Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2011;29:436–442.

Rabbani G, Ahn SN. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int J Biol Macromol.* 2019 Feb 15;123:979-990.

Reichard P, Berglund B, Britz A, Cars I, Nilsson BY, Rosenqvist U. Intensified conventional insulin treatment retards the microvascular complications of insulin-

dependent diabetes mellitus (IDDM): the Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) after 5 years. *J Intern Med.* 1991 Aug;230(2):101-8.

Reis SJ, Veloso LC, Mattos TR, Purish S, Machado-nogueira A. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2008.

Ricca A, Biroccio A, Trisciuglio D, Cippitelli M, Zupi G, Del Bufalo D. relA over-expression reduces tumorigenicity and activates apoptosis in human cancer cells. *Br J Cancer.* 2001 Dec 14;85(12):1914-21.

Rodacki M, Teles M, Gabbay M, Montenegro R, Bertoluci M. Classificação do diabetes. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes*, 2023.

Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42351-4.

Salmeron A, Janzen J, Soneji Y, Bump N, Kamens J, Allen H, Ley SC. Direct phosphorylation of NF- κ B p105 by the I κ B kinase complex on serine 927 is essential for signal-induced p105 proteolysis. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:22215–22222.

Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, de Medina FS. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010 Jun 15;401(2):318-20.

Saraguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, Motoyama A, Hibino T, Kataoka K, Huh NH. TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One.* 2011;6(8):e23132.

Schmitz ML, Stelzer G, Altmann H, Meisterernst M & Baeuerle P A. Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF- κ B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators. *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 7219–7226.

Scivittaro V, Ganz MB, Weiss MF. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Apr;278(4):F676-83.

Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell.* 1995;80:321–330.

Sharma A, Choi JSY, Stefanovic N, Al-Sharea A, Simpson DS, Mukhamedova N, Jandeleit-Dahm K, Murphy AJ, Sviridov D, Vince JE, Ritchie RH, de Haan JB. Specific NLRP3 Inhibition Protects Against Diabetes-Associated Atherosclerosis. *Diabetes.* 2021 Mar;70(3):772-787.

Shen CY, Lu CH, Wu CH, Li KJ, Kuo YM, Hsieh SC, Yu CL. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for

AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Molecules*. 2020 Nov 27;25(23):5591.

Shoji T, Koyama H, Morioka T, et al. Receptor for advanced glycation end products is involved in impaired angiogenic response in diabetes. *Diabetes*. 2006;55:2245–55.

Song N, Li T. Regulation of NLRP3 Inflammasome by Phosphorylation. *Front Immunol*. 2018; 9: 2305.

Soran H, Schofield JD, Durrington PN. Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol*. 2015 Oct 16;6:222.

Sterner, D. E. & Berger, S. L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*2000, 64, 435–459.

Sun Y, Hao M, Luo Y, Liang CP, Silver DL, Cheng C, Maxfield FR, Tall AR. Stearoyl-CoA desaturase inhibits ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux and modulates membrane domain structure. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):5813-20.

Suryavanshi SV, Kulkarni YA. NF- κ B: A Potential Target in the Management of Vascular Complications of Diabetes. *Front Pharmacol*. 2017 Nov 7;8:798.

Takahashi S, Uchino H, Shimizu T, Kanazawa A, Tamura Y, Sakai K, Watada H, Hirose T, Kawamori R, Tanaka Y. Comparison of glycated albumin (GA) and glycated hemoglobin (HbA1c) in type 2 diabetic patients: usefulness of GA for evaluation of short-term changes in glycemic control. *Endocr J*. 2007; 54(1):139-44.

Twarda-Clapa A, Olczak A, Białkowska AM, Koziółkiewicz M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells*. 2022 Apr 12;11(8):1312.

Tosheska Trajkovska K, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol*. 2017 Aug;18(2):149-154.

Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):837-53. Erratum in: *Lancet* 1999 Aug 14;354(9178):602.

Van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2023 May;23(5):289-303. doi: 10.1038/s41577-022-00792-3. Epub 2022 Nov 15. PMID: 36380021; PMCID: PMC9665039.

Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J, Hughes TE. Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia*. 2004 May;47(5):844-52.

Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J*. 2003 Mar 17;22(6):1313-24.

Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013 Aug;47 Suppl 1:3-27.

Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep*. 2014 Jan;14(1):453.

Wan L, Bai X, Zhou Q, Chen C, Wang H, Liu T, Xue J, Wei C, Xie L. The advanced glycation end-products (AGEs)/ROS/NLRP3 inflammasome axis contributes to delayed diabetic corneal wound healing and nerve regeneration. *Int J Biol Sci*. 2022 Jan 1;18(2):809-825.

Wong NKP, Nicholls SJ, Tan JTM, Bursill CA. The Role of High-Density Lipoproteins in Diabetes and Its Vascular Complications. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 5;19(6):1680.

Wróblewska M. The origin and metabolism of a nascent pre- β high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux. *Acta Biochim Pol*. 2011;58(3):275-85. Epub 2011 Jul 12.

Wu CH, Huang CM, Lin CH, Ho YS, Chen CM, Lee HM. Advanced glycosylation end products induce NF-kappaB dependent iNOS expression in RAW 264.7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Aug 30;194(1-2):9-17.

Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. *J Immunol*. 2011 Mar 1;186(5):3248-57.

Yao Y, Song Q, Hu C, Da X, Yu Y, He Z, Xu C, Chen Q, Wang QK. Endothelial cell metabolic memory causes cardiovascular dysfunction in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2022 Jan 7;118(1):196-211.

Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L. Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes*. 2001 Jun;50(6):1495-504.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006 Feb 22;7:85.

Yuuki T, Kanda T, Kimura Y, Kotajima N, Tamura J, Kobayashi I, Kishi S. Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy, *Journal of Diabetes and its Complications*, 2001, 15(5) - 257-259.

Zhao Y, Marcel YL. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry*. 1996 Jun 4;35(22):7174-80.

Zhang M, Xu-Monette ZY, Li L, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, Wang J, Montes-Moreno S, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, Han van Krieken J, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Møller MB, Parsons BM, Winter JN, Piris MA, Medeiros LJ, Pham LV, Young KH. RelA NF- κ B subunit activation as a therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma. *Aging (Albany NY)*. 2016 Dec 8;8(12):3321-3340.

Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*. 1997 May 2;89(3):413-24.

Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell*. 2002 Mar;9(3):625-36.

Zhou Z, Tang Y, Jin X, Chen C, Lu Y, Liu L, Shen C. Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through AMPK Activation and RAGE/NF κ B Pathway Suppression. *J Diabetes Res*. 2016;2016:4847812.