ADRIANA MACHADO SALDIBA DE LIMA

Albumina modificada por glicação avançada no diabete melito tipo 1 e 2 prejudica o transporte reverso de colesterol e favorece o acúmulo de lípides em macrófagos

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo
2010

ADRIANA MACHADO SALDIBA DE LIMA

Albumina modificada por glicação avançada no diabete melito tipo 1 e 2 prejudica o transporte reverso de colesterol e favorece o acúmulo de lípides em macrófagos

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Adriana Machado Saldiba de
Albumina modificada por glicação avançada no diabete melito tipo 1 e 2 prejudica o transporte reverso de colesterol e favorece o acúmulo de lípides em macrófagos / Adriana Machado Saldiba de Lima. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de: Endocrinologia.
Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Diabetes mellitus 3.Albumina sérica 4.Colesterol 5.Produtos finais de glicosilação

USP/FM/DBD-465/10

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípides (LIM 10) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Este projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Doutorado Direto 06/55496-7 e Auxílio Regular à Pesquisa 09/53869-9.

Dedico esta tese aos meus pais, Nelson e Dulcinea, e à minha avó Dulce, porque propiciaram meus verdadeiros valores, sempre acreditaram nos meus sonhos e apoiaram-me incondicionalmente.

Dedico também ao meu marido, André,
pela parceria, pelo amor, pela admiração, pela presença, pelo carinho, pela compreensão, pelo incentivo e pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa Passarelli, pela orientação, amizade, carinho, intensa dedicação e apoio ao longo desses 8 anos e meio de convivência. Independentemente se os dias eram alegres ou tristes, você sempre esteve presente! Obrigada por acreditar em mim e por ensinar-me o que é fazer pesquisa com excelência e ética, fazendo parte do meu crescimento pessoal, científico e intelectual.

À Dra. Ana Maria Pita Lottenberg, por ter me dado a oportunidade de descobrir o que gosto de fazer: pesquisa e cuidar de pessoas por meio da nutrição. Obrigada pela amizade, pelo carinho, pelo apoio e por ser um exemplo de pessoa e profissional que eu devo buscar ser.

Ao Dr. Eder Quintão, pelo carinho e pelo incentivo a buscar cada vez mais cultura, conhecimento e competência, sempre com muita humildade. Obrigada pelos momentos de descontração, falando de futebol, e pelo seu amor e entusiasmo pela pesquisa.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, pelo apoio, pela atenção e pela dedicação. Obrigada por estar sempre pronta a me ouvir com muito carinho e por ensinar como me dedicar aos meus pacientes.

Ao Dr. Sergio Catanozi, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e pelos momentos de diversão e risadas que deram leveza ao tempo de pesquisa que muitas vezes é extremamente tenso.

À Dra. Mônica Neves, pelo carinho, pelo apoio e pelas observações sempre esclarecedoras sobre o metabolismo lipídico.

À Fabiana Dias Ferreira, pelo carinho, pelas conversas, pelos desabafos e pelas ajudas incansáveis nos momentos em que eu mais precisava. Obrigada por sempre me ouvir e estar por perto. Ganhei uma grande amiga.

Ao Rodrigo Tallada Iborra, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio e pela ajuda constante ao longo desses 8 anos e meio de convivência. Obrigada por me passar tranquilidade nos momentos em que eu achava que não ia dar certo.

Ao Raphael de Souza Pinto, pela amizade, pela paciência, pelo carinho, pela dedicação e pela parceria. Obrigada por me aguentar como dupla de bancada por alguns anos.

À Débora Rocco, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos de risada e descontração, pelos desabafos e pelo incentivo. Obrigada por sua alegria. Você é vida.

À Gabriela Castilho, pela amizade, pelo incentivo, pelas conversas e pela ajuda com os experimentos e discussão dos resultados. Obrigada pelo carinho e pelo apoio sempre que eu deles precisava. Você é muito especial para mim.

À Ligia Shimabukuro Okuda, pela amizade, pelo carinho e pelo apoio. Obrigada por estar sempre por perto. Você é muito querida.

À Valéria Suti Nunes, pela generosidade, pelo carinho, pela amizade e pela disposição incansável em tirar dúvidas e ajudar com os experimentos. Obrigada por me ensinar que devemos estar sempre prontos para ajudar os outros.

À Claudia Souza, pela amizade, pelo carinho, pelo apoio, pelas conversas na copa e pelos momentos de descontração. Obrigada por sua simpatia e por estar sempre disponível a me ajudar a resolver as questões burocráticas.

À Patricia Cazita, pela amizade, pelo carinho, pelas conversas, pelas trocas de experiências e pelos bate-papos descontraídos. Obrigada por não me deixar esquecer de como família é algo muito importante em nossas vidas.

À Roberta Marcondes Machado, pela amizade, pelas conversas, pelos conselhos, pelas parcerias e pelo apoio. Obrigada por me passar segurança em momentos em que eu não acreditava em mim.

À Vivian Buonocorso, pela amizade, pelo carinho e pelo apoio. Obrigada por ensinar-me como atender um paciente e por incentivar-me a fazer o que amo.

À Patricia Rios, pela amizade, pelo carinho, pelo amor e pela parceria ao longo de 10 anos. Obrigada por ter paciência com essa sua amiga "birutinha".

À Camila Holanda Sartori, pela amizade, pelo carinho e pela parceria espiritual. Obrigada pela ajuda fundamental na purificação das albuminas.

À Camila Canteiro, pela amizade, pelo carinho e pelo apoio. Obrigada por todas as dicas e conselhos sobre a biologia molecular.

À Juliana Machado, Karina Oliveira, Alessandra Carreiro e Diego Gomes pela paciência, pelo carinho, pelo apoio e pela ajuda sempre que eu precisava.

Às nutricionistas Maria Silvia Ferrari, Milessa Afonso, Flavia Carmo, Angela Ilha, Klara Rahmann e Fabiana Goes, pelo carinho, pelas conversas, pelos bate-papos informais e pelas trocas de experiências profissionais.

Aos alunos Mila Alvarenga, Joilsa Monteiro, Paula Pinto, Fernanda Fusco, Maria Olivia Carvalho, Tatiana Venancio, Renata Bombo, pelo apoio, pelo incentivo e pelos bate-papos que deixaram o ambiente de pesquisa mais agradável.

À Jussara Rocha, pelas conversas e por me ajudar com várias dúvidas metodológicas.

À Senária Egutti, pelos momentos de risadas, pela descontração e pelas dicas para solucionar questões burocráticas.

À Rosibel, pelo seu cuidado com todo o material do laboratório. Seu trabalho é fundamental para o sucesso dos nossos experimentos.

Ao Dr. Anibal Vercesi e ao Bruno Paim, pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

À Dra. Walcy Teodoro, pelos momentos de descontração e pela ajuda com as análises das lâminas no microscópio.

À Erika Oliveira, pela amizade, pelo carinho e pelo apoio especialmente na reta final da tese. Obrigada pela ajuda fundamental em todos os experimentos que envolviam biologia molecular.

Ao José Tadeu Stefano pela ajuda com os ensaios de *microarray*.

À Dr. Maria Lucia C Corrêa-Giannella, por me ajudar a entrar no mundo novo do *microarray* e da biologia molecular.

Ao Dr. Daniel Giannella-Neto, pela paciência para me ensinar a estatística do *microarray*.

À minha irmã Renata, pelo carinho, pelo amor, pela amizade, pelo cuidado e pelo apoio em todo momento.

Às minhas sobrinhas Gigi e Gabi, que eu amo tanto!

À minha sogra Ruthinha, por ser minha fã incondicional e por orar por mim incansavelmente!

Às amigas Roberta Vernaglia, Adriana Saraiva, Erika Santos, Daniella Reis, Susana Fais, Miriam Matos e Juliana Camargo que andaram comigo e não me deixaram esquecer dos verdadeiros valores da vida.

Ao Marcos Amado, meu mentor, que me ajudou a compreender que a pesquisa é uma dádiva divina e que a ciência pode ser uma forma de adoração a Deus.

Aos pacientes que fizeram parte do protocolo deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado direto e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos que de alguma forma fizeram parte desta tese. Muito obrigada!

“A ciência não é ameaçada por Deus, ela é aprimorada.

Certamente Deus não é ameaçado pela ciência,

Ele a possibilitou”.

Francis S. Collins

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1.INTRODUÇÃO.....1

1.1.Diabete melito e produtos de glicação avançada 1

1.2.Diabete melito e albumina glicada.....6

1.3.Glicação e transporte reverso de colesterol 8

2.JUSTIFICATIVA.....15

3.OBJETIVO 16

4.MÉTODOS.....17

4.1.Casuística.....17

4.2.Quantificação da porcentagem de albumina glicada no plasma.....18

4.3.Isolamento da albumina sérica 19

4.4.Purificação da albumina sérica por extração alcoólica 20

4.5.Preparo da albumina glicada *in vitro* 22

4.6.Dosagem de endotoxinas 22

4.7.Determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML) 23

4.8.Determinação do conteúdo de apo A-I 23

4.9.Teste de viabilidade celular 23

4.10.Obtenção de lipoproteínas.....24

4.11.Acetilação de LDL 25

4.12.Determinação do efluxo de ^{14}C-colesterol em macrófagos 25

4.13.Análise qualitativa do conteúdo de lípides em macrófagos 27

4.14.Determinação do conteúdo de ABCA-1 29

4.15.Marcação de HDL com ^{3}H colesteril oleoil éter 30

4.16.Captação celular de ^{3}H colesteril oleoil éter de HDL 31

4.17.Perfil de expressão em microarranjos de oligonucleotídeos (*microarray*) 32

4.18.Análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real 43

4.19.Análise Estatítica 47

5.RESULTADOS 48

6.DISCUSSÃO 88

7.CONCLUSÃO 104

8.REFERÊNCIAS 105

APÊNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1: *ATP binding cassete transporter A-1*

ABCAG-1: *ATP binding cassete transporter G-1*

ACAT: acil colesterol aciltransferase

AGE: produtos de glicação avançada

Apo: apolipoproteína

BMF: *Bcl2-modifying factor*

CE: colesterol esterificado

CETP: proteína de transferência de CE

CL: colesterol livre

CML: carboximetil-lisina

CT: colesterol total

DM 1: diabete melito tipo 1

DM 2: diabete melito tipo 2

FAFA: albumina isenta de ácidos graxos

FPLC: cromatografia líquida para separação rápida de proteínas

GAD: glicolaldeído

GO: glioxal

HbA_{1c}: hemoglobina glicada

HDL: lipoproteínas de alta densidade

IDL: lipoproteínas de densidade intermediária

IL: interleucina

INSIG-1: *insulin induced gene 1*

JAK2: *Janus kinase 2*

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDH: lactato desidrogenase

LDL: lipoproteínas de densidade baixa

LXR: receptor X hepático

MGO: metilglioxal

mRNA: RNA mensageiro

NF-κB: fator nuclear kappa B

PBS: tampão fosfato

RAGE: receptor para produtos de glicação avançada

ROS: espécies reativas de oxigênio

RT-PCR: transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase

RXR: receptor X retinóico

SCAP: proteína ativadora da clivagem de *SREBP*

SCD: estearoil-CoA desaturase

SR-AI: receptor *scavenger* classe A, tipo 1

SR-BI: receptor *scavenger* classe B, tipo 1

SREBP: *sterol-regulatory element-binding protein*

TG: triglicérides

TNF-α: fator de necrose tumoral-α

TRC: transporte reverso de colesterol

UCP-2: proteína desacopladora 2

VLDL: lipoproteínas de densidade muita baixa

RESUMO

Machado-Lima A. **Albumina modificada por glicação avançada no diabete melito tipo 1 e 2 prejudica o transporte reverso de colesterol e favorece o acúmulo de lípides em macrófagos** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 130p.

Produtos de glicação avançada (AGE) são prevalentes no diabete melito e alteram o metabolismo de lípides e lipoproteínas. Neste estudo, avaliou-se a influência da albumina, isolada do soro de indivíduos controles (C, n =12) e de portadores de diabete melito tipo 1 (DM 1, n=13) e tipo 2 (DM 2, n=11), com controle glicêmico inadequado, sobre a remoção de colesterol de macrófagos, o acúmulo intracelular de lípides, o conteúdo do receptor de HDL, ABCA-1 e a captação seletiva de colesterol esterificado de HDL. Além disso, foi determinada a expressão diferencial de genes em macrófagos tratados com albumina C, DM 1 ou DM 2. A concentração plasmática de albumina glicada foi superior no grupo DM 1 e DM 2 em relação ao C e correlacionou-se positivamente com glicemia, hemoglobina glicada e frutosamina. Albumina sérica foi isolada por cromatografia para separação rápida de proteínas e purificada por extração alcoólica. Albumina DM 1 e DM 2 apresentaram maior conteúdo de carboximetil-lisina e apo A-I quando comparada à albumina C. Macrófagos enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol foram tratados com albumina C, DM 1 ou DM 2 e, a seguir, incubados na presença ou ausência de apo A-I, HDL_3 ou HDL_2 para determinação do efluxo de colesterol. Apesar de removerem maior quantidade de colesterol celular, as albumina DM 1 e DM 2 reduziram o efluxo de colesterol mediado por apo A-I (70% e 45%, respectivamente) e HDL_2 (55% e 54%, respectivamente) em comparação à albumina C. Com HDL_3, a queda no efluxo de colesterol só foi observada em macrófagos expostos à albumina DM 2 (55%). Macrófagos incubados apenas com albumina C, DM 1 ou DM 2 apresentaram conteúdo lipídico semelhante,

evidenciado por coloração com *Oil Red O*. A adição de apo A-I, HDL_3 ou HDL_2 reduziu o conteúdo lipídico apenas nas células tratadas com albumina C, mas não com albumina DM 1 ou DM 2. A expressão de ABCA-1 foi diminuída 82% e 25% em macrófagos expostos, respectivamente, à albumina DM 1 e DM 2, em comparação às células tratadas com albumina C. As albuminas DM 1 e DM 2 reduziram a captação de ^3H colesteril oleoil éter de HDL por células que superexpressam o receptor SR-BI. Estes resultados também foram obtidos com albumina humana modificada *in vitro* por glicação avançada. As albuminas isoladas dos pacientes diabéticos aumentaram a expressão de receptores envolvidos na captação de LDL modificadas e de proteínas que modulam vias da homeostase do colesterol. Os resultados deste estudo evidenciaram que a modificação *in vivo* da albumina por glicação avançada prejudica o transporte reverso de colesterol no diabete melito, por reduzir a expressão de ABCA-1 e a remoção de colesterol de macrófagos, bem como a captação seletiva de colesterol esterificado de HDL pelo SR-BI. Independentemente de variação na concentração e composição de HDL, a glicação da albumina pode contribuir para o acúmulo de lípides em macrófagos e gênese da aterosclerose no diabete melito.

Descritores: aterosclerose, diabetes mellitus, albumina sérica, colesterol, produtos finais de glicosilação.

SUMMARY

Machado-Lima A**. Impairment in reverse cholesterol transport and macrophage lipid accumulation induced by advanced glycated albumin drawn from uncontrolled type 1 and type 2 diabetes mellitus patients** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 130p.

Advanced glycation end products are prevalent in diabetes mellitus and alter lipids and lipoprotein metabolism. In this study we analyzed the role of albumin, isolated from control individuals (C, n = 12) and uncontrolled type 1 (DM 1, n = 13) and type 2 (DM 2, n = 11) diabetes mellitus patients on macrophage cholesterol removal, intracellular lipid accumulation, expression of the HDL receptor protein level, ABCA-1and the uptake of esterified cholesterol from HDL. It was also investigated the differential gene expression in macrophages treated with C, DM 1 or DM 2 albumin. Glycated albumin was higher in DM 1 and DM 2 groups as compared to C and was positivetly correlated with glycemia, glycated hemoglobin and fructosamine. Serum albumin was isolated by fast protein liquid chromatography and alchoolic extraction. DM 1 and DM 2 albumin presented a higher amount of carboxymethyllysine and apo A-I as compared to C albumin. In order to determine cholesterol efflux acetylated LDL and ^{14}C-cholesterol enriched J-774 macrophages were treated with C, DM 1 or DM 2 albumin and then incubated in the absence or presence of apo A-I, HDL_3 or HDL_2. Although presenting a higher ability to remove cell cholesterol by itself, DM 1 and DM 2 albumin reduced cholesterol efflux mediated by apo A-I (70% e 45%, respectively) and by HDL_2 (55% e 54%, respectively) as compared to C albumin. With HDL_3 the reduction of the cholesterol efflux was only observed in macrophages treated with DM 2 albumin (55%) in comparison to C albumin. Macrophages incubated with C, DM 1 or DM 2 albumin alone presented similar amount of intracellular lipids as assessed by *Oil Red O*

staining. The addition of apo A-I, HDL_3 or HDL_2 reduced the lipid content in cells treated with C albumin, but not in those exposed to DM 1 or DM 2 albumin. The expression of ABCA-1 was reduced 82% and 25% in macrophages treated, respectively, with DM 1 or DM 2 albumin, in comparison to C albumin. DM 1 and DM 2 albumin reduced the uptake of ^3H colesteril oleoyl ether from HDL by SR-BI overexpressing cells. These findings also were obtained when cells were treated *in vitro* with human serum albumin submitted to advanced glycation. DM 1 and DM 2 albumin enhanced the expression of receptors involved in the uptake of modified LDL and cholesterol homeostasis. Our findings showed that the advanced glycation of albumin that takes place in diabetes mellitus impairs the reverse cholesterol transport efficiency by reducing the ABCA-1 expression and cholesterol exportation to HDL and also by diminishing the uptake of esterified cholesterol from HDL. Independently of changes in HDL composition and concentration, advanced glycated albumin contributes to cholesterol accumulation in macrophages and atherogenesis in diabetes mellitus.

Descriptors: atherosclerosis, diabetes mellitus, serum albumin, cholesterol, advanced glycosylation end products.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabete melito e produtos de glicação avançada

A doença macrovascular aterosclerótica é prevalente em pacientes com diabete melito (DM) tipo 1 e 2, sendo a principal causa de morbi-mortalidade desses indivíduos (Beckman et al., 2002; Pambianco et al., 2006). Embora a hiperglicemia não seja consensualmente apontada como preditora de eventos cardiovasculares (UKPDS, 1998; DCCT/EDIC, 2005; ADVANCE, 2008; ACCORD, 2008; VADT, 2009), a alteração no metabolismo da glicose e o aumento do estresse oxidante são apontados como elementos importantes na gênese de alterações celulares que caracterizam as complicações macrovasculares do DM, à semelhança das complicações microvasculares (Brownlee, 2001; Cohen et al., 2006; Yamagishi et al., 2007, Yamagishi et al., 2008a; Yamagishi et al., 2008b; Jandeleit-Dahm e Cooper, 2008; Peppa e Raptis, 2008; Basta, 2008).

Produtos de glicação avançada (AGE) encontram-se aumentados na circulação sanguínea e nos tecidos de portadores de DM e correlacionam-se independentemente com o desenvolvimento de doença aterosclerótica (Blaauw et al., 2006; Chiang et al., 2009; Semba et al., 2009; Baumann et al., 2009). Os AGE alteram a permeabilidade dos vasos, a integridade endotelial, bem como processos hemodinâmicos e inflamatórios (Pu et al., 2007) que norteiam a evolução da aterosclerose. Em particular, modificam o fluxo de lípides celulares, contribuindo para o acúmulo de colesterol em

macrófagos arteriais (Machado et al., 2006; Marsche et al., 2007; Brown et al., 2007).

Os AGE são formados pela reação de glicação, caracterizada pela ligação covalente, não-enzimática, entre a glicose ou outros açúcares redutores com os resíduos de lisina e arginina das proteínas e grupos aminoterminais de proteínas e fosfolípides. Isso promove a formação reversível de uma base de Schiff, na sequência, ocorrem rearranjos moleculares que levam à formação do produto Amadori ou frutosil-lisina denominado produto de glicação precoce. Rearranjos inter e intramoleculares do produto Amadori levam à geração dos AGE, os quais alteram a estrutura e função de proteínas, lípides e ácidos nucleicos (Brownlee e Cerami, 1981) (**figura 1**).

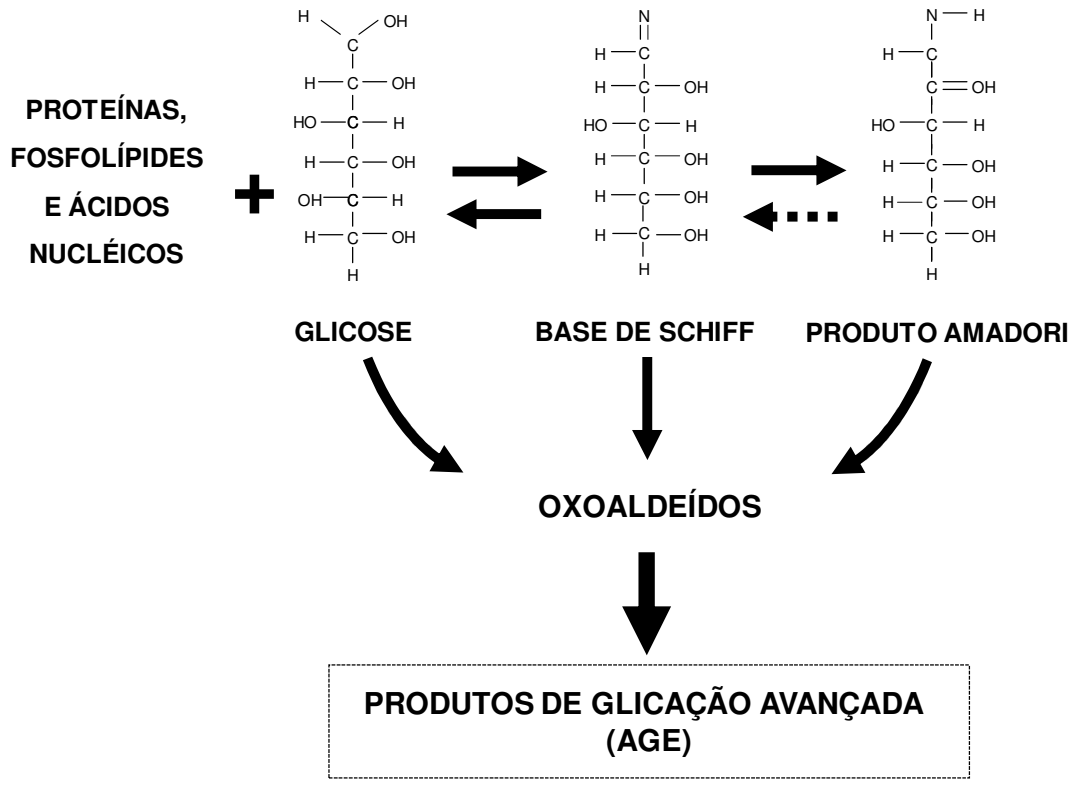


Figura 1. Reação de glicação

A autoxidação da glicose e a degradação da base de Schiff e do produto Amadori geram oxoaldeídos, como metilglioxal (MGO), glioxal (GO), glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona (Kato et al., 1987; Frye et al., 1998; Thornalley, 2005). Esses compostos são extremamente reativos e têm grande habilidade de reagir com proteínas e lípides em reações que, em sua grande maioria, envolvem eventos oxidantes. Em consequência, forma-se uma gama de AGE que diferem em complexidade, fluorescência e capacidade de formar cruzamentos entre moléculas. Carboximetil-lisina (CML) é o AGE mais abundante (Ahmed et al., 1986; Vlassara e Palace, 2002), decorrente da reação com GO e GAD. Sua concentração está aumentada na lesão aterosclerótica (Baidoshvili et al., 2004), sendo apontado importante marcador do insulto oxidante (Nerlich e Schleicher, 1999). Carboxietil-lisina - decorrente da reação com MGO -, pirralina, dímeros de MGO e GO e pentosidina também são importantes AGE formados *in vivo*. Não obstante, a grande heterogeneidade desses compostos torna difícil sua exata mensuração no plasma e tecidos (Hayase et al., 1989; Ahmed et al., 1986; Sell e Monnier, 1990; Ahmed et al., 1997; Krook et al., 1993). Este fato, sem dúvida, dificulta a exata interpretação da contribuição dos AGE na patologia das complicações tardias do DM e de outros estados de estresse carbonila.

Indivíduos portadores de DM e urêmicos não-diabéticos apresentam concentrações elevadas de açúcares dicarbonila GO, MGO e 3-deoxiglicosona na circulação (Odani et al., 1999; Lapolla et al., 2003; Beisswenger et al., 2005; Mukhopadhyay et al., 2008). A concentração

desses compostos é ainda maior no período pós-prandial no DM, desvinculando assim, a formação de AGE exclusivamente em proteínas de meia-vida longa, como originalmente proposto (Beisswenger et al., 2001; Ahmed et al., 2005). Neste sentido, lipoproteínas e albumina são suscetíveis à modificação por compostos dicarbonila, contribuindo para o pool circulante de macromoléculas modificadas por AGE (Cohen, 2003; Tabas, 1999; Younis et al., 2008; Mera et al., 2010).

Além do DM, a concentração dos AGE encontra-se elevada na uremia (Thornalley, 2006) e em outros estados metabólicos, em que ocorrem defeitos de destoxificação dos compostos carbonila em associação ao aumento do estresse oxidante (Mentink et al., 2006) e na inflamação (Ramasamy et al., 2005). Os AGE também foram detectados em indivíduos normoglicêmicos com lesões ateroscleróticas (Stitt et al., 1997). Assim, considera-se a geração de compostos dicarbonila, incluindo-se acroleína, a partir da oxidação de lípides, ascorbato e certos aminoácidos, independentemente da glicemia.

Produtos de glicação avançada de origem exógena advêm da alimentação e tem sua gênese vinculada à composição dos alimentos e sua forma de cocção (Goldberg et al., 2004; Uribarri et al., 2005). Em geral, alimentos ricos em lípides e proteínas contêm uma maior concentração de AGE. Além disso, alimentos grelhados em temperaturas altas (230°C) por curtos períodos de tempo apresentam mais AGE do que alimentos cozidos por um longo período de tempo em temperaturas mais baixas (100°C) (Uribarri et al., 2010). Alimentação rica em AGE favorece maior absorção

desses compostos, que são transportados na circulação em associação à albumina e LDL, principalmente, embora o impacto sobre a saúde humana ainda não esteja esclarecido (Koschinsky et al., 1997; Baynes, 2007). Além dos alimentos, o tabaco também é uma importante fonte exógena de AGE (Cerami et al., 1997).

Macromoléculas modificadas por AGE são reconhecidas, principalmente, pelos receptores para produtos de glicação avançada (RAGE), os quais desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares que resultam no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Goldin et al., 2006). Isso favorece a ativação do NF-κB (fator nuclear kappa B) (Yeh et al., 2001), com propagação da resposta inflamatória crônica e vasoconstritora, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) e VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (Schmidt et al., 1995) interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral-α (TNF-α) (Vlassara et al., 1988; Schmidt et al., 1994; Haslbeck et al., 2004) e endotelina-1 (Quehenberger et al., 2000). Esses eventos, juntamente com o prejuízo no metabolismo das lipoproteínas, concorrem para o dano vascular e favorecem a gênese e progressão da aterosclerose.

Outros receptores para AGE incluem os da família *scavenger* classe A (SR-A) (Horiuchi et al., 2005) e B (SR-BI) (Ywashima et al., 2000), CD-36 (Ohgami et al., 2001a), galectina (Vlassara et al., 1995), FEEL-1 e 2 (*fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing*

scavenger receptor-1 and 2) (Tamura et al., 2003) e os receptores para AGE dos tipos 1, 2 e 3 (AGER-1, 2 e 3) (Vlassara e Palace, 2002). Esses últimos contrapõem-se à via de sinalização suscitada pela interação AGE-RAGE, minimizando o insulto oxidante e inflamatório (Torreggiani et al., 2009).

1.2. Diabete melito e albumina glicada

A albumina corresponde a 80% do total de proteínas que são glicadas na circulação (Cohen, 2003). Esta proteína é o componente mais abundante do plasma humano, representando 60% da fração proteica e sua concentração na íntima - média arterial é grandemente aumentada na lesão vascular aterosclerótica (Karner e Perktold, 2000). A albumina é sintetizada no fígado, sendo formada por uma cadeia polipeptídica simples com 585 aminoácidos e peso molecular de 66 kDa, sem evidências de sítios de glicosilação enzimática na molécula (Peters Jr, 1985). Uma vez na circulação, apresenta meia-vida aproximada de 2 a 3 semanas, exercendo importantes ações biológicas, como manutenção da pressão coloidosmótica e do pH sanguíneo, atividade antioxidante e de transporte de fármacos, entre outras (Shaklai et al., 1984; Figge et al., 1991, Roche et al., 2008).

A estrutura extremamente flexível da albumina permite a acomodação de diferentes moléculas em sua estrutura (He e Carter, 1992). Além disso, pelo fato da albumina conter seis domínios hidrofóbicos, ela é capaz de interagir com inúmeras moléculas, como o colesterol, embora os ácidos graxos saturados e insaturados com cadeia de carbono com diferentes

comprimentos sejam seus principais ligantes (Zhao e Marcel, 1996; Lee e Mcmenamy, 1980). Além disso, a albumina tem a habilidade de se ligar reversivelmente a diversos tipos de componentes do sangue, como metais, pigmentos da bile, aminoácidos e hormônios, sendo considerada um transportador plasmático multifuncional (Shaklai et al., 1984).

Diversos trabalhos demonstram correlação positiva entre os valores de albumina glicada com o desenvolvimento de complicações macrovasculares no DM (Pu et al., 2007; Yamada et al., 2008; Kumeda et al., 2008; Peppa e Raptis, 2008; Masumi et al., 2009; Jin et al., 2009). Além disso, a dosagem de albumina glicada parecer ser um melhor marcador para refletir as complicações vasculares do DM do que a HbA_{1c} (Lu et al., 2009)

Takahashi et al. (2007) compararam as dosagens de albumina glicada e HbA_{1c} no tratamento de pacientes portadores de DM 2. Os autores demonstraram que a albumina glicada diminui mais rapidamente durante o tratamento intensivo com insulina do que a HbA_{1c}. Em pacientes DM em hemodiálise, a medida de albumina glicada também é apontada como melhor indicador do controle glicêmico (Inaba et al., 2007). Koga e Kasayama (2010) sugeriram que para algumas condições - cirrose hepática, anemia, gravidez, pré-menopausa, hiperglicemia pós-prandial, pacientes com DM 1, pacientes com DM 2 sob uso de insulina - a albumina glicada reflete melhor o controle glicêmico do que $HbA_{1c.}$

A dosagem de albumina modificada por glicação precoce é apontado como marcador de sua efetiva modificação por glicação avançada (Kisugi et al., 2007). Desse modo, o uso da metodologia citada por esses autores

poderia sobrepujar a constante limitação dos métodos de medida de AGE no plasma, com exceção da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

Maior concentração sérica de albumina modificada por glicação precoce foi encontrada em associação ao aumento da proteína C reativa e TNF-α em pacientes portadores de DM 2 com doença arterial coronariana e insuficiência renal (Lu et al., 2007) encontraram. Tais achados parecem contribuir para a íntima associação entre a concentração sérica de albumina glicada e a gênese e evolução da doença arterial coronariana em portadores de DM 2 (Pu et al., 2007; Lu et al., 2009).

1.3. Glicação e transporte reverso de colesterol

A modificação de lipoproteínas por glicação precoce ou avançada contribui para a aterogênese no DM, por promover alterações na metabolização dessas partículas no compartimento plasmático e arterial. Em particular, a glicação altera etapas do transporte reverso de colesterol (TRC), sistema antiaterogênico que promove o trânsito de colesterol das células periféricas, como os macrófagos arteriais, para o fígado e tecidos esteroidogênicos (Sviridov e Nestel, 2002; Cuchel e Rader, 2006). Perturbações no fluxo de colesterol ao longo das diversas etapas do TRC associam-se, em sua grande maioria, à maior prevalência de aterosclerose em humanos e em modelos animais experimentais (Gugliucci e Stahl, 1991; Passarelli et al., 1997; Passarelli et al., 2000; Machado et al., 2006).

A primeira etapa do TRC consiste no efluxo de colesterol, no qual partículas de apolipoproteínas-AI (apo A-I), com pequeno conteúdo lipídico associado, interagem com o receptor ABCA-1 (*ATP binding cassete transporter A-1*), favorecendo a saída do colesterol celular em fluxo unidirecional. As apo A-I enriquecidas em lípides interconvertem-se, sequencialmente, em partículas maiores de lipoproteínas de alta densidade (HDL), como a pré-beta HDL, HDL_3 e HDL_2. Estas também removem colesterol dos macrófagos por interagirem com o receptor ABCG-1 (*ATP binding cassete transporter G-1*) (**figura 2**).

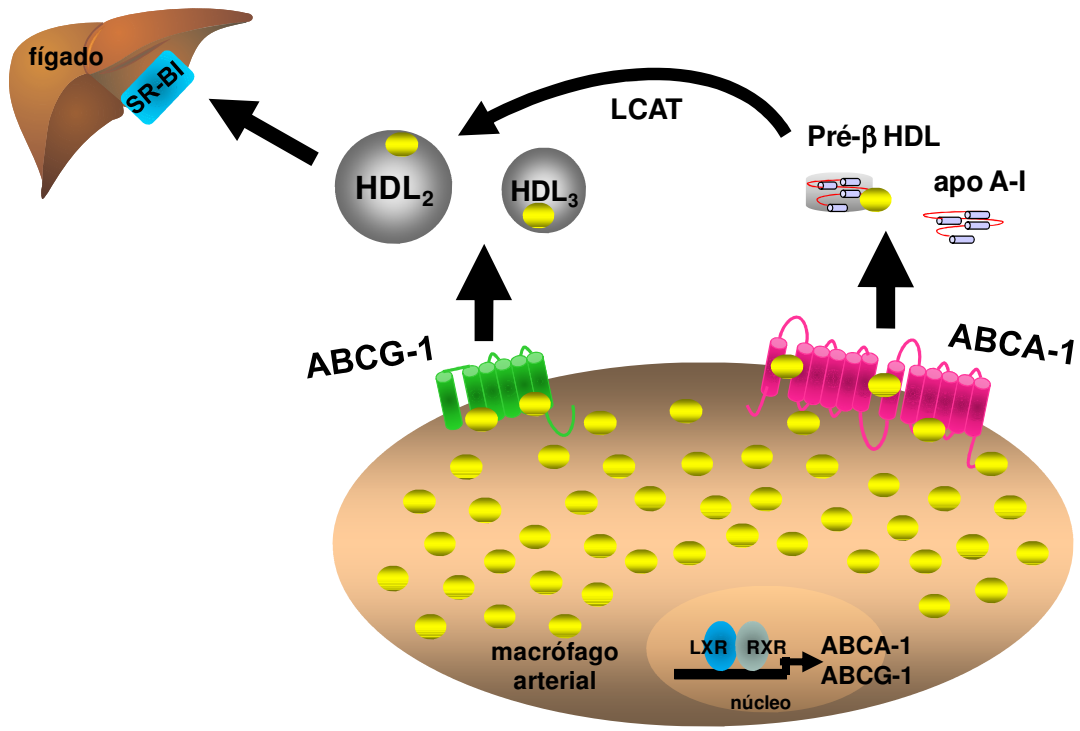


Figura 2. Efluxo de colesterol celular

A expressão dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 é positivamente modulada pelo conteúdo celular de colesterol, por meio da ativação dos

receptores nucleares LXR (receptor X hepático), que se dimerizam a RXR (receptor X retinóico). Além disso, a concentração final de ABCA-1 em macrófagos é finamente regulada por mecanismos pós-traducionais e pela ação de calpaínas de superfície que degradam este receptor. A ligação específica de apo A-I ao ABCA-1 aumenta sua meia- vida, graças à fosforilação da sequência PEST (prolina, ácido glutâmico, serina, treonina) de sua estrutura, o que impede a ação de proteases (Wang et al., 2003). Outras proteínas, como a JAK2 (*Janus kinase 2*) parecem modular a atividade do receptor ABCA-1 (Tang et al., 2004). Quando a JAK2 é ativada, ela garante a estabilidade do ABCA-1 e permite a interação da apo A-I com o receptor, favorecendo a remoção de colesterol celular.

Em macrófagos, parece existir uma regulação compensatória na expressão de ABCA-1 e ABCG-1, com atuação sinérgica entre dois transportadores (Oram e Vaughan, 2006; Gelissen et al., 2006).

Mutações no ABCA-1 foram descritas na doença de Tangier e na deficiência familiar de HDL, conferindo prejuízo ao efluxo de colesterol de macrófagos e geração hepática de HDL. Em decorrência, observa-se redução severa na concentração plasmática de HDL (mais intensa na doença de Tangier) e manifestação prematura de aterosclerose (Serfaty-Lacrosniere et al., 1994).

Nas HDL, o colesterol livre (CL) é convertido a colesterol esterificado (CE), por meio da ação da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Então, parte do CE é transferida, por intermédio da proteína de transferência de CE (CETP), para as lipoproteínas que contêm apo B – lipoproteínas de

densidade muita baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e quilomícrons. Estas, por sua vez, são removidas pelos receptores hepáticos de LDL (B/E), receptores E e LRP (proteína relacionada ao receptor de LDL). O CE da HDL também pode ser diretamente removido pelo fígado, por meio de receptores SR-BI, podendo ser convertido a ácidos biliares ou eliminado na forma livre na bile (**figura 3**).

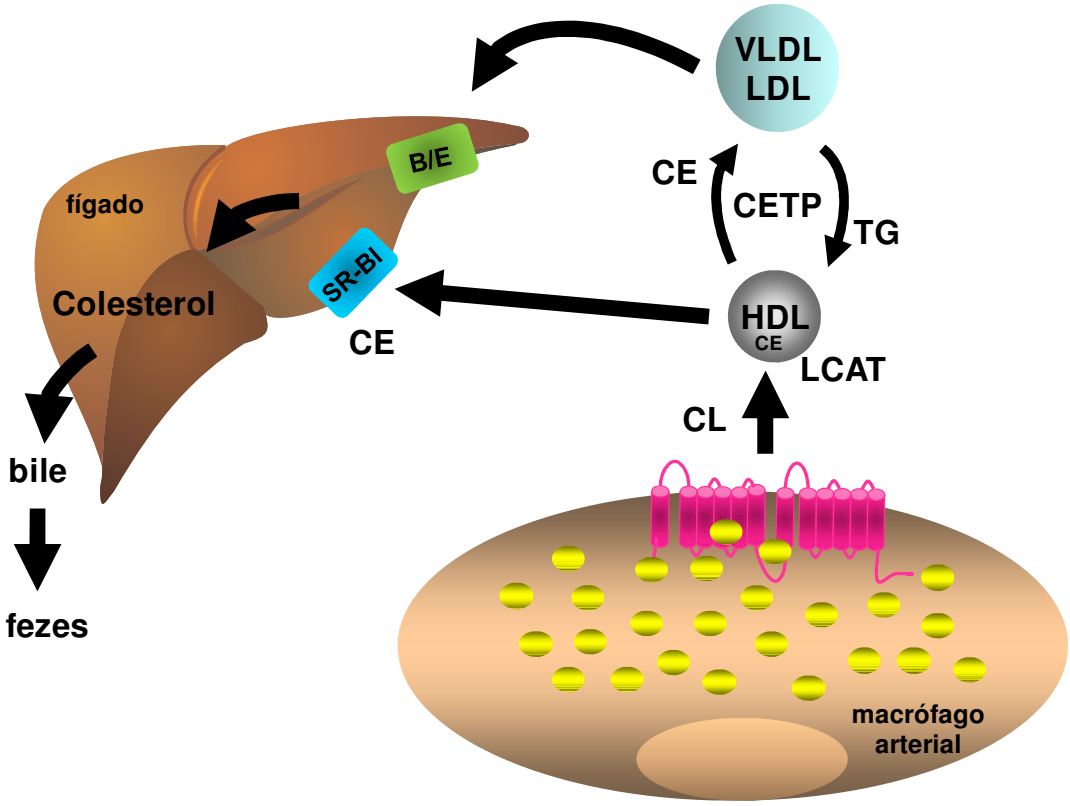


Figura 3. Transporte reverso de colesterol

Lipoproteínas de densidade muito baixa e LDL glicadas não são reconhecidas pelos receptores hepáticos de LDL (B/E), o que favorece maior tempo de permanência das mesmas na circulação (Bucala et al., 1994). LDL modificadas por glicação ou oxidação passam a ser reconhecidas por

receptores *scavenger* de macrófagos, que captam essas partículas favorecendo a formação das células espumosas.

O fluxo de colesterol ao longo do TRC encontra-se alterado face à modificação de lipoproteínas por glicação. Embora a remoção de colesterol de macrófagos não seja prejudicada pela glicação precoce de HDL (Rashiduni et al., 1999; Passarelli et al., 2000) a glicação avançada de apo A-I (Hoang et al., 2007) e HDL (Matsuki et al., 2009) reduz o efluxo de lípides celulares. Passarelli et al. (1997) observaram menor esterificação de colesterol de HDL glicada pela enzima LCAT. As alterações, mediadas por MGO, nos resíduos de arginina, lisina e triptofano das apo A-I são críticas para a ativação da LCAT e a atividade da enzima varia de acordo com o grau de glicação da apo A-I (Nobecourt et al., 2007). Além disso, a atividade da CETP encontra-se aumentada frente à modificação, *in vivo* e *in vitro*, de HDL, LDL e VLDL por glicação. Este evento condicina maior transferência de CE de HDL para lipoproteínas potencialmente aterogênicas que podem ser captadas por macrófagos arteriais (Passarelli et al., 1997).

Estima-se que, em macrófagos sobrecarregados com esteroides, aproximadamente 20% do efluxo de colesterol para aceptores específicos ocorra por intermédio do receptor ABCG-1, 35% do ABCA-1 e 10% do SR-BI, sendo o restante por difusão (Adorni et al., 2007; Wang et al., 2007; Tarr et al., 2009).

Aceptores inespecíficos de lípides, como a albumina, podem remover colesterol celular (Fielding e Moser, 1982; Zhao e Marcel, 1996), por meio da

interação com domínios particulares da membrana plasmática que favorecem a difusão de colesterol em fluxo lento e bidirecional.

Albumina modificada por glicação avançada *in vitro* (albumina AGE), obtida pelo tratamento com diferentes concentrações de oxoaldeídos, como GO, MGO e GAD, remove maior quantidade de colesterol celular, porém prejudica o efluxo de colesterol mediado por HDL_3. Esses eventos relacionam-se com o grau de modificação da albumina por glicação (Machado et al., 2006) e podem ser prevenidos por inibidores de glicação avançada, como aminoguanidina e metformina, que diminuem a formação de CML nessas albuminas. Parte do efeito da albumina AGE sobre a redução no efluxo de colesterol mediado por HDL_3, ocorre pela diminuição da ligação específica de HDL à superfície celular. Nesse sentido, Pinto et al. (2009) demonstraram, recentemente, que a albumina AGE reduz a expressão de ABCA-1 e ABCG-1 em macrófagos, o que foi vinculado à maior geração de ROS pelo sistema NADPH oxidase e mitocondrial.

Na presença de albumina AGE observa-se maior expressão de receptores SR-BI, SR-A, LOX-1, CD-36 e RAGE em macrófagos (Ywashima et al., 2000; Pinto et al., 2007), com maior captação de LDL por macrófagos (Castilho et al., 2006).

Ohgami et al. (2001b) demonstraram que a albumina modificada por glicação avançada - produzida pela exposição a 1,6 M de glicose por 40 semanas - diminui a captação seletiva de colesterol esterificado da HDL pelos receptores hepáticos SR-BI, prejudicando a útlima etapa do TRC.

A glicoxidação intracelular, induzida pelo tratamento com açúcares dicarbonila, reduz a expressão do receptor ABCA-1 em macrófagos e fibroblastos, com severo prejuízo na remoção de colesterol, mediada por apo A-I. Tal decréscimo na quantidade do receptor ocorre mesmo na ausência de variação no RNA mensageiro, sugerindo que vias de degradação pós-traducionais estejam envolvidas na redução do transportador. Em consequência, observa-se acúmulo de colesterol celular, o qual é prevenido pelo uso de aminoguanidina (Passarelli et al., 2005). A contrapartida *in vivo*, é evidenciada pela redução na quantidade do receptor de HDL, observada em macrófagos da lesão aterosclerótica de suínos tratados com estreptozotocina (Passarelli et al., 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A albumina glicada é um importante marcador do controle glicêmico no DM e sua concentração associa-se positivamente com o desenvolvimento de complicações macrovasculares. A modificação *in vitro* de albumina por glicação avançada prejudica o fluxo de lípides em macrófagos, por reduzir a remoção de colesterol pela HDL_3 (Machado et al., 2006). Este evento é decorrente da redução da expressão dos receptores de HDL (ABCA-1 e ABCG-1), bem como da maior expressão de receptores que reconhecem lipoproteínas modificadas (Pinto et al., 2007; Pinto et al., 2009).

Embora a meia-vida plasmática da albumina glicada seja reduzida (Morris e Preddy, 1986; Layton e Jerums, 1988; Kallner, 1990; Miyata et al., 1996), considera-se a modificação desta proteína no interstício arterial, onde são gerados intermediários carbonila, em decorrência da metabolização celular de glicose e reações inflamatórias que caracterizam o processo aterosclerótico. Analogia é feita em relação à LDL oxidada a qual é, invariavelmente, associada ao desenvolvimento de aterosclerose, escassa na circulação, porém abundante no microambiente arterial.

A hipótese deste estudo é a de que, à semelhança da glicação *in vitro*, a modificação *in vivo* da albumina no diabete melito com controle glicêmico inadequado possa conferir prejuízo ao balanço de colesterol em macrófagos, favorecendo o acúmulo intracelular de lípides.

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da albumina isolada de indivíduos controles (C) e de portadores de DM 1 e DM 2, com controle glicêmico inadequado, sobre o fluxo de lípides em macrófagos. Foram determinados em macrófagos incubados com albumina C, DM 1 e DM 2:

1) o efluxo de colesterol, mediado por apo A-I, HDL_3 e $HDL_{2;}$
2) o acúmulo de lípides intracelulares;
3) o conteúdo do receptor de HDL, ABCA-1;
4) a captação seletiva de colesterol esterificado de HDL;
5) a expressão diferencial de genes.

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

Indivíduos controles (C) foram selecionados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Pacientes portadores de DM 1 e DM 2, de ambos os sexos, foram selecionados no Ambulatório de Diabetes e na Liga de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Todos os participantes assinaram termo de consentimento informado, segundo critério de aprovação pela Comissão de Ética do HCFMUSP (CAPPesq: 740/06).

Foram selecionados pacientes com valores de HbA_{1c} superiores a 1,5% do limite de normalidade (valor de referência 6,0%) e com concentração plasmática de triglicérides abaixo de 400 mg/dL. Não foram incluídos no protocolo indivíduos com hipotiroidismo e hipertiroidismo descompensado, insuficiência renal ou hepática, microalbuminúria e etilistas.

No grupo C (n = 12), 2 indivíduos tomavam enalapril e 1 indivíduo tomava L-tiroxina. Três eram tabagistas. No grupo DM 1 (n = 13), 11 pacientes utilizavam insulina NPH e 2, insulina glargina. Todos os pacientes utilizavam insulina lispro antes das refeições. Um paciente utilizava carbamazepina; 1, fluoxetina e 2, L-tiroxina. Um era tabagista.

No grupo DM 2 (n = 12), os medicamentos (n) utilizados foram: insulina NPH (10), estatinas (10), sulfoniluréias (7), metformina (7), acarbose (2), pioglitazona (1), fibratos (2), inibidores da ECA (5) e ácido acetilsalicílico (8). Dois indivíduos eram tabagistas.

Amostras de sangue dos participantes de todos os grupos foram colhidas após um período de 12 h de jejum para determinação da concentração circulante de: TSH, T4, T4 livre, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, creatinina, uréia, sódio, potássio, glicose, frutosamina, HbA_{1c}, colesterol total e frações (HDL, LDL, VLDL), triglicérides e albumina. Amostras de urina foram colhidas para dosagem de microalbuminúria.

4.2. Quantificação da porcentagem de albumina glicada no plasma

Albumina modificada por glicação precoce foi quantificada por método enzimático (*Kit Lucica GA*-L, gentilmente cedido pela Asahikasei Pharma Co, Tóquio, Japão) no plasma dos indivíduos C, DM 1 e DM 2. Nesse processo, albumina glicada é hidrolisada por uma proteinase específica que digere os aminoácidos glicados. Estes, então, são oxidados por uma cetoamina oxidase com a liberação de peróxido de hidrogênio, o qual é determinado por espectrometria. Os valores de albumina glicada foram normalizados pela concentração de albumina sérica, determinada pelo método BCP (*Bromocresol purple)* (Kouzuma et al,. 2002; Kouzuma et al,. 2004).

$$\% \text{ albumina glicada} = \frac{\text{albumina glicada}}{\text{Albumina}} \times 100$$

4.3. Isolamento da albumina sérica

Amostras de sangue dos participantes de todos os grupos, após jejum de 12 h, foram coletadas em tubos secos e, imediatamente, centrifugadas a 3000 rpm, por 20 min, a 4°C, para obtenção do soro. A este, foram adicionados os seguintes conservantes (µL/mL de plasma): 20 µL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%), 10 µL de azida sódica (5%) (Merck, Darmastadt, 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 PMFS (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30 mM de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras foram estocadas a -70°C até posterior processamento.

A albumina foi extraída por cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*), utilizando-se coluna de afinidade para albumina, HiTrap^{tm}Blue (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Primeiramente, as amostras de soro de cada indivíduo foram dialisadas contra solução de 50 mM de KH_2PO_4, pH 7,0 (Tampão A) e filtradas em filtro de 0,45 µm. A coluna HiTrap^{tm}Blue conectada ao FPLC foi equilibrada com o Tampão A. Um mL de soro de cada indivíduo foi injetado no FPLC, em uma taxa de fluxo de 1 mL/min, com eluição com o tampão contendo 50 mM KH_2PO_4, 1,5 M KCl, pH 7,0. Ao final de cada sequência, a coluna foi reequilibrada com o Tampão A. As amostras foram estocadas a -70°C (**figura 4**).

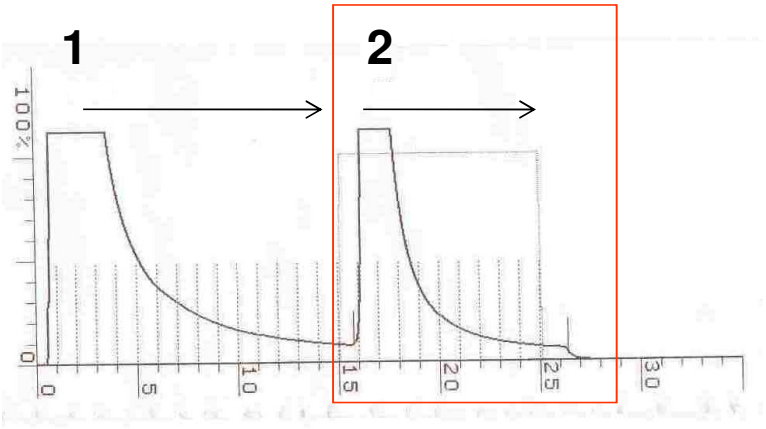


Figura 4. Extração de albumina do soro dos indivíduos do grupo C, DM 1 e DM 2 por FPLC, utilizando-se coluna HiTrap^{tm}Blue

Durante a extração de albumina do soro humana foram gerados dois picos: no primeiro (1) foi extraído o soro livre de albumina e no segundo (2), a albumina. Todos os pacientes mantiveram o mesmo perfil de extração de albumina.

4.4. Purificação da albumina sérica por extração alcoólica

A purificação da fração de albumina isolada por cromatografia foi realizada de acordo com adaptação do método descrito por Ohkawara et al. (2002). Duzentos microlitros de ácido tricloroacético (TCA) 10% foram adicionados a 200 µL da fração de albumina. As amostras foram agitadas em vortex e deixadas em repouso por 10 min a temperatura ambiente, sendo, a seguir, centrifugadas por 2 min a 10000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 600 µL de etanol absoluto (Merck, Darmastadt, Alemanha). As amostras foram, então, centrifugadas por 2 min a 10000 g, com remoção cuidadosa do sobrenadante contendo a albumina purificada.

A concentração final de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). As amostras foram estocadas a -70°C. Previamente à utilização da albumina nos experimentos, todo o etanol das amostras foi evaporado sob fluxo de nitrogênio, e diluídas em etanol em volume não superior a 0,1% do volume final de meio de cultura a ser utilizado no tratamento celular.

Com esses procedimentos, obteve-se uma banda de 66 kDa, equivalente à banda obtida com albumina altamente purificada, disponível comercialmente (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), que foi utilizada como padrão (**figura 5**).

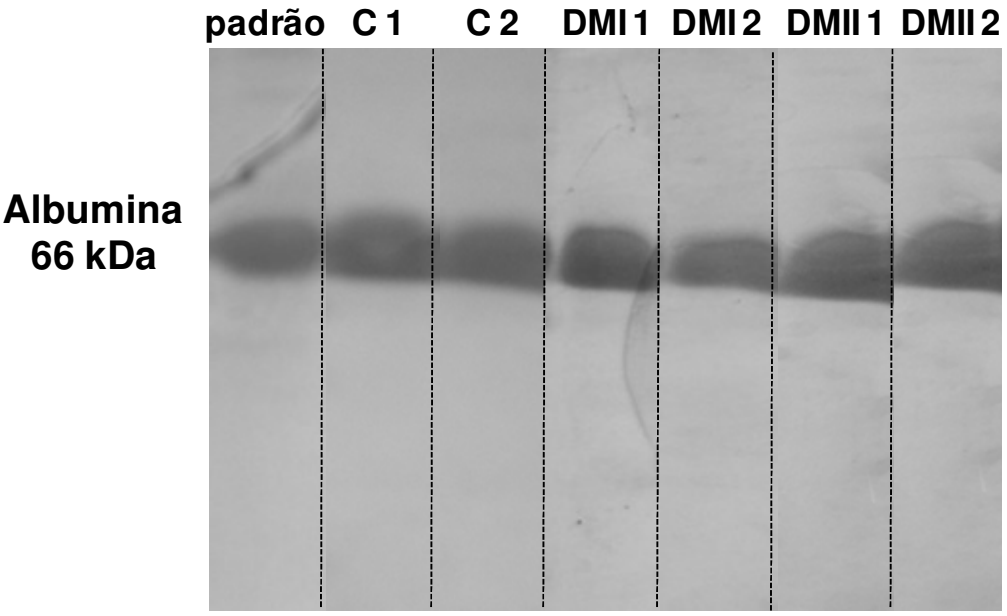


Figura 5. Eletroforese de albumina isolada de indivíduos C e portadores de DM 1 e DM 2

Albumina isolado do soro dos indivíduos controles (C) e de portadores de DM 1 e DM 2, por FPLC (100 µg) e purificadas por extração alcoólica foram aplicadas em gel de acrilamida 10%, com coloração por *Coomassie Blue.*

padrão → padrão de albumina humana altamente purificada (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

4.5. Preparo da albumina glicada *in vitro*

Albumina humana 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; Na_2HPO_4 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K_2PO_4 1 mmol/L) com EDTA (pH = 7,4). Albumina controle (C) foi preparada na presença de PBS apenas.

As incubações foram realizadas sob condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37°C, com agitação por 4 d. 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).

4.6. Dosagem de endotoxinas

A quantidade de endotoxina na albumina humana modificada por glicação avançada *in vitro* e naquelas isoladas do soro de indivíduos C, DM 1 e DM 2 foi determinada por meio do ensaio da *Limulus Amebocyte Lysate (LAL)* (Cape Cod, Falmouth, MA, EUA).

A concentração de endotoxinas nas albuminas foi inferior a 50 pg/ mL, abaixo do limite associado ao potencial inflamatório das albumina AGE em modelos celulares (Valencia et al., 2004; Isoda et al., 2007).

4.7. Determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML)

A determinaçao do conteúdo de carboximetil-lisina (CML) na albumina humana isoladas do soro de indivíduos C, DM 1 e DM 2 foi determinada por ELISA (*CircuLex™ N-epsilon Carboxymethyl Lysine ELISA Kit: Cat# CY-8066*, CycLex Co, Japão).

4.8. Determinação do conteúdo de apo A-I

A determinação do conteúdo de apo A-I na albumina humana isolada do soro de indivíduos C, DM 1 e DM 2 foi feita por nefelometria (*Wako Autokit apo A-1* código 991-2720, Wako Pure Chemical Industries, Inc, Osaka, Japan).

4.9. Teste de viabilidade celular

Após exposição à albumina, foi determinada a liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura, a qual reflete a citotoxicidade celular (*In Vitro Toxicology Assay Kit,* Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após remoção do meio de cultura das células tratadas, este foi centrifugado a 250 g por 4 min. Foram adicionados 75 µL de meio de cultura a 150 µL do MIX do Kit (*Assay Subtrate + Assay Cofactor + Dye Solution)*, com incubação a temperatura ambiente por 20 a 30 min. Esse ensaio é baseado na redução do NAD pela ação da LDH. O NAD reduzido (NADH) resultante reage com o corante tetrazolium, o que resulta em uma coloração que pode ser medida por espectrofotometria a 490 nm.

A liberação de lactato desidrogenase ao meio de cultura foi determinada em todos os experimentos e foi semelhante entre os tratamentos com albumina C, DM 1 e DM 2 (dados não mostrados). Portanto, as albuminas isoladas do soro humano não foram tóxicas aos macrófagos.

4.10. Obtenção de lipoproteínas

Lipoproteína de densidade baixa (LDL; d = 1,019 - 1,063 g/mL) e as subfrações de HDL_2 (d = 1,063 - 1,125 g/mL) e HDL_3 (d = 1,125 - 1,21 g/mL) foram isoladas a partir de *pool* de plasma humano por ultracentrifugação sequencial e purificadas por gradiente descontínuo de densidade (Havel et al., 1955). Sangue foi colhido por punção venosa, após 12 h de jejum e imediatamente centrifugado por 20 min a 4℃, 3000 rpm. Ao plasma foram adicionados os seguintes conservantes (µL/mL de plasma): 20 µL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%), 10 µL de azida sódica (5%) (Merck, Darmastadt, 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 PMFS (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30 mM de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e a densidade ajustada com brometo de potássio (KBr) (Merck, Darmastadt, Alemanha) (Havel et al., 1955; Redgrave et al., 1975).

4.11. Acetilação de LDL

As LDL foram acetiladas segundo protocolo descrito por Basu et al. (1976). Foram utilizados 16 mg de proteína de LDL, aos quais foram adicionados 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de NaCl 0,15 M, sob agitação constante e banho de gelo. Foram, então, adicionados 24 µL de anidrido acético em pequenas quantidades durante 1 h, seguindo-se de 30 min de agitação em banho de gelo.

A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra em tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mmol/L; Na_2HPO_4 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K_2PO_4 1 mmol/L) com EDTA (pH = 7,4) e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

4.12. Determinação do efluxo de ^{14}C-colesterol em macrófagos

Utilizaram-se macrófagos J-774 de linhagem tumoral de camundongos, gentilmente doadas pelo laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-38). As células foram cultivadas em garrafas de 75cm^2, em meio RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 100 U/mL de penicilina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e 2 mM glutamina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), mantidas em incubadora de CO_2 5% a 37°C.

Os macrófagos foram incubados em placas de cultura com 24 poços em concentração de 0,8 x 10^6 células/mL de RPMI (Gibco) contendo 10% SFB, antibióticos e glutamina. Após confluência, foram incubados com DMEM (*Low Glucose,* Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescido com 50 μg de LDL acetilada/mL e 0,3 μCi de ^{14}C-colesterol/Ml mL (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 48 h. Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato (PBS - NaCl 150 mmol/L, Na_2HPO_4 20 mmol/L, NaH_2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L - pH 7,4) com FAFA, as células foram tratadas, por 18h, com meio DMEM (*Low Glucose,* Gibco) suplementado com 1 mg de albumina não glicada, glicada *in vitro* ou purificadas do soro de indivíduos C, DM 1 e DM 2.

Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram incubadas novamente com albumina não glicada, glicada *in vitro* e dos indivíduos C, DM 1 e DM 2, na presença ou ausência de apo A-I (30 μg/mL), HDL_3 (50 μg/mL) ou HDL_2 (50 μg/mL). O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, para remoção de restos celulares e transferido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora (Perkin Elmer, Turko, Finlândia).

Os poços das placas foram lavados com solução fisiológica gelada (4°C) por 2 vezes. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck, Darmastadt, Alemanha) e a radioatividade determinada após evaporação do solvente. As células foram incubadas com

250 μL de NaOH 0,2 N, durante 3 h, a temperatura ambiente, seguindo-se a determinação da concentração de proteína, pelo método de Lowry et al. (1951).

A quantidade de radioatividade presente no meio, ao final do período de incubação com apo A-I (8 h), HDL_3 (5 h) ou HDL_2 (8h), indicou o efluxo de colesterol mediado pela albumina - meio com albumina apenas - e o efluxo total - meio com albumina + apo A-I, HDL_3 ou HDL_2 -. Dessa forma, foi calculado o efluxo específico mediado pela apo A-I, HDL_3 ou HDL_2, subtraindo o efluxo mediado pela albumina do efluxo total.

A porcentagem de efluxo foi calculada como:

$$\frac{^{14}\text{C-colesterol no meio}}{^{14}\text{C-colesterol no meio} + ^{14}\text{C-colesterol na célula}} \times 100$$

4.13. Análise qualitativa do conteúdo de lípides em macrófagos

Macrófagos J-774 foram cultivados, até confluência, em meio RPMI (Gibco) contendo 10% de SFB (Cultilab), 100 μg/mL de estreptomicina (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 2 mM glutamina (Gibco), em incubadora de CO_2 5% a 37°C. Os macrófagos foram incubados em placas de cultura com 12 poços cobertas com lamínulas de vidro autoclavadas previamente, em concentração de 3×10^6 células/mL de meio.

Após confluência, os macrófagos foram incubados com DMEM (*Low Glucose,* Gibco) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich), acrescido com 50 μg de LDL acetilada/mL durante 48 h. A seguir, foram tratadas por 18 h com DMEM contendo 1mg/mL de albumina

não glicada, glicada *in vitro* e isolada dos indivíduos C, DM 1 e DM 2. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram incubadas novamente com albumina não glicada, glicada *in vitro* e isolada dos indivíduos C, DM 1 e DM 2 na presença ou ausência de apo A-I (30 μg), HDL_3 (50 μg) ou HDL_2 (50 μg) por mL DMEM.

Passado este período de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS/FAFA e fixadas com solução de formalina 10% em PBS, por 1 h, a temperatura ambiente. Os macrófagos foram corados com solução de *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 0,5% em propileno glicol por 2 h, seguido de lavagem com água destilada. As placas de cultura foram, então, colocadas em estufa a 32°C por 45 min.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas em solução de glicerina Jelly, e as células visualizadas em microscópio óptico (*Olympus Microscope BX-51*, Leeds Precision Instruments, Inc). As imagens foram capturadas por câmera (*Sony CCD Camera*) acoplada a microscópio. Dez campos de cada lâmina foram analisados na magnitude de 400 x.

A coloração com *Oil Red O* foi quantificada de maneira cega por um único investigador, utilizando o *software* específico (*Image-Pro Plus* - Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) versão 6,0 para Windows. O conteúdo de lípides foi expresso como porcentagem do contetúdo de *Oil Red O* no campo pela área total (todo o campo da lâmina detectado pelo *software*).

4.14. Determinação do conteúdo de ABCA-1

A expressão de ABCA-1 foi determinada por citometria de fluxo no Laboratório de Bioenergética do Departamento de Patologia Clínica da UNICAMP (Prof. Aníbal Eugenio Vercesi).

Macrófagos J-774 foram cultivados, até confluência, em meio RPMI (Gibco) contendo 10% de SFB (Cultilab), 100 μg/mL de estreptomicina (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 2 mM glutamina (Gibco), em incubadora de CO_2 5% a 37°C. Os macrófagos foram incubados em garrafas de 75cm^2 e mantidos em incubadora de CO_2 5% a 37°C.

Após confluência, os macrófagos foram incubados com DMEM (*Low Glucose,* Gibco) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich) por 24 h. A seguir, foram tratadas por 18 h com DMEM contendo 1mg/mL de albumina isolada dos indivíduos C, DM 1 e DM 2.

Passado o período de tratamento, foi realizada cuidadosa remoção do meio e lavagem das células. As células foram removidas da garrafa utilizando-se 2 mL de tripsina com EDTA, por 3 min a 37°C. Foi feita a contagem da viabilidade celular pelo método de exclusão com o corante Trypan Blue 0,4% (em PBS - NaCl 150 mmol/L, Na_2HPO_4 20 mmol/L, NaH_2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L - pH 7,4).

As células foram descoladas das placas de cultura, sobre gelo. A seguir, foram separadas $1x10^6$ de células que foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4%. As células foram incubadas com anticorpo anti-ABCA1 1:250 (NB 100-2068, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, EUA)

por 1 h a temperatura ambiente. Ao final desta incubação, as células foram submetidas a duas lavagens e foram posteriormente incubadas com o anticorpo secundário *Alexa Flúor* 488 4µg/mL (Invitrogen, Eugene, Oregon, EUA) por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas por 2 vezes em PBS e as unidades de fluorescência foram captadas em citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD, Beckton e Dickson). Os resultados obtidos foram analisados no *Software Cellquest* (BD, Beckton e Dickson).

4.15. Marcação de HDL com ^{3}H colesteril oleoil éter

O colesteril oleoil éter é um análogo não metabolizado do colesterol esterificado. A quantidade de radioatividade no meio intracelular permite, portanto, calcular a massa de colesterol esterificado advindo das HDL.

O *pool* de HDL isolado de indivíduos controles saudáveis foi marcado com ^{3}H colesteril oleoil éter (^{3}H-COE) mL (Amersham Biosciences, Reino Unido) de acordo com modificações do protocolo descrito por Terpstra et al. (1989). Para cada 1 mL de HDL total, foram adicionados 0,5 mL de plasma isento de lipoproteínas (como fonte de proteínas de transferência de colesterol) e 40 µCi de ^{3}H-COE mL (Amersham Biosciences, Reino Unido), que ficaram em agitação lenta, durante 5 min, à temperatura ambiente. A seguir as amostras foram mantidas em banho a 37°C, sob agitação lenta, durante 24 h.

HDL total marcada foi então purificado por meio de ultracentrifugação sequencial (rotor 50 Ti, 100 000 x g, 4°C) segundo descrito por Havel et al. (1955). Após a purificação, ^{3}H-COE-HDL foi dialisada contra solução de PBS

com EDTA 0,2 mmol/L (pH 7,4) e então foi esterilizada em filtro 0,22 µm e estocado a 4°C. Foram realizadas dosagens de colesterol para cálculo da atividade específica e de proteínas para a realização das incubações.

4.16. Captação celular de ^{3}H colesteril oleoil éter de HDL

Utilizaram-se células de ovário de hamster chinês, transfectadas com o cDNA murínico do receptor SR-BI (ldlA7-SRBI) e controles (ldlA7-C) que foram, gentilmente, cedidas pelo Professor Monty Krieger do Massachussets Institute of Technology, Cambridge, EUA.

O cultivo celular foi realizado em meio HAM F-12 (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) , contendo 10% de SFB (Cultilab), 2 mM de glutamina (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 0,25 µg/mL de anfotericina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) B (meio A). ldlA-SRBI foram cultivadas em meio A suplementado com 300 µg/mL de geneticina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) para manter a pressão de transfecção (meio B).

Células controles e transfectadas foram incubadas em placas com 24 poços na concentração de 0,08 x 10^{6} cél/mL em meio HAM F-12 (Gibco). Após confluência, as células foram incubadas por 8 h com albumina isolada dos indivíduos C e pacientes com DM 1 e DM 2 na presença de 50 µg de ^{3}H-COE-HDL em DMEM (*Low Glucose,* Gibco). Passado o tempo de incubação, os poços das placas foram lavados com solução fisiológica gelada (4°C). Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck) e a radioatividade determinada, após evaporação do solvente. As

células foram incubadas com 250 μL de NaOH 0,2 N, durante 3 h, a temperatura ambiente, para lise celular e medida da concentração de proteína, pelo método de Lowry et al. (1951).

A partir dos valores de radioatividade presentes nas células e da atividade específica da HDL determinou-se a massa de colesterol celular proveniente da HDL.

4.17. Perfil de expressão em microarranjos de oligonucleotídeos (*microarray*)

Para os ensaios de *microarray,* foram utilizadas as lâminas da Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) no formato de 4 poços com 44 mil genes (4x44K), contendo todo o genoma do camundongo, seguindo o protocolo *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Agilent).

4.17.1. Extração de RNA

Macrófagos de peritônio de camundongo da linhagem suíça foram colocados em placa de Petri na concentração de 15 $x10^6$ células em meio RPMI (Gibco) contendo 10% de SFB (Cultilab), 100 μg/mL de estreptomicina (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 2 mM glutamina (Gibco), em incubadora de CO_2 5% a 37°C. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram tratadas por 18 h com 1 mg de albumina não glicada, glicada *in vitro* e isolada dos indivíduos C e portadores de DM 1 e DM 2 (*pool* de 5 pacientes, em triplicata biológica) em DMEM. Passado o período de incubação, retirou-se o meio de cultura e as células foram diluídas em 1 mL de Tryzol

(Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA) em temperatura ambiente, por no máximo 5 min, e foram congeladas a - 80°C (**figura 6**).

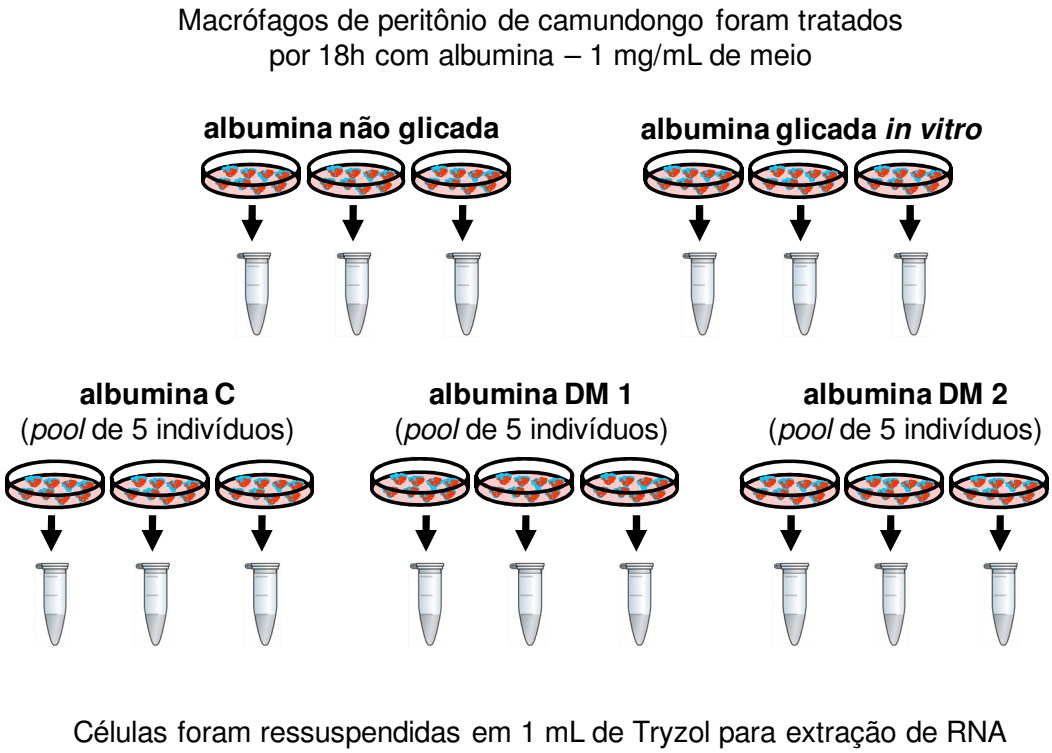


Figura 6. Protocolo de tratamento dos macrófagos com albumina não glicada, modificada por glicação *in vitro* ou isolada de indivíduos C, DM 1 e DM 2

Para a extração de RNA, foi utilizado o kit RNA Isolation Qiagen RNeasy Mini Colums (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha). Adicionou-se 200 µL de clorofórmio em cada amostra, seguido de agitação por 15 segundos. As amostras ficaram em repouso por 3 min e, então, foram centrifugadas por 15 min 12000 g a 4º C. Após a centrifugação, o sobrenadante que continha o RNA foi transferido para tubos livres de RNase. Adicionou-se 450 µL de

etanol 70% (diluído em água bidestilada) às amostras que foram agitadas cuidadosamente. 700 µL de cada amostra foram transferidos às colunas de purificação e seguiu-se o protocolo de acordo com a orientação do fabricante do kit.

Ao final do procedimento, o RNA foi diluído em 30 µL de água ultrapura estéril tratada com dietilpirocarbonato 0,01% e foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop DN1000 UV-VIS Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies). Para verificar a presença das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 18 e 28s, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 3,0 µg/mL e visualização em transiluminador de UV em comprimento de onda 203 nm (**figura 7**).

As amostras de RNA foram, também, submetidas a eletroforese capilar, utilizando-se o kit *RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies) e leitura do sinal de fluorescência no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) para determinação simultânea da quantidade e integridade do RNA (**tabela 1**).

Tabela 1. Integridade do RNA isolado de macrófagos tratados com albumina não glicada, glicada *in vitro* (albumina GAD) e isolada de indivíduos C, DM 1 e DM 2

albumina	RIN (*RNA integrity number*)		
não glicada	8,6	8,2	8,2
GAD	8,4	8,8	8,6
C	8,8	8,6	8,8
DM 1	9,1	8,6	8,7
DM 2	8,4	8,4	8,7

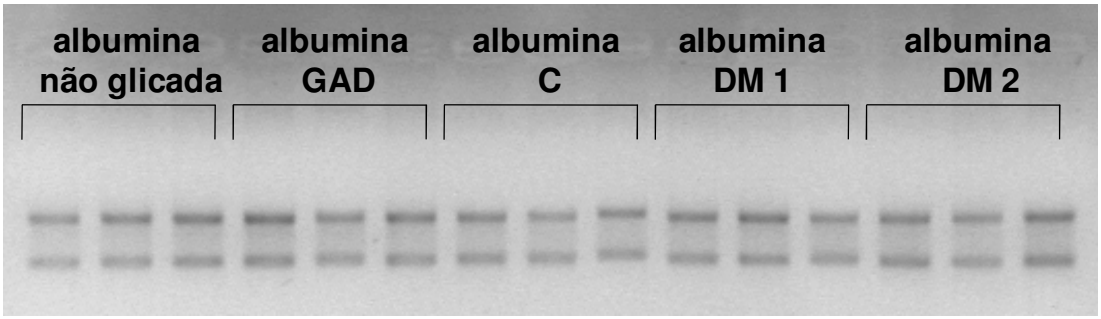


Figura 7. Gel de integridade do RNA extraído de macrófagos tratados albumina não glicada, albumina GAD e albumina isolada de indivíduos C, DM 1 e DM 2

Trezentos nanogramas de RNA de cada amostra foram colocados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (EtBr) 3,0 µg/mL. A corrida foi feita em 100 V por 40 min e a visualização em transiluminador de luz UV em comprimento de onda 203 nm.

albumina não glicada → padrão de albumina humana purificada (Sigma-Aldrich).

albumina GAD → padrão de albumina humana purificada (Sigma-Aldrich) submetida à glicação *in vitro* com glicolaldeído.

4.17.2. Síntese de cDNA e cRNA marcado com cianina-3

Para fazer a síntese do cDNA e cRNA marcado com cianina-3, utilizaram-se os reagentes do *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O cDNA foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA total de cada tratamento celular com albumina não glicada, glicada *in vitro* e isolada dos indivíduos C e portadores de DM 1 e DM 2. Todos os RNA foram diluídos em água ultrapura estéril tratada com dietilpirocarbonato 0,01% a 5,3 µL.

Foi feita uma diluição seriada do padrão interno (*Agilent One-Color Spike-Mix* - Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), e este foi adicionado (5 µL) aos RNA em uma concentração final de 1:5, em tampão de diluição do Kit. Também foram adicionados aos RNA, 1,2 µL de T7 primer promotor (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). As amostras foram mantidas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Massachusetts, EUA) a 65°C por 10 min, seguido de incubação sob gelo por 5 min.

Foi, então, preparada uma solução contendo *5x First Strand Buffer* (4 µL), previamente aquecida em banho a 80°C por 4 min, 0,1M DTT (2 µL) e 10 mM dNTP mix (1 µL) juntamente com 1 µL da transcriptase reversa (MMLV-RT) e 0,5 µL do inibidor de RNase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A solução foi adicionada às amostras e estas ficaram no termociclador a 40°C por 2 h, para a síntese do cDNA. Passado o período

de incubação, as amostras foram colocadas em banho a 65°C por 15 min, seguido de incubação sob gelo por 5 min.

O cRNA marcado foi sintetizado pela adição da solução de transcrição, preparado com 15,3 μL de água livre de RNase, 20 μL do tampão de transcrição (4x), 6 μL de 0,1 M DTT, 8 μL do NTP mix, 6,4 μL de PEG 50%, previamente aquecido em banho a 40°C por 1 min, 0,5 μL do inibidor de RNase, 0,6 μL da fosfatase inorgânica, 0,8 μL RNA polimerase (*T7 RNA Polymerase*) e 2,4 μL de cianina-3 (*Cyanine 3-CTP*), protegida da luz. As amostras foram incubadas no termociclador 40°C por 2 h e, a seguir, colocadas sob gelo em ambiente escuro para purificação com o kit *Qiagen RNeasy Mini Colums* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha).

Ao final do procedimento, o cRNA marcado com cianina-3 foi diluído em 30 μL de água ultrapura estéril tratada com dietilpirocarbonato 0,01%. A quantificação de cianina-3 (pmol/μL), a razão 260 nm/280 nm e a concentração de cRNA (ng/μL) foi determinada em espectrofotômetro *NanoDrop DN1000 UV-VIS Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies), utilizando o programa *Microarray Measurement – NanoDrop* (**tabela 2**).

Atividade específica superior a 8,5 foi considerada como marcação adequada do cRNA com cianina-3. A atividade específica foi calculada como:

$$\frac{\text{Concentração de cianina-3}}{\text{Concentração de cRNA x 1000}} = \text{pmol de cianina-3/μg cRNA}$$

Tabela 2. Eficiência de marcação do cRNA com cianina-3

albumina	[RNA] µg/µL	Cianina-3 pmol/µL	Atividade específica > 8,5
não glicada	11,6	108	9,3
GAD	11,9	108	8,7
C	12,3	132	10,7
DM 1	14,2	160	10,9
DM 2	9,8	106	9,9

Um micrograma de RNA total de cada tratamento foram utilizados para fazer a síntese do cDNA e cRNA marcado com cianina-3 com os reagentes do *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

albumina não glicada → padrão de albumina humana purificada (Sigma-Aldrich)

albumina GAD → padrão de albumina humana purificada (Sigma-Aldrich) submetida à glicação *in vitro* com glicolaldeído

4.17.3. Hibridização das lâminas

Para hibridização das lâminas, foi utilizado o *kit Agilent Gene Expression Hybridization* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). cRNA marcado com cianina-3 (1,65 µg), protegido da luz, foi adicionado a 11 µL da solução de bloqueio (10X), preparado previamente conforme orientação do fabricante, 41,8 µL de água livre de RNAse e 2,2 µL do tampão de fragmentação (25X). As amostras foram incubadas em banho a 60°C por exatos 30 min para fragmentação do RNA, em ambiente escuro. Após este período, as amostras foram colocadas sob gelo e, imediatamente,

e acrescidas com 55 µL do tampão *GEX HI-RPM* de hibridização (2X) em cada tubo, agitando cuidadosamente e evitando a formação de bolhas.

Cem microlitros da solução de hibridização foram colocados cuidadosamente sobre a lâmina de vedação e sobre a mesma foi colocada a lâmina contendo os oligonucleotídeos. As lâminas foram acondicionadas em câmaras de hibridização que foram colocadas em forno, previamente aquecido a 65°C, por 19 h a 10 rpm (*DNA Microarray Hybridization Oven,* Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

4.17.4. Lavagem das lâminas e detecção do sinal

Pelo fato da cianina-3 ser suscetível à degradação pelo ozônio, seguiu-se o procedimento de lavagem recomendado pela fabricante para locais onde a taxa de ozônio é muito elevada, como é o caso da América Latina.

As lâminas foram retiradas do forno e da câmara de hibridização e foram colocadas em um reservatório de vidro para cuidadosa lavagem em ambiente escuro. A primeira lavagem foi feita com o tampão de lavagem 1 com 0,005% de Triton X-102 a temperatura ambiente por 1 min, seguindo-se de lavagem com o tampão de lavagem 2 com 0,005% de Triton X-102, previamente aquecido a 37°C, por 1 min. Em seguida, em capela escura, as lâminas foram lavadas por 10 segundos com acetonitrila (Vetec Química Final Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e por 30 segundos com solução de estabilização e secagem. Todas as lavagens foram feitas com agitação em velocidade mínima.

O *Microarray Scanner SureScan High-Resolution Technology* (Agilent Technologies*)* foi utilizado para capturar as imagens e a intensidade dos sinais que foram analisadas com o auxílio do programa *Agilent Scan Control* e do *software Agilent Feature Extraction* (Agilent Technologies).

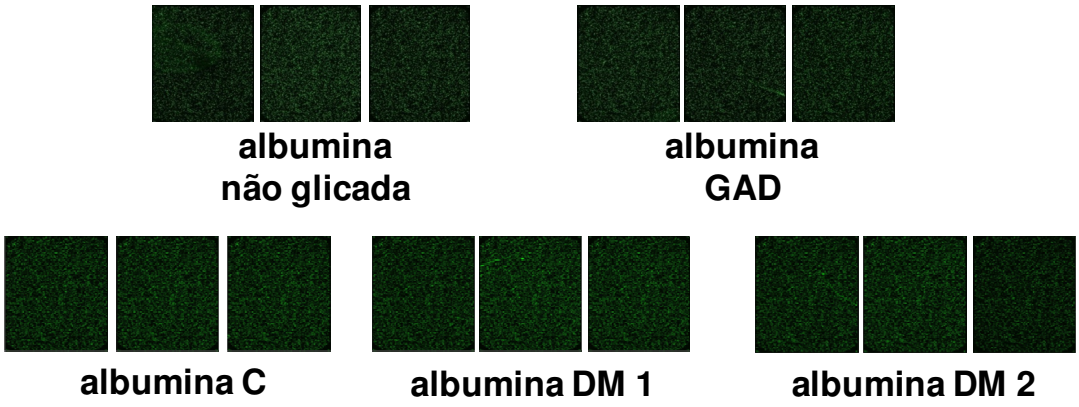


Figura 8. Hibridização e leitura das lâminas

A: Lâminas hibridizadas

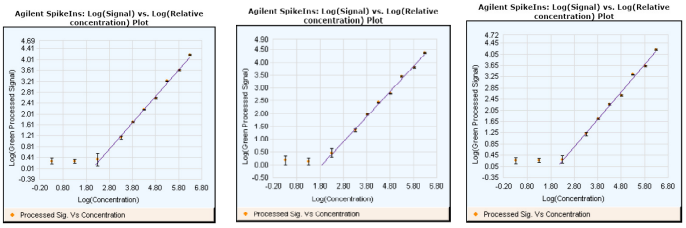
cRNA marcado com cianina-3 (1,65 µg) de cada tratamento foi utilizado na hibridização das lâminas da Agilent (kit Agilent Gene Expression Hybridization). O *Microarray Scanner SureScan High-Resolution Technology* (Agilent Technologies) foi utilizado para capturar as imagens e a intensidade dos sinais que foram analisados com o auxílio do programa *Agilent Scan Control* e do *software Agilent Feature Extraction* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

albumina não glicada → padrão de albumina humana purificada (Sigma-Aldrich)

albumina GAD → padrão de albumina humana purificada (Sigma-Aldrich) submetida à glicação *in vitro* com glicolaldeído

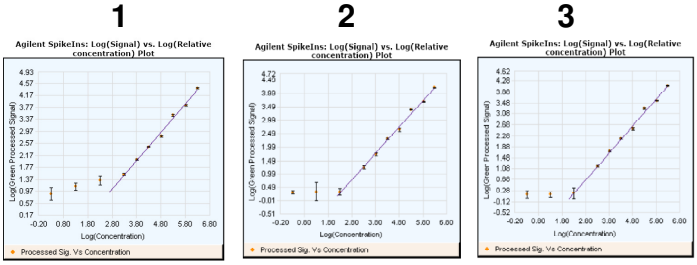
albumina não glicada

1 2 3



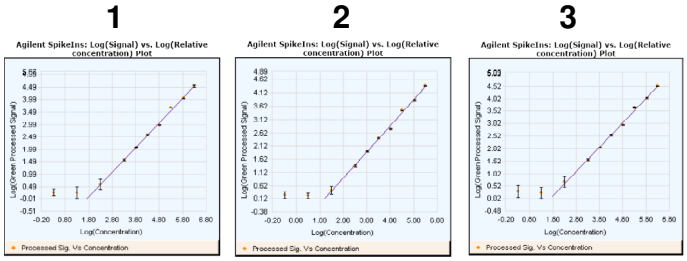
albumina GAD

1 2 3



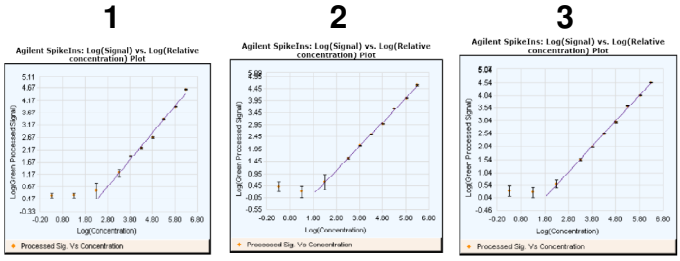
albumina C

1 2 3



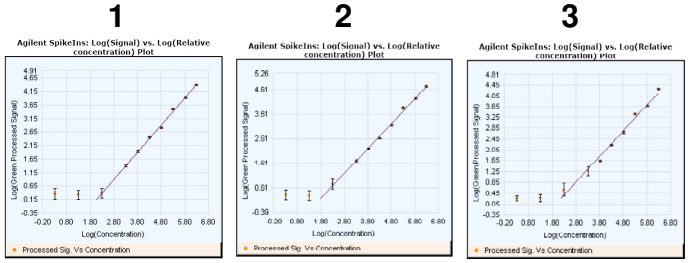
albumina DM 1

1 2 3



albumina DM 2

1 2 3



B: curvas do padrão interno (*Agilent One-Color Spike-Mix*)

Tabela 3. Variação experimental e qualidade do sinal processado

albumina		Variação < 5% *	Sinal Processado 15% = bom 10% = ótimo < 5% = excelente
não glicada	1	0,17%	5,3%
	2	0,05%	4,7%
	3	0,05%	5,3%
GAD	1	0,09%	6,3%
	2	0,04%	4,6%
	3	0,02%	4,0%
C	1	0,01%	4,3%
	2	0,06%	4,7%
	3	0,18%	5,4%
DM 1	1	0,18%	4,8%
	2	0,05%	5,2%
	3	0,03%	4,6%
DM 2	1	0,15%	6,5%
	2	0,06%	4,9%
	3	0,16%	5,5%

* em referência ao padrão interno.

4.17.5. Normalização e análise estatística dos dados

Para análise dos dados do *microarray* foi utilizado o programa *Genespring GX 11.0* (Agilent Technologies Inc). Foi feita a normalização logarítimica dos dados e foram excluídos pontos (*spots*) de baixa qualidade. Desta forma, foi possível ser determinada a expressão relativa de cada gene.

Seguiu-se, então, 3 passos para obtenção da seleção final dos genes:

1) comparação entre os grupos por teste t de *Student* ($p<0,05$) com correção de *Benjamini-Hochberg* com FDR (*false discovery rate*):
   - albumina DM 1 x albumina C
   - albumina DM 2 x albumina C
   - albumina GAD x albumina não glicada
2) escolha dos genes que tiveram uma variação na magnitude de expressão maior ou igual a 2 ou a -2.
3) interpretação dos resultados a partir da análise do *Gene Ontology*.

4.18. Análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Com o intuito de comprovar a expressão diferencial de alguns genes identificados nos ensaios de *microarray*, foi realizada a quantificação do conteúdo de mRNA, por transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real, utilizando os sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

A primeira etapa do RT-PCR consite na transcrição reversa, ou seja, síntese de cDNA a partir de 500 ng do RNA extraído. Foram utilizadas as mesmas amostras de RNA que foram utilizadas no *microarray*. Para este procedimento foi utilizado o kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo do produto – 60 min a 37^{o}C, 5 min a 95^{o}C, seguido de incubação 4^{o}C. O cDNA obtido foi armazenado a - 20 ^{o}C até a realização do PCR.

A segunda etapa consiste na análise de expressão gênica por amplificação do cDNA em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM (*6-carboxy-fluorescein*) adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) identificadas pelos códigos descritos na **tabela 4**.

O gene da β-actina foi escolhido como normalizador da reação de PCR, pois de acordo com a análise estatística do *microarray*, foi um gene que não apresentou variação na sua expressão entre os diferentes grupos de tratamento.

Na seleção das sondas, tomou-se o cuidado de escolher aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir o impacto de contaminação por DNA. Os demais reagentes para a reação de PCR foram adquiridos em solução denominada *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no

aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *StepOne Software 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que geram curvas logaritímicas dos sinais de amplificação. O programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo *t threshold* (C_t) (Bustin e Mueller, 2005; Kubista et al., 2006). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o do gene da β-actina que foi utilizado como controle endógeno da reação.

Para cada gene em questão, foi feita curva de diluição com 5 pontos, a partir da concentração 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625 com a finalidade de verificar a lineriadade e eficiência da amplificação, permitindo validar o método de Ct comparativo (Livak e Schmitgen, 2001; Pfaffl, 2001). Por meio da curva, foi possível determinar a concentração ideal de cDNA a ser usada em cada ensaio.

Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt = Ct gene alvo – Ct do controle endógeno, pois os ensaios de PCR tiveram alta eficiência (90 a 110%) (Livak e Schmitgen, 2001). Na **tabela 4** estão apresentados os dados das sondas, os resultados de inclinações das curvas (*slopes*) e as eficiências dos ensaios.

Tabela 4. Códigos das sondas, valores de inclinação da curva e eficiência dos ensaios de RT-PCR em tempo real

Primers	Sondas (Applied Biosystems)	Eficiência (%)	Inclinação da curva	R^2
ABCA-1 *(ATP binding cassete transporter A-1)*	Mm00442663_m1	91,4	- 3,6	0,989
ABCG-1 *(ATP binding cassete transporter G-1)*	Mm01348250_m1	90,5	- 3,5	0,995
SR-AI (*MSR1 - macrophage scavenger receptor 1)*	Mm00446214_m1	100,2	- 3,3	0,993
Receptor de LDL (B/E) (*low density lipoprotein receptor)*	Mm00440169_m1	100,4	- 3,3	0,999
BMF (*BCL2 modifying factor)*	Mm00506773_m1	96,6	- 3,4	0,996
β-actina	Mm00607939_s1	95,8	- 3,4	0,999

4.19. Análise Estatítica

Para a análise estatística, utilizou-se o programa GraphPad Prism, versão 4.00 (GraphPad Softwares, EUA). Os dados foram apresentados como média ± EP (erro padrão). A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância de um fator (ANOVA), com pós-teste de *Dunnett's* (comparando-se o grupo DM 1 ou DM 2 com o grupo controle) ou *Newman-Keuls* (comprando-se os três grupos conjuntamente). Foi considerado como significante toda situação em que o nível descritivo de significância foi menor a 5% ($p < 0,05$).

Para análise dos dados do *microarray,* utilizou-se o programa *Genespring GX 11.0* (Agilent Technologies Inc). A comparação entre os grupos foi por teste t de *Student* ($p<0,05$) com correção de *Benjamini-Hochberg* com FDR (*false discovery rate*). Foram escolhidos genes que tiveram uma variação na magnitude de expressão maior ou igual a 2 ou a -2.

5. RESULTADOS

Foram incluídos neste estudo 12 indivíduos controles (10 mulheres e 2 homens), 13 portadores de DM 1 (6 mulheres e 7 homens) e 11 de DM 2 (8 mulheres e 3 homens).

A média de idade e de IMC foi maior no grupo DM 2 em comparação ao grupo C e DM 1 **(tabela 5).** Não houve diferença de peso entre os três grupos e o tempo de doença foi semelhante entre DM 1 e DM 2 **(tabela 5)**.

Tabela 5. Idade, dados antropométricos e tempo de DM

	C (n = 12)	**DM 1 (n = 13)**	**DM 2 (n = 11)**
Idade (anos)	30 ± 6	26 ± 6	58 ± 15*
Peso (Kg)	72,6 ± 19,1	62,3 ± 7,9	74,8 ± 14,9
Altura (m)	1,69 ± 0,12	1,66 ± 0,08	1,62 ± 0,09
IMC (Kg/m^2)	25,2 ± 4,3	22,7 ± 2,7	28,6 ± 4,4*
Tempo de DM (anos)	-	14 ± 7	15 ± 7

IMC = índice de massa corporal

* p<0,05 comparado a C ou DM 1 (ANOVA de 1 fator - pós teste de *Newman-Keuls*; média ± DP)

Glicemia, HbA_{1c}, frutosamina e albumina glicada foram superiores nos grupos DM 1 e DM 2 em comparação ao C **(tabela 6)**. Não se observou diferença na concentração plasmática de albumina e microalbuminúria entre os 3 grupos **(tabela 6)**.

Tabela 6. Parâmetros glicêmicos, concentração de albumina e microalbuminúria

	C (n = 12)	**DM 1 (n = 13)**	**DM 2 (n = 11)**
Glicose (mg/dL)	78 ± 6	186 ± 79*	229 ± 71*
HbA_{1c} (%)	5,3 ± 0,4	10,0 ± 1,8*	10,4 ± 1,3*
Frutosamina (µmol/L)	238 ± 25	456 ± 94*	401 ± 82*
Albumina Glicada (%)	9,8 ± 1,8	27,1 ± 7,0*	24,4 ± 7,6*
Albumina (g/dL)	5,1 ± 0,4	4,8 ± 0,8	4,6 ± 0,4
Microalbuminúria (mg/dL)	7,7 ± 6,6	10,6 ± 7,8	11,5 ± 5,8

* $p<0,05$ comparado a C (ANOVA de 1 fator - pós teste de *Newman-Keuls;* média ± DP)

Avaliando-se os grupos conjuntamente, observou-se correlação positiva entre albumina glicada e concentração plasmática de frutosamina (**figura 9**), HbA_{1c} (**figura 10**) ou glicemia (**figura 11**).

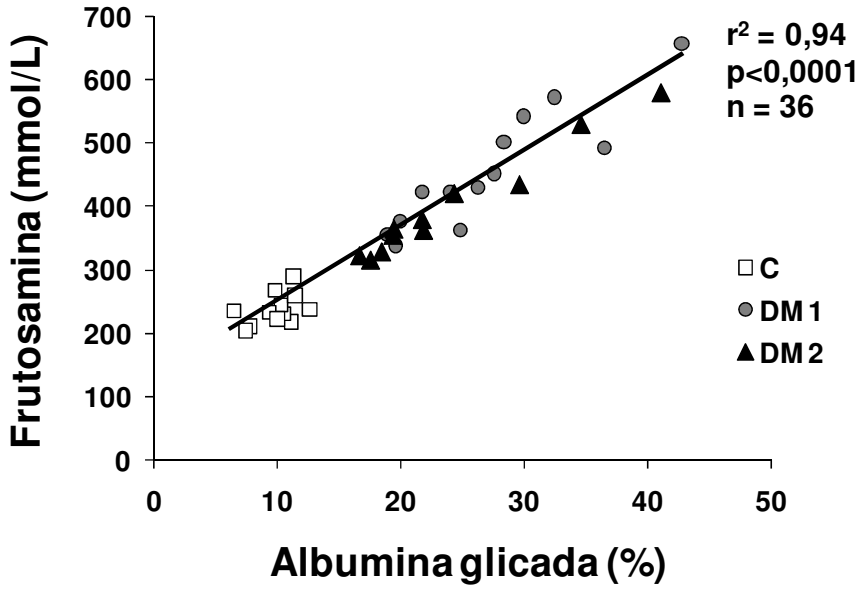


Figura 9. Correlação de Pearson entre albumina glicada e frutosamina dos grupos C, DM 1 e DM 2

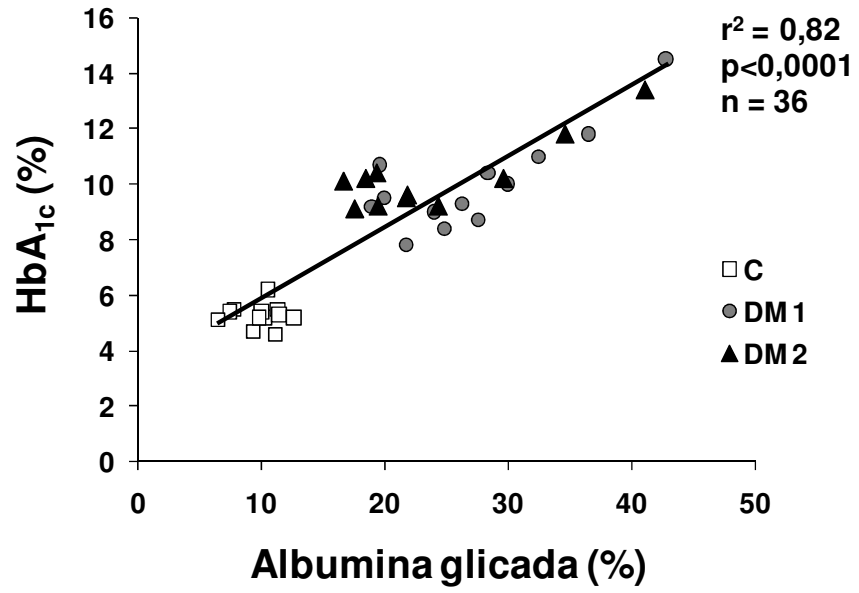


Figura 10. Correlação de Pearson entre albumina glicada e hemoglobina glicada (HbA_{1c}) dos grupos C, DM 1 e DM 2

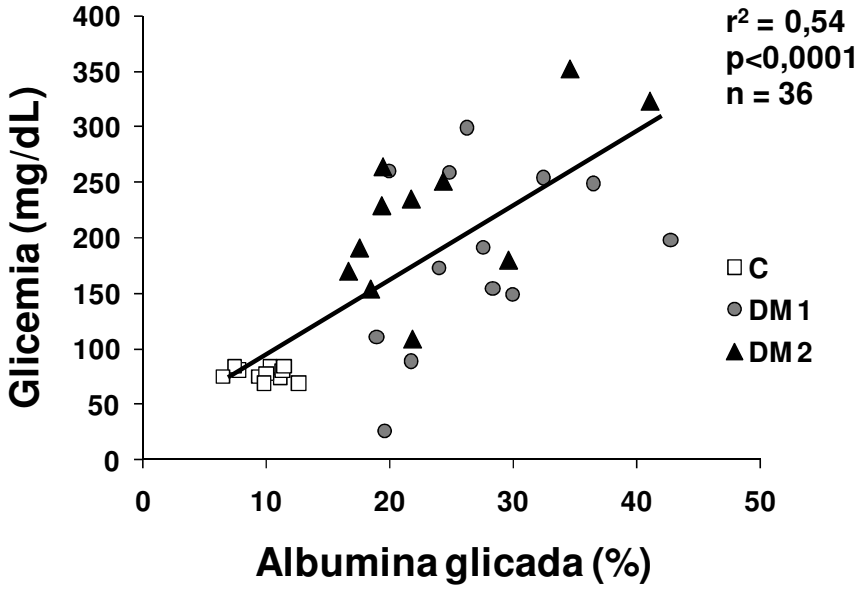


Figura 11. Correlação de Pearson entre albumina glicada e glicemia dos grupos C, DM 1 e DM 2

A concentração plasmática de colesterol total (CT) e frações não foi diferente entre os grupos; no entanto, a concentração de triglicérides (TG) foi superior no grupo DM 2 em comparação ao C e DM 1 **(tabela 7)**.

Tabela 7. Perfil lipídico dos indivíduos C e portadores de DM 1 e DM 2

	C (n = 12)	**DM 1 (n = 13)**	**DM 2 (n = 11)**
CT (mg/dL)	170 ± 21	160 ± 25	187 ± 37
HDL-c (mg/dL)	66 ± 16	57 ± 12	56 ± 22
LDL-c (mg/dL)	84 ± 16	84 ± 23	101 ± 34
VLDL-c (mg/dL)	20 ± 11	18 ± 9	30 ± 14
TG (mg/dL)	99 ± 54	92 ± 47	175 ± 103*

* p<0,05 comparado a C e DM 1 (ANOVA de 1 fator - pós teste de *Newman-Keuls*; média ± DP)

O conteúdo de carboximetil-lisina (CML), corrigido por miligrama de proteína, foi superior nas albuminas dos grupos DM 1 e DM 2, em comparação ao grupo C **(figura 12)**.

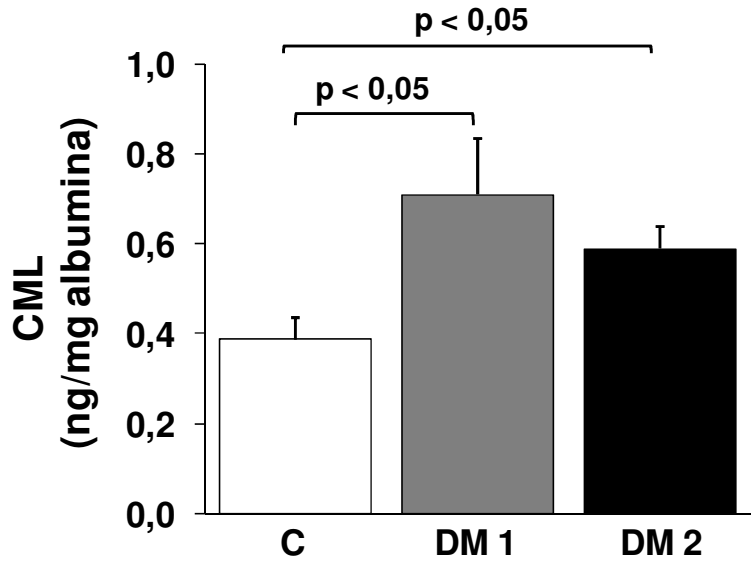


Figura 12. Conteúdo de carboximetil-lisina (CML) nas albuminas isoladas de C, DM 1 e DM 2

A determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML) foi realizada por ELISA (*CircuLex™ N-epsilon Carboxymethyl Lysine ELISA Kit: Cat# CY-8066*, CycLex Co, Japão), nas albuminas isoladas do soro dos indivíduos C (n = 10), DM 1 (n = 11) e DM 2 (n = 9). *Kruskal-Wallis* – pós teste *Dunn´*s; média ± EP.

Avaliando-se os grupos conjuntamente, foi observada correlação positiva entre o conteúdo de CML na albumina e a porcentagem de albumina glicada no plasma (**figura 13**). O conteúdo de CML na albumina também se correlacionou com concentração plasmática de frutosamina (**figura 14**).

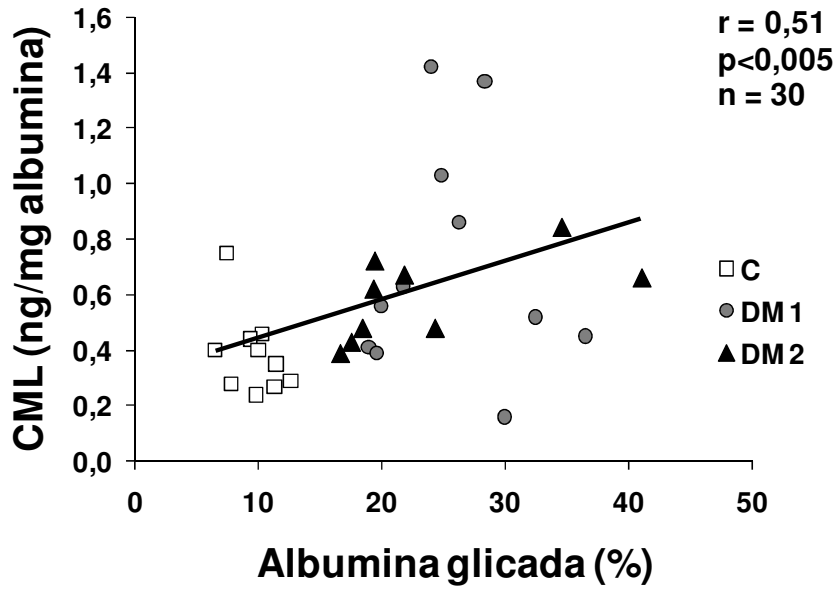


Figura 13. Correlação de Spearman entre conteúdo de CML na albumina e porcentagem de albumina glicada no plasma dos grupos C, DM 1 e DM 2

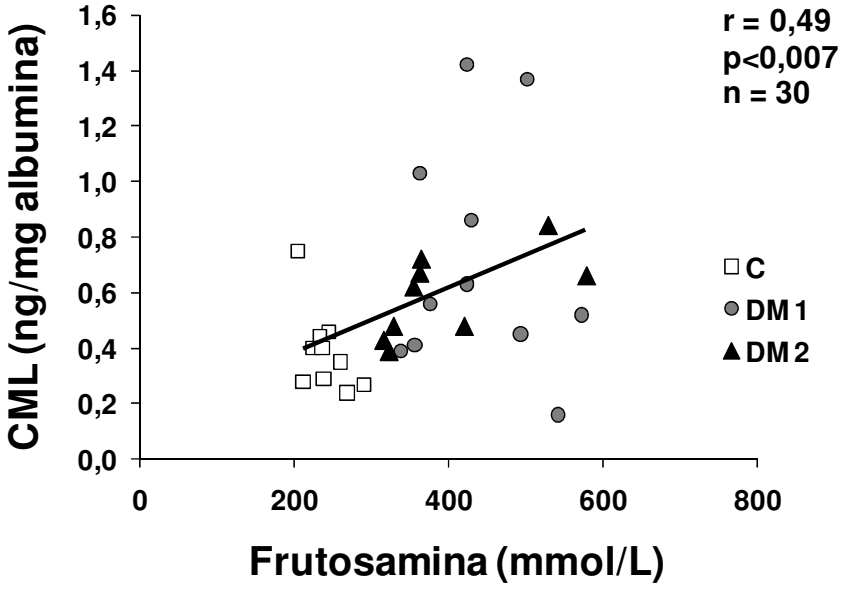


Figura 14. Correlação de Spearman entre conteúdo de CML na albumina e frutosamina plasmática dos grupos C, DM 1 e DM 2

Macrófagos da linhagem J-774 foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C, DM 1 e DM 2, seguindo-se incubação na presença de apo A-I, HDL_3 ou HDL_2, respectivamente, por mais 8 h, 5 h e 8 h. A porcentagem de efluxo de ^{14}C-colesterol, mediado por apo A-I, HDL_3 e HDL_2, dimuiu 45%, 55% e 54%, respectivamente, após exposição à albumina DM 2 em comparação à albumina C. A albumina DM 1 diminuiu o efluxo de colesterol mediado por apo A-I (70%) e HDL_2 (55%), mas não afetou a remoção de lípides mediada por HDL_3, em comparação à albumina C (**figura 15**).

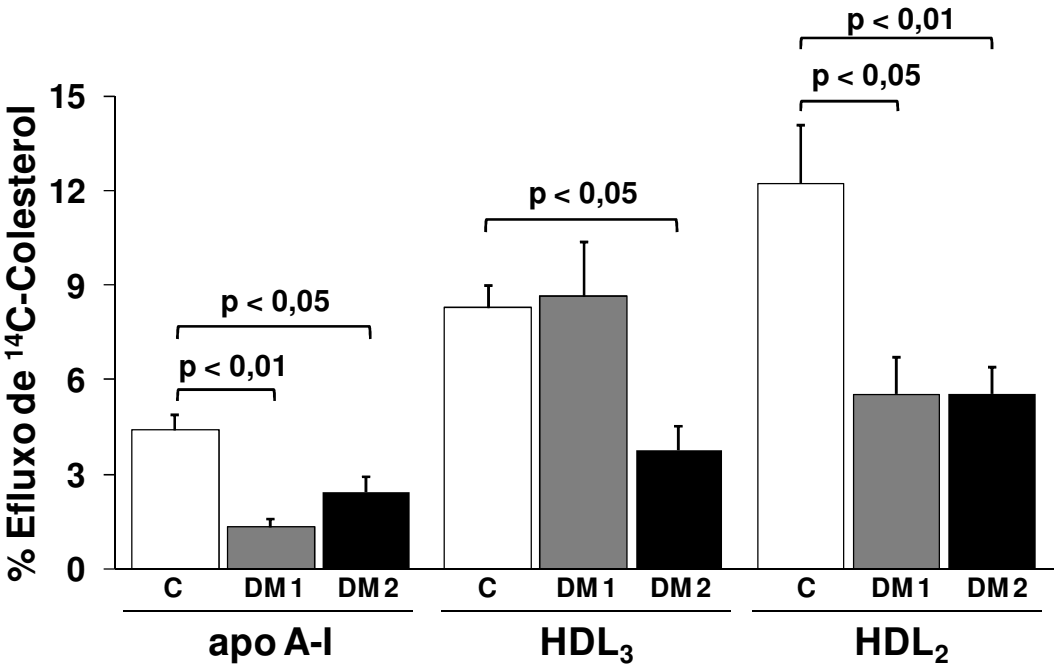


Figura 15. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos J-774, mediado por apo AI, HDL_3 ou HDL_2, após tratamento com albumina C, DM 1 ou DM 2

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada e 14C-colesterol, foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C (n = 5), DM 1 (n = 5) ou DM 2 (n = 5) (1 mg/mL de DMEM). O efluxo de ^{14C}-colesterol foi determinado, após adição de apo A-I (30 μg/mL), HDL_3 (50 μg/mL), HDL_2

(50 μg/mL), por respectivamente, 8 h, 5 h e 8 h. ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP.

Na ausência de aceptores específicos de colesterol, a albumina DM 1 e DM 2 removeram maior quantidade de ^{14}C-colesterol de macrófagos em comparação à albumina C (**figura 16**).

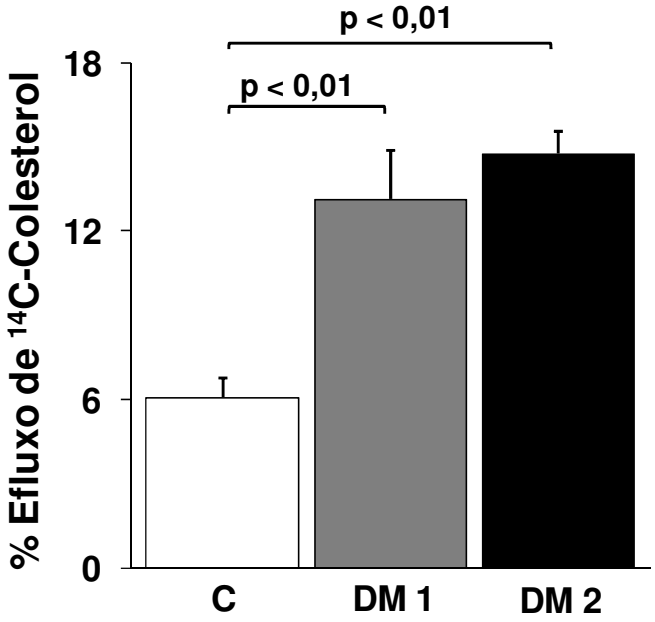


Figura 16. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos J-774, mediado por albumina C, DM 1 ou DM 2

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol, foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C (n = 5), DM 1 (n = 5) ou DM 2 (n = 5) (1 mg/mL de DMEM). O efluxo de ^{14}C-colesterol foi determinado após mais 8 h de exposição às albumina C, DM 1 ou DM 2 apenas. ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP.

O conteúdo de apo A-I, corrigido por miligrama de albumina, foi maior na albumina DM 1 e DM 2, em comparação à albumina C (**figura 17**).

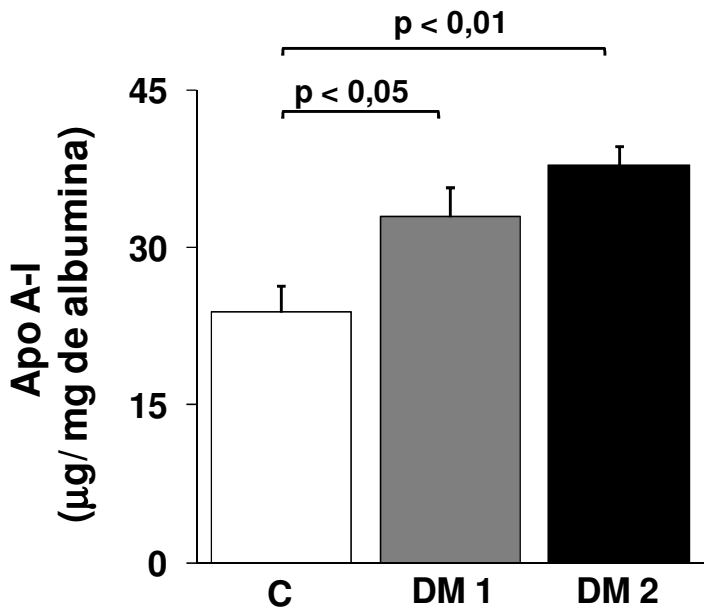


Figura 17. Conteúdo de apo A-I na albumina C, DM 1 e DM 2

O conteúdo de apo A-I foi determinado por nefelometria (*Wako autokit apo A-1* 991-2720, Wako Pure Chemical Industries Inc, Osaka, Japan) nas albuminas isoladas do soro dos indivíduos C (n = 10), DM 1 (n = 10) e DM 2 (n = 9). ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP.

Macrófagos tratados com albumina DM 1 ou DM 2, na ausência de aceptores específicos de colesterol, apresentaram conteúdo lipídico, evidenciado por coloração com *Oil Red O*, semelhante ao de células tratadas com albumina C (**figura 18, painel A**). Após exposição à apo A-I, observou-se maior coloração por *Oil Red O* em células tratadas com albumina DM 1 ou DM 2, em comparação àquelas tratadas com albumina C (**figura 18, painel B**).

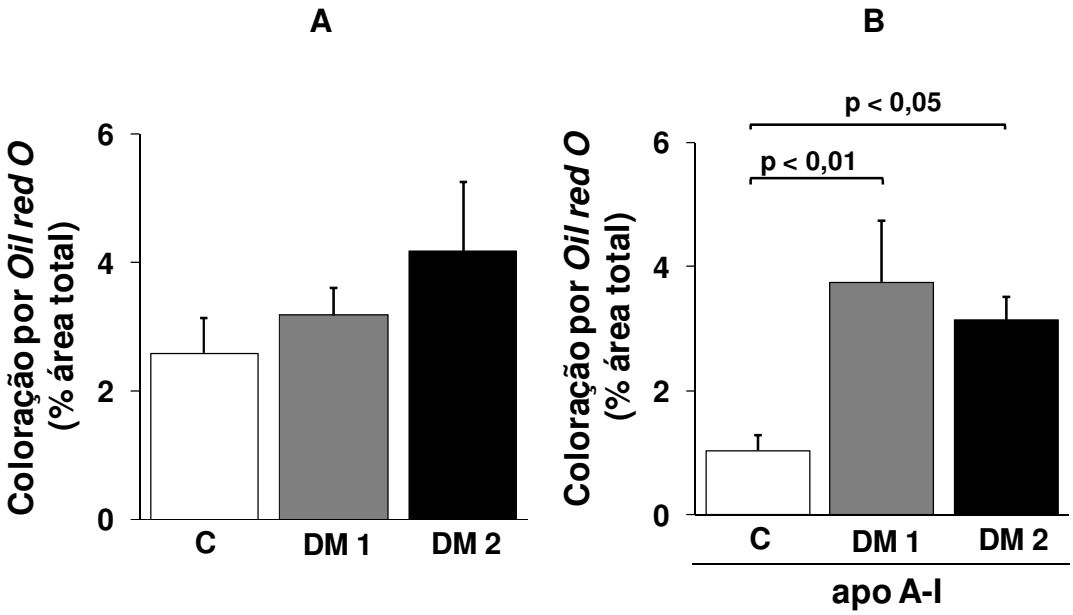


Figura 18. Coloração de lípides intracelulares por *Oil Red O* em macrófagos tratados com albumina C, DM 1 ou DM 2, na ausência ou presença de apo A-I

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C (n = 5), DM 1 (n = 5) ou DM 2 (n = 5) (1 mg/mL de DMEM). As células permaneceram por mais 8 h nessas condições (painel A) ou o meio foi acrescido com 30 μg/mL de apo A-I (painel B). Solução de formalina 10% foi utilizada para fixação celular, seguindo-se coloração com *Oil Red O* 0,5% e quantificação pelo *software Leica Qwin Imaging*. Os dados foram expressos como porcentagem da área total (conteúdo de *Oil Red O* no campo/campo total da lâmina). ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP.

Resultados semelhantes foram observados em macrófagos expostos à albumina DM 1 ou DM 2 na presença de HDL_3 (**figura 19**) ou HDL_2 (**figura 20**). Macrófagos incubados com albumina C, DM 1 ou DM 2, apenas, apresentaram conteúdo lipídico semelhante (**figura 19, painel A** e **figura 20, painel A**). Após adição de HDL_3 ou HDL_2, houve redução do conteúdo

intracelular de lípides, em macrófagos tratados com albumina C, mas não com albumina DM 1 ou DM 2 (**figura 19, painel B** e **figura 20, painel B**).

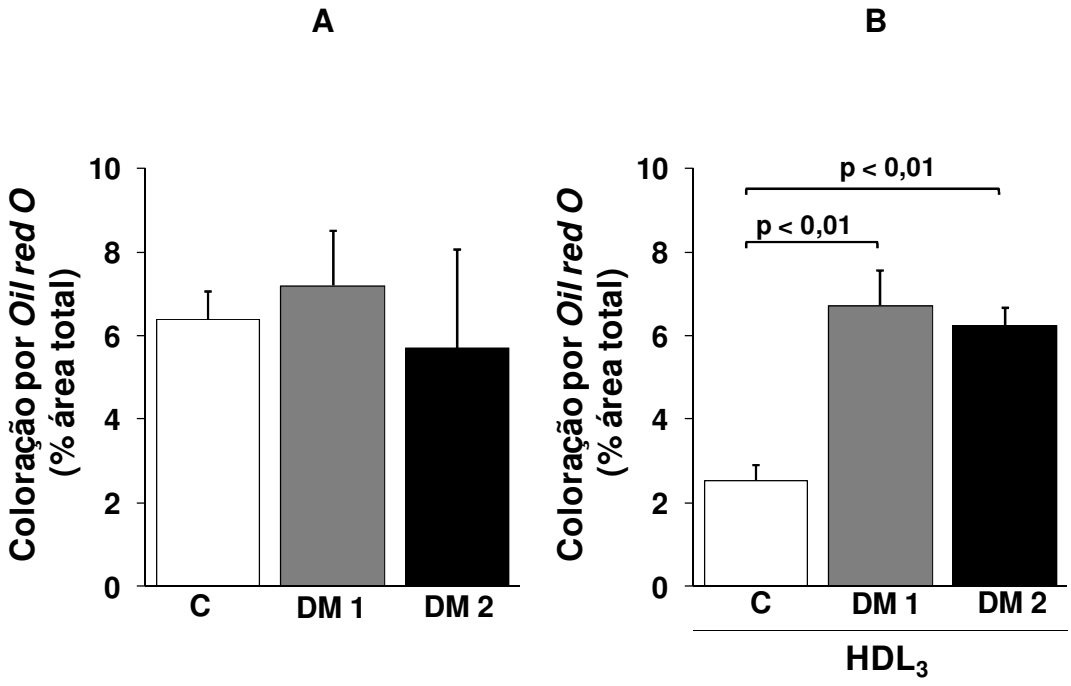


Figura 19. Coloração de lípides intracelulares por *Oil Red O* em macrófagos tratados com albumina C, DM 1 ou DM 2, na ausência ou presença de HDL_3

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C (n = 6), DM 1 (n = 6) ou DM 2 (n = 6) (1 mg/mL de DMEM). As células permaneceram por mais 5 h nessas condições (painel A) ou o meio foi acrescido com 50 µg/mL de HDL_3 (painel B). Solução de formalina 10% foi utilizada para fixação celular, seguindo-se coloração com *Oil Red O* 0,5% e quantificação pelo software *Leica Qwin Imaging*. Os dados foram expressos como porcentagem da área total (conteúdo de *Oil Red O* no campo/campo total da lâmina). ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP.

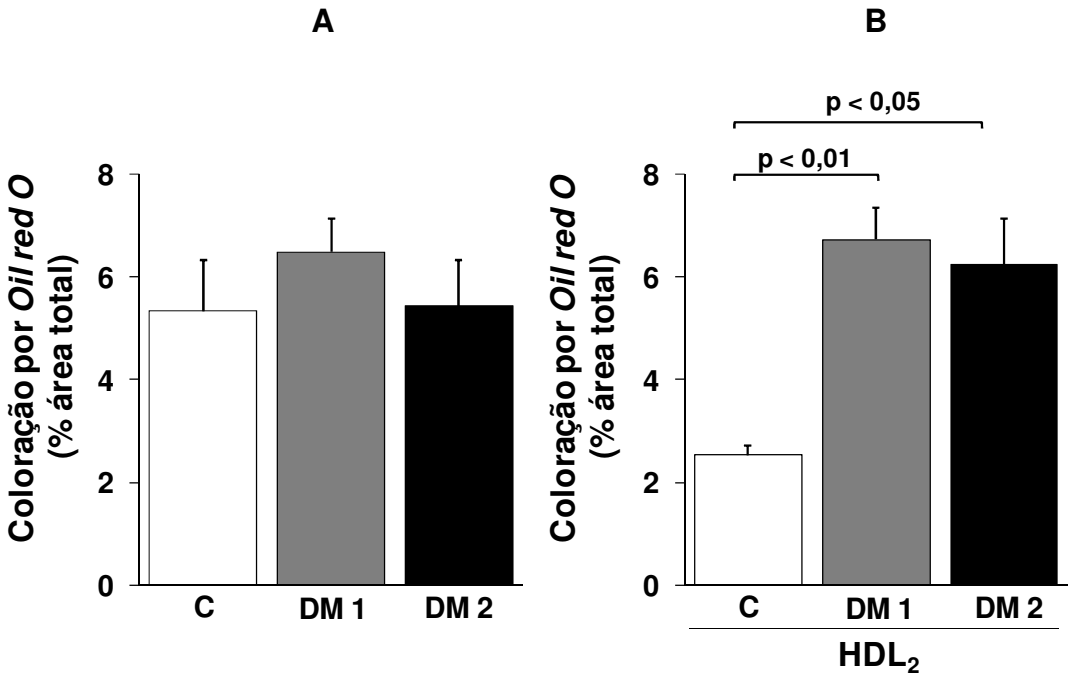


Figura 20. Coloração de lípides intracelulares por *Oil Red O* em macrófagos tratados com albumina C, DM 1 ou DM 2, na ausência ou presença de HDL_2

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C (n = 6), DM 1 (n = 6) ou DM 2 (n = 6) (1 mg/mL de DMEM). As células permaneceram por mais 8 h nessas condições (painel A) ou o meio foi acrescido com 50 µg/mL de HDL_2 (painel B). Solução de formalina 10% foi utilizada para fixação celular, seguindo-se coloração com *Oil Red O* 0,5% e quantificação pelo software *Leica Qwin Imaging*. Os dados foram expressos como porcentagem da área total (conteúdo de *Oil Red O* no campo/campo total da lâmina). ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´s*; média ± EP.

Considerando-se que a modificação *in vivo* de albumina por glicação avançada prejudicou a remoção de colesterol de macrófagos por apo A-I e subfrações de HDL, avaliamos a expressão do receptor ABCA-1. Esta foi reduzida em macrófagos tratados com albumina DM 1 (82%) e DM 2 (25%) (**figura 21, painel A e B**, respectivamente), em comparação às células expostas à albumina C.

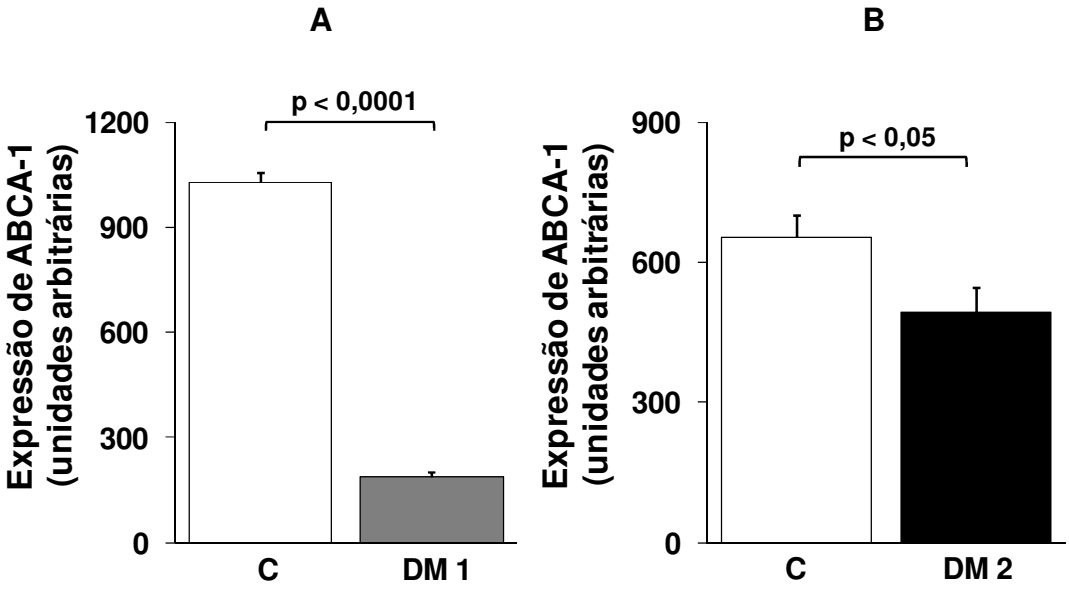


Figura 21. Conteúdo de ABCA-1 em macrófagos J-774, após tratamento com albumina C, DM 1 ou DM 2

Macrófagos J-774 foram tratados, por 18 h, com albumina isolada de indivíduos C (n = 6), DM 1 (n = 6) - painel A - ou DM 2 (n = 6) - painel B (1 mg/mL de DMEM). Passado o período de tratamento, $1x10^6$ células foram fixadas com paraformaldeído 4%. As células foram incubadas com anticorpo anti-ABCA-1, 1:250 (*Novus Biologicals*) por 1 h, seguindo-se incubação com 4µg/mL de anticorpo secundário *Alexa Flúor* 488 (*Invitrogen, EUA*) (1 h). As unidades de fluorescência foram captadas em citômetro de fluxo FACSCalibur (*BD, Beckton e Dickson*) e os resultados analisados no *Software Cellquest* (*BD, Beckton e Dickson*). Teste t de *Student*; média ± EP.

A utilização da albumina glicada *in vitro,* produzida pelo tratamento com 10 mM de glicolaldeído (albumina GAD), reproduziu os achados obtidos com albumina modificada *in vivo*. À semelhança da albumina isolada de pacientes portadores de DM, a albumina GAD reduziu o efluxo de colesterol de macrófagos, mediado por apo A-I (43%), HDL_3 (20%) e HDL_2 (17%), em comparação à albumina controle, não glicada (**figura 22**).

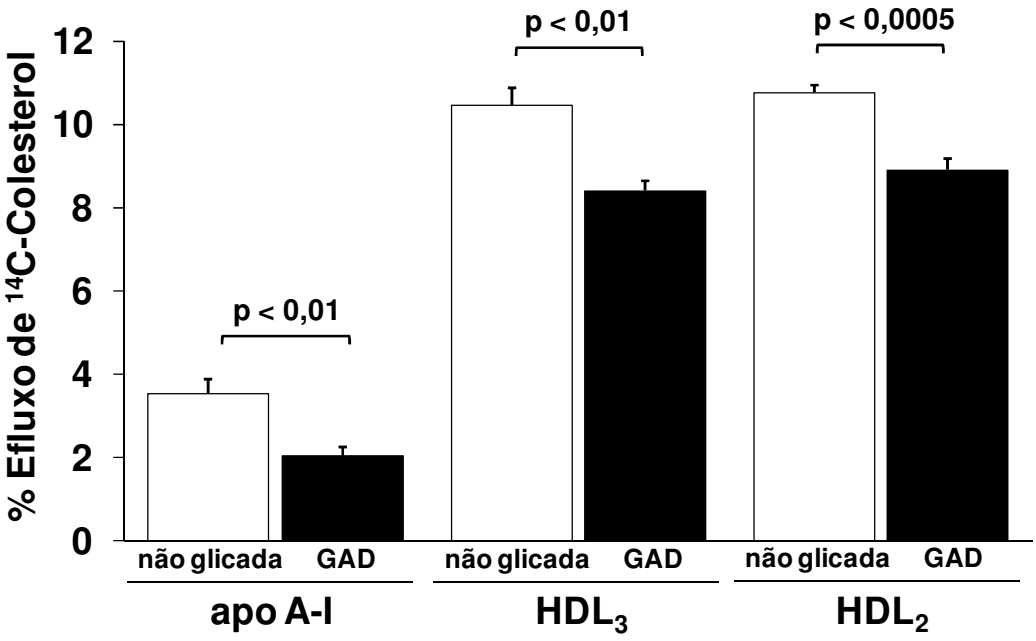


Figura 22. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos J-774, após tratamento com albumina modificada por glicação avançada *in vitro*

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol, foram tratados, por 18 h, com albumina não glicada (n = 5) ou albumina modificada por glicolaldeído (albumina GAD; n = 5); 1 mg/mL de DMEM. O efluxo de ^{14}C-colesterol foi determinado, após tratamento com apo A-I, HDL_3, HDL_2, por respectivamente, 8 h, 5 h e 8 h. Teste t de *Student*; média ± EP.

Estes achados refletiram-se no maior acúmulo de lípides celulares. Na condição experimental apresentada na **figura 23**, macrófagos foram tratados com albumina não glicada ou albumina GAD, apenas. A coloração por *Oil Red O* foi semelhante entre as duas condições (**figura 23, painel A**). Entretanto, na presença de albumina não glicada, a apo A-I reduziu o conteúdo de lípides nos macrófagos, o que não foi observado na presença de albumina GAD (**figura 23, painel B)**. De fato, o conteúdo de lípides nos macrófagos expostos à albumina GAD foi semelhante na presença da apo A-I e na ausência desta lipoproteína. Estes resultados demonstram que a albumina modificada por glicação avançada impede a remoção de colesterol celular pela apo A-I.

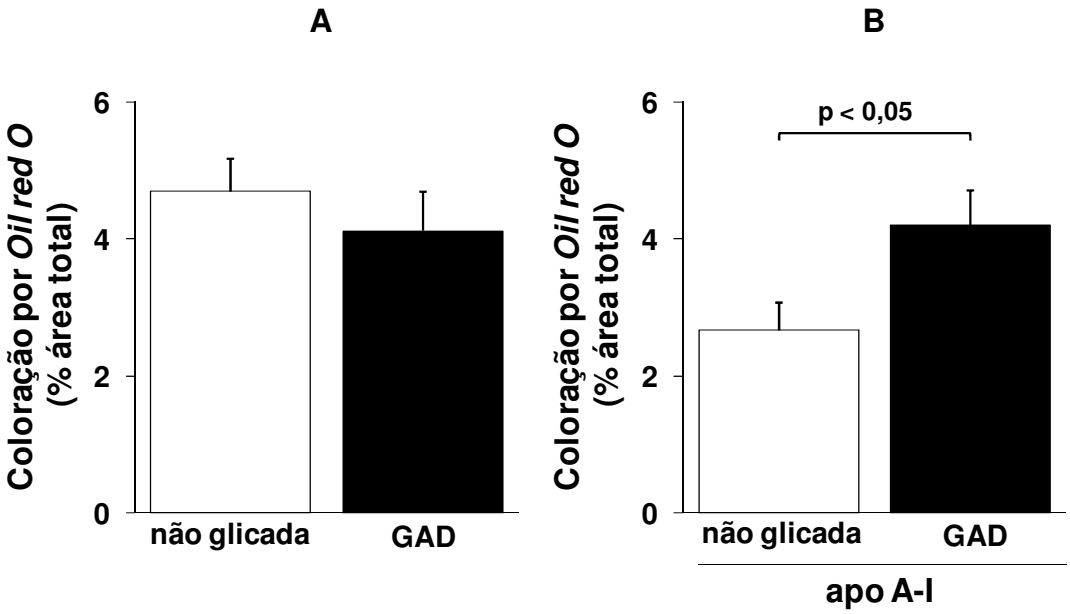


Figura 23. Coloração de lípides intracelulares por *Oil Red O* em macrófagos tratados com albumina modificada *in vitro* por glicação avançada na ausência ou presença de apo A-I

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada foram tratados, por 18 h, com albumina não glicada (n = 8) ou albumina modificada por glicolaldeído (albumina GAD, n = 8); 1 mg/mL de DMEM. As células permaneceram por mais 8 h nestas condições (painel A) ou o meio foi acrescido com 30 μg/mL de apo A-I (painel B). Solução de formalina 10% foi utilizada para fixação celular, seguindo-se coloração com *Oil Red O* 0,5% e quantificação pelo software *Leica Qwin Imaging*. Os dados foram expressos como porcentagem da área total (conteúdo de *Oil Red O* no campo/campo total da lâmina).Teste t de *Student*; média ± EP.

Os mesmos resultados foram encontrados em experimentos com HDL_3 (**figura 24**) e HDL_2 (**figura 25**). Na presença de albumina não glicada, HDL_3 e HDL_2 reduziram o conteúdo de lípides nos macrófagos, o que não foi observado na presença de albumina GAD (**figura 24, painel B** e **figura 25,**

painel B). Isto reitera que a albumina GAD impede a remoção de colesterol celular mediada por HDL.

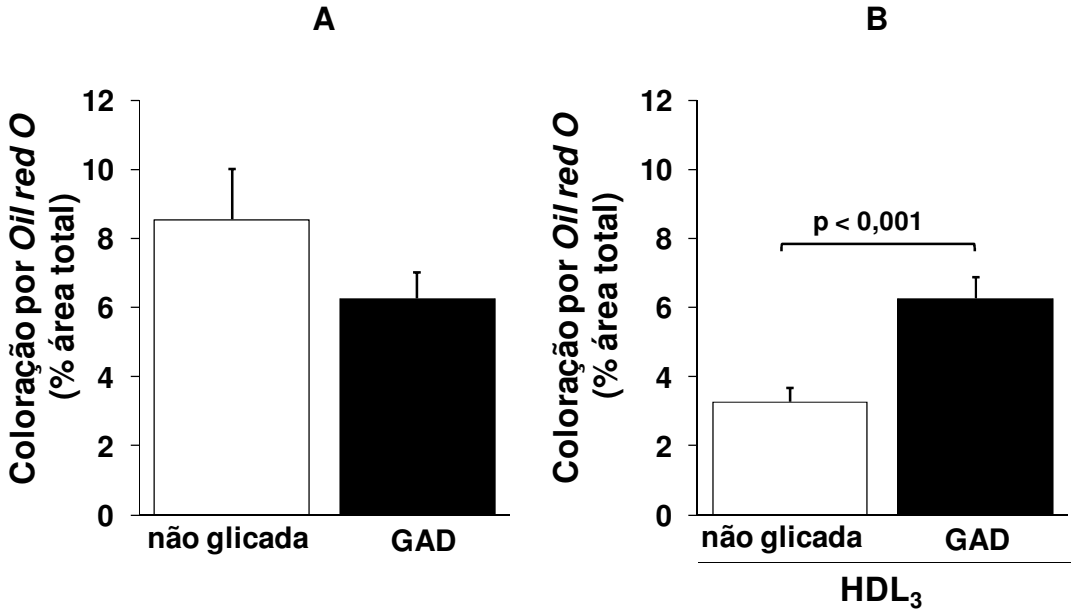


Figura 24. Coloração de lípides intracelulares por *Oil Red O* em macrófagos tratados com albumina modificada *in vitro* por glicação avançada na ausência ou presença de HDL_3

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada foram tratados, por 18 h, com albumina não glicada (n = 6) ou albumina modificada por glicolaldeído (albumina GAD, n = 6); 1 mg/mL de DMEM. As células permaneceram por mais 5 h nestas condições (painel A) ou o meio foi acrescido com 50 μg/mL de HDL_3 (painel B). Solução de formalina 10% foi utilizada para fixação celular, seguindo-se coloração com *Oil Red O* 0,5% e quantificação pelo software *Leica Qwin Imaging*. Os dados foram expressos como porcentagem da área total (conteúdo de *Oil Red O* no campo/campo total da lâmina).Teste t de *Student*; média ± EP.

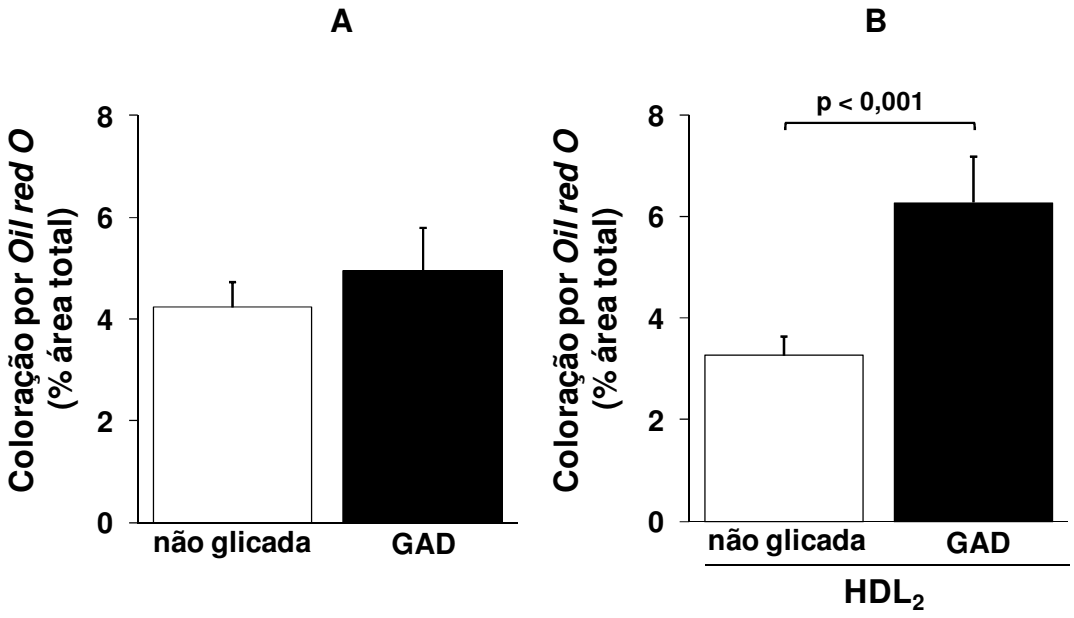


Figura 25. Coloração de lípides intracelulares por *Oil Red O* em macrófagos tratados com albumina modificada *in vitro* por glicação avançada na ausência ou presença de HDL_2

Macrófagos J-774, enriquecidos com LDL acetilada foram tratados, por 18 h, com albumina não glicada (n = 6) ou albumina modificada por glicolaldeído (albumina GAD, n = 6); 1 mg/mL de DMEM. As células permaneceram por mais 8 h nestas condições (painel A) ou o meio foi acrescido com 50 µg/mL de HDL_2 (painel B). Solução de formalina 10% foi utilizada para fixação celular, seguindo-se coloração com *Oil Red O* 0,5% e quantificação pelo software *Leica Qwin Imaging*. Os dados foram expressos como porcentagem da área total (conteúdo de *Oil Red O* no campo/campo total da lâmina).Teste t de *Student*; média ± EP.

Células que superexpressam o receptor SR-BI foram utilizadas para avaliar a influência da albumina modificada por glicação avançada, no diabete melito, sobre a captação de colesterol esterificado de HDL. A remoção seletiva de colesterol esterificado de HDL por este receptor representa a etapa final do transporte reverso de colesterol no fígado.

Células de ovário de hamster chinês da linhagem ldlA7 controles e transfectadas com SR-BI (ldlA7-SR-BI) foram incubadas com albumina C, DM 1 ou DM 2, na presença de HDL marcada com ^{3}H colesteril oleoil éter (^{3}H-COE-HDL) (**figura 26, painel A**). O tratamento celular com albumina DM 1 ou DM 2 reduziu a captação de colesteril oleoil éter de HDL quando comparado ao tratamento com albumina C. Resultado semelhante foi obtido em incubações com albumina glicada *in vitro* (**figura 26, painel B**), com menor captação de colesteril oleoil éter de HDL pelo receptor SR-BI, em células tratadas com albumina GAD.

Como controle, foram utilizadas células ldlA7 que não expressam o SR-BI. Neste caso, não houve variação na captação de ^{3}H-COE-HDL em qualquer condição experimental (**figura 26, painel C e D**).

Estes achados reforçam que a albumina modificada *in vivo* no diabete melito prejudica o transporte reverso de colesterol, não só por interferir no efluxo de colesterol, contribuindo para o acúmulo intracelular de lípides, mas também por prejudicar a via de remoção de colesterol esterificado pelo receptor SR-BI.

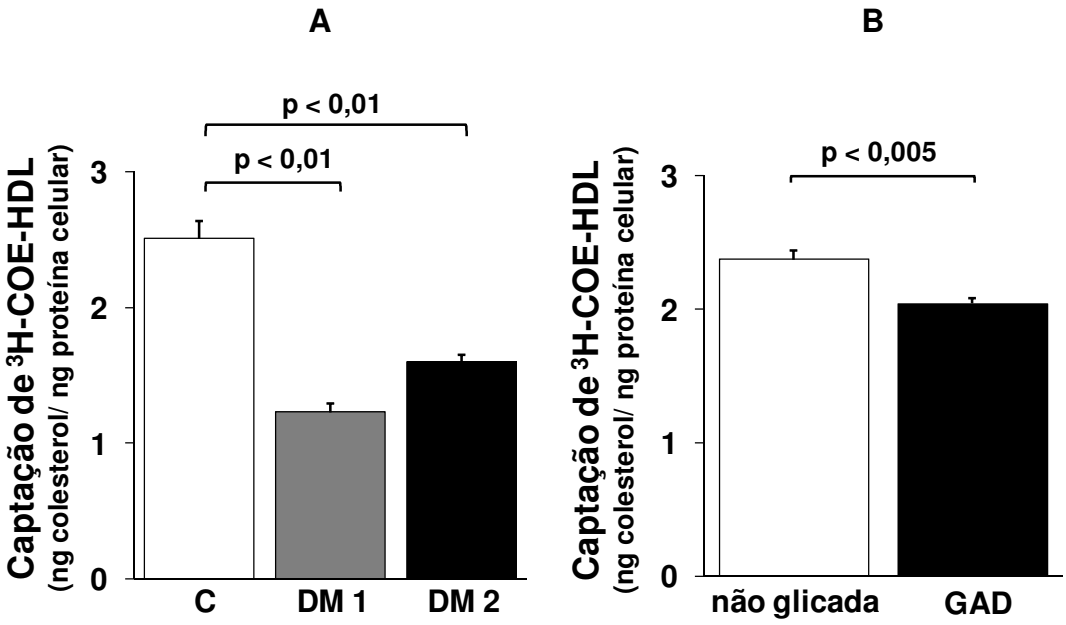
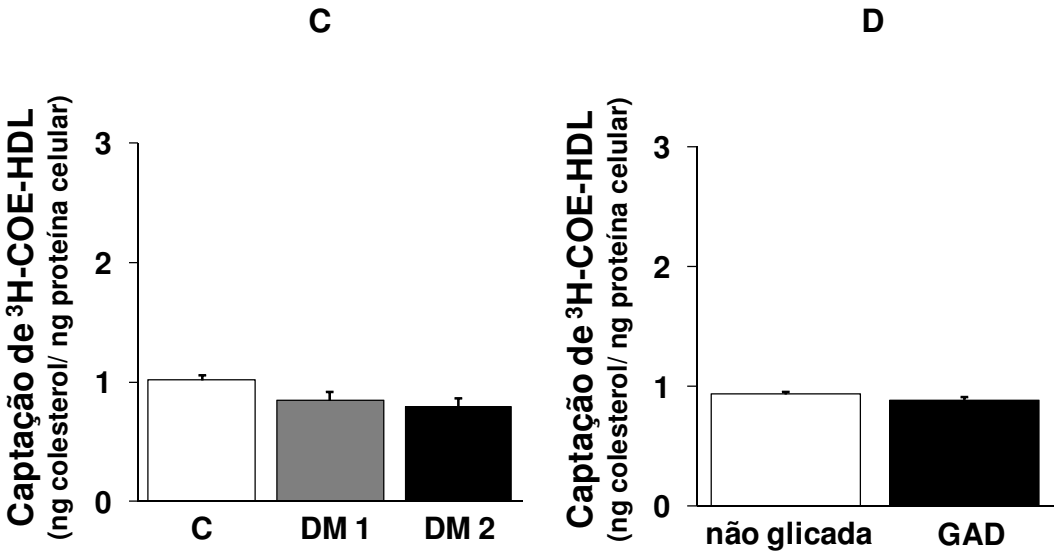


Figura 26. Captação de ^{3}H colesteril oleoil éter de HDL (^{3}H-COE-HDL) por células transfectadas com o receptor SR-BI

A: Células ldlA7-SR-BI foram incubadas, por 8 h, com albumina C, DM 1 ou DM 2 (1mg/mL de DMEM), na presença de ^{3}H-COE-HDL (50 µg/mL de DMEM). Após lavagem e lise celular com NaOH, determinou-se a radioatividade no meio intracelular e a massa de colesterol esterificado captado das HDL. ANOVA de 1 fator - pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 6). **B:** Células ldlA7-SR-BI foram incubadas, por 8 h, com 1 mg de albumina não glicada ou albumina GAD, na presença de 50 µg de ^{3}H-COE-HDL. Após lise celular com NaOH, determinou-se a radioatividade no meio intracelular e a massa de colesterol esterificado captado das HDL.Teste t de *Student*; média ± EP (n = 6).

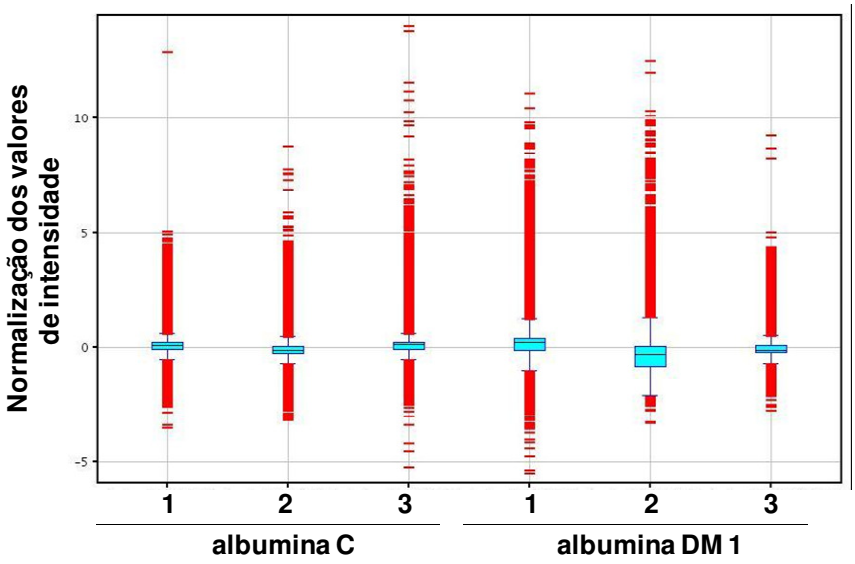


C: Células ldlA7-controles foram incubadas, por 8 h, com albumina C, DM 1 ou DM 2 (1 mg/mL de DMEM), na presença de ^{3}H-COE-HDL (50 µg/mL de DMEM). Após lavagem e lise celular com NaOH, determinou-se a radioatividade no meio intracelular e a massa de colesterol esterificado captado das HDL. ANOVA de 1 fator - pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 6). **D:** Células ldlA7-controles foram incubadas, por 8 h, com albumina não glicada ou albumina GAD (1 mg/mL de DMEM), na presença de ^{3}H-COE-HDL (50 µg/mL de DMEM). Após lavagem e lise celular com NaOH, determinou-se a radioatividade no meio intracelular e a massa de colesterol esterificado captado das HDL.Teste t de *Student*; média ± EP (n = 6).

Ensaios de *microarray* foram realizados para análise da expressão diferencial de genes em macrófagos tratados com albumina modificada *in vivo* no DM e *in vitro* por glicação avançada.

Os dados obtidos foram analisados com o programa *Genespring GX 11.0* (Agilent Technologies Inc). A **figura 27** ilustra o padrão de normalização logarítimica dos valores de intensidade de fluorescência dos experimentos, comparando albumina DM 1 à albumina C (**figura 27, painel A**), albumina DM 2 à albumina C (**figura 27, painel B**) e albumina GAD à albumina não glicada (**figura 27, painel C**).

A



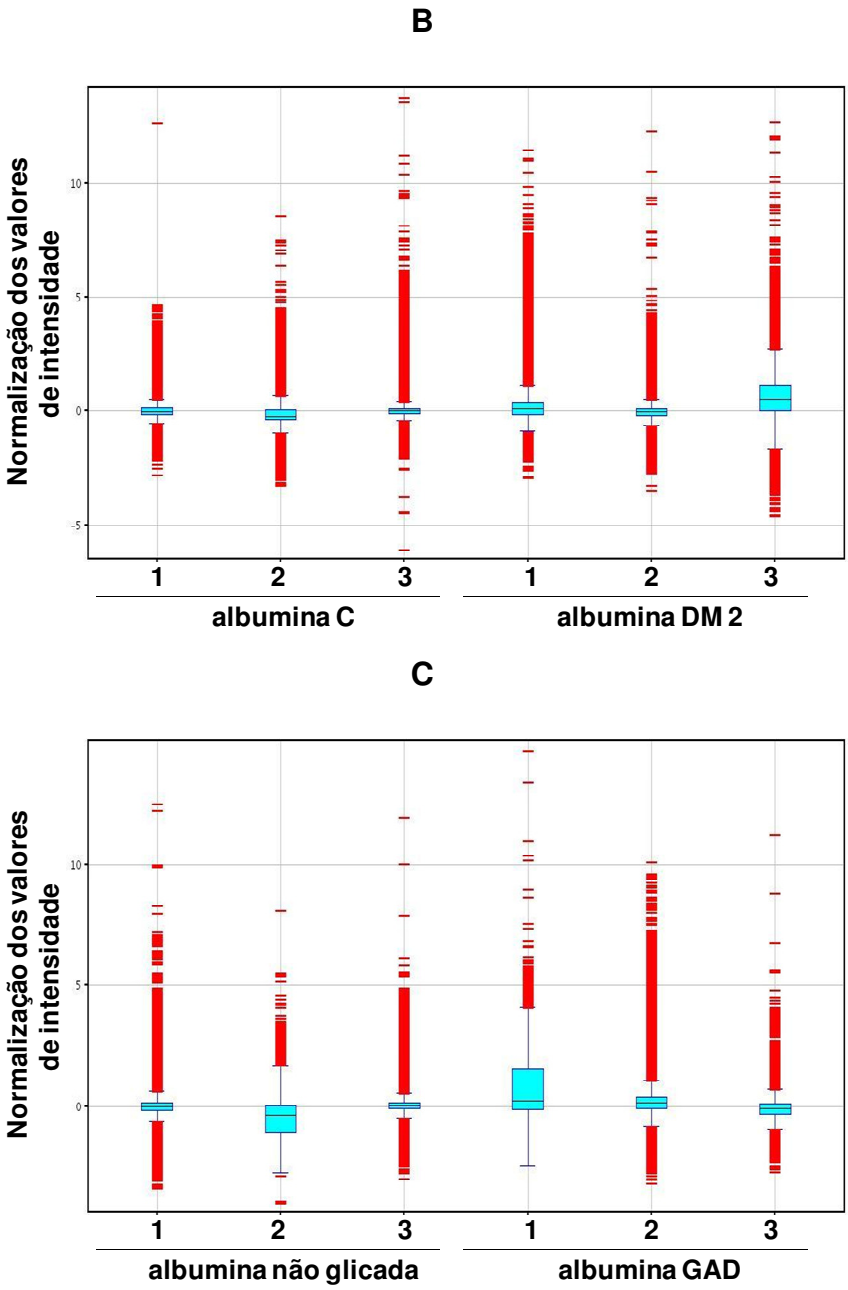


Figura 27. Normalização logarítmica dos valores de intensidade de fluorescência dos ensaios de *microarray*

Normalização logarítimica dos valores de intensidade de fluorescência de cada triplicata biológica do ensaio de microarray. Foram excluídos pontos (*spots*) de baixa qualidade de acordo com o Programa Genespring GX 11.0 (Agilent Technologies Inc). **A**: albumina DM 1 x albumina C. **B**: albumina DM 2 x albumina C. **C**: albumina GAD x albumina não glicada.

Albumina DM 1 (**figura 28, painel A e B**) e albumina DM 2 (**figura 29, painel A e B**) foram comparadas com albumina C, sendo selecionados, respectivamente, 907 genes (15 categorias distintas, determinadas pelo *Gene Ontology* (**tabela 8**) e 1.854 genes (11 categorias distintas) (**tabela 9).**

Albumina GAD foi comparada à albumina não glicada (**figura 30, painel A e B**), sendo selecionados 6.552 genes que pertencem a 119 categorias de genes distintos, de acordo com o *Gene Ontology* (dados não mostrados).

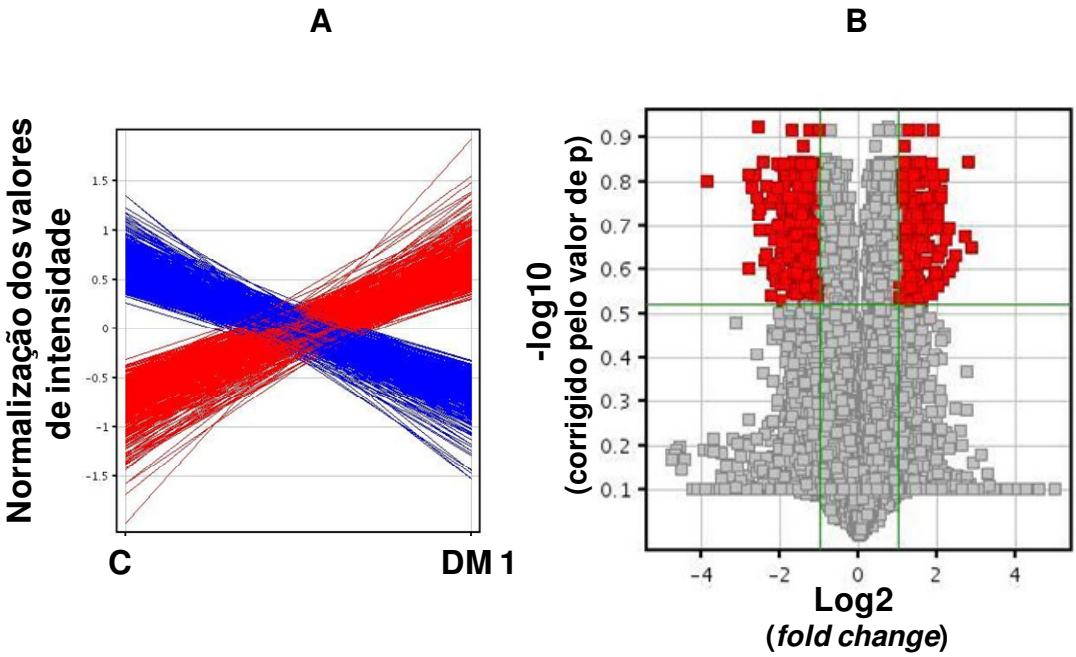


Figura 28. Genes selecionados na análise do microarray de macrófagos tratados com albumina C ou albumina DM 1

A: Genes diferencialmente expressos. albumina DM 1 x albumina C. **B:** Comparação entre albumina DM 1 e albumina C por test t de *Student* com correção de Benjamini-Hochberg com FDR (*false discovery rate*), seguindo-se pela seleção dos genes que apresentaram uma variação na magnitude de expressão maior ou igual a 2 ou - 2. Em vermelho, 907 genes selecionados. Programa *Genespring GX 11.0* (Agilent Technologies Inc).

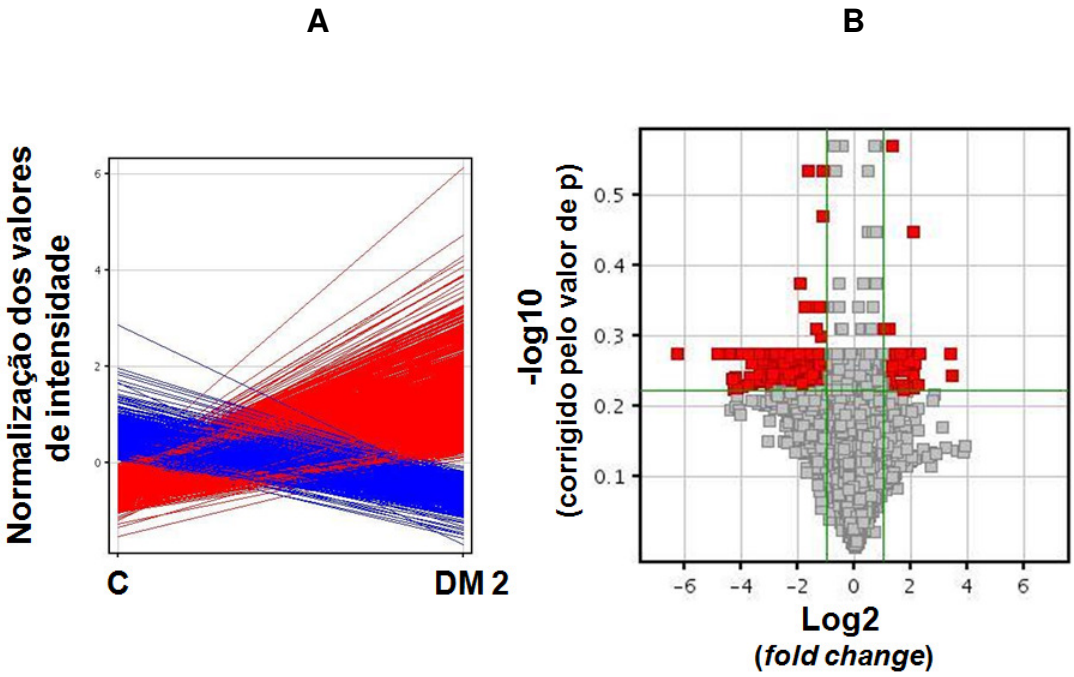


Figura 29. Genes selecionados na análise do *microarray* de macrófagos tratados com albumina C ou albumina DM 2

A: Genes diferencialmente expressos. albumina DM 2 x albumina C. **B:** Comparação entre albumina DM 2 e albumina C por test t de *Student* com correção de *Benjamini-Hochberg* com FDR (*false discovery rate*), seguindo-se pela seleção dos genes que apresentaram uma variação na magnitude de expressão maior ou igual a 2 ou - 2. Em vermelho, 1.854 genes selecionados. Programa *Genespring GX 11.0* (Agilent Technologies Inc).

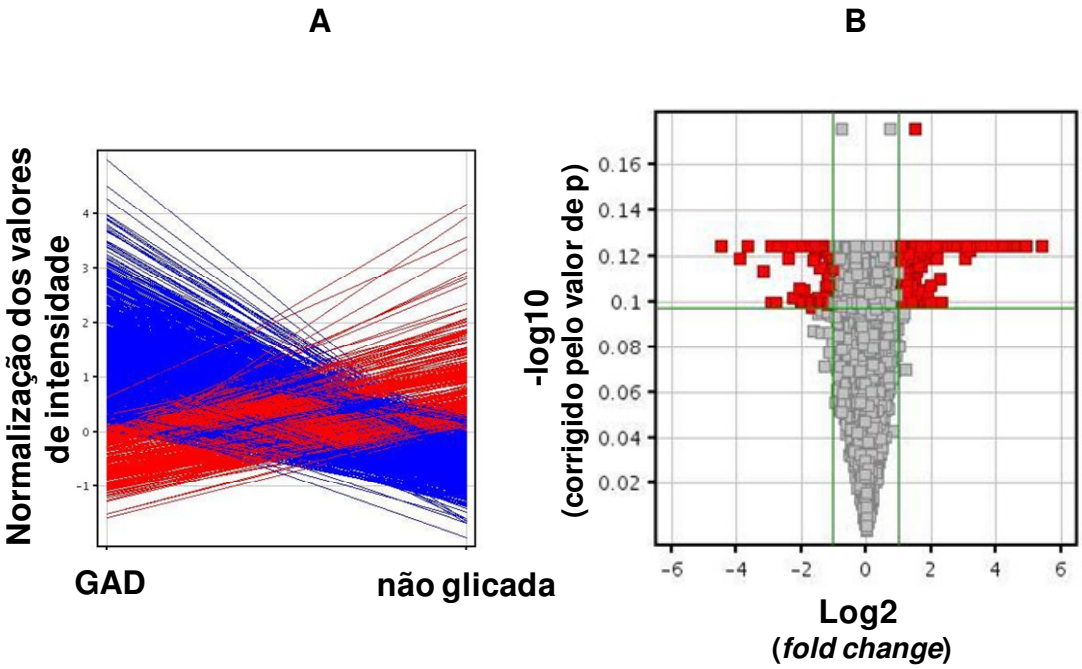


Figura 30. Genes selecionados na análise do *microarray* de macrófagos tratados albumina não glicada ou albumina GAD

A: Genes diferencialmente expressos. albumina GAD x albumina não glicada. **B:** Comparação entre albumina GAD e albumina não glicada por test t de *Student* com correção de *Benjamini-Hochberg* com FDR (*false discovery rate*), seguindo-se pela seleção dos genes que apresentaram uma variação na magnitude de expressão maior ou igual a 2 ou - 2. Em vermelho, 6.552 genes selecionados. Programa *Genespring GX 11.0* (Agilent Technologies Inc).

Tabela 8. Categorias dos genes diferencialmente expressos nos macrófagos tratados com albumina DM 1, de acordo com o *Gene Ontology*

Gene Ontology	Genes	Exemplos	Variação na magnitude de expressão
Função molecular			
Ligação	550	BMF *(BCL2 modifying factor)*	2,34
Ligação à proteínas	315	TLR2 *(toll-like receptor 2)*	- 2,15
		TLR3 *(toll-like receptor 3)*	2,20
		SR-AI *(MSR1 - macrophage scavenger receptor 1)*	2,18
Processos Biológicos			
Desenvolvimento	199	Caspase 4	- 2,27
		Caspase 7	- 2,55
		Insig-1 *(insulin induced gene 1)*	- 2,70
Diferenciação celular	114	FABP4 *(fatty acid-binding protein 4)*	- 2,10
Processo de desenvolvimento celular	120	SCD-1 *(stearoyl-Coenzyme A desaturase 1)*	2,03
Desenvolvimento de organismo multicelular	160	VCAM-1 *(Vascular cell adhesion molecule 1)*	- 2,66
Adesão leucocitária	6	LOX-1 *(oxidized low density lipoprotein receptor 1)*	2,09
Ciclo celular	48	Calm 1 *(calmodulin 1)*	2,24
Processo celular	528	LPR12 *(low density lipoprotein-related protein 12)*	- 2,50
		UCP-2 *(uncoupling protein 2)*	3,03
Biossíntese	169	CYP27A1 *(sterol 27-hydroxylase)*	2,90
Desenvolvimento celular	65	VEGF *(vascular endothelial growth factor)*	- 2,04
Componente Celular			
Intracelular	504	PLIN3 *(perilipin 3 – TIP47)*	- 2,01
Célula	666	SCD-2 *(stearoyl-Coenzyme A desaturase 2)*	2,81
Intracelular	480	ALOX-5 *(5-Lipoxygenase - 5LO)*	6,12
Citoplasma	348	ABCD-1 *(ATP-binding cassette, subfamily D, 1)*	2,48
		ABCD-2 *(ATP-binding cassette, subfamily D, 2)*	5,96

Tabela 9. Categorias dos genes diferencialmente expressos nos macrófagos tratados com albumina DM 2, de acordo com o *Gene Ontology*

Gene Ontology	Genes	Exemplos	Variação na magnitude de expressão
Função molecular			
Receptor de membrana	194	ABCC-9 *(ATP-binding cassette, sub-family C, member 9)*	2,17
Transdução de sinal	268	AGTR-1b *(AT-1b - angiotensin II receptor, type 1b)*	2,58
		Receptor de LDL (B/E) *(low density lipoprotein receptor)*	- 2,52
Receptor associado à proteína G	160	FFAR-1 *(GPR40 - free fatty acid receptor 1)*	3,16
Processos Biológicos			
Adesão celular	85	LRP6 *(low density lipoprotein receptor-related protein 6)*	2,05
Receptor celular com transdução de sinal	242	EDN1 *(ET-1 - endothelin 1)*	3,21
		LRP4 *(low density lipoprotein receptor-related protein 4)*	2,76
Via de sinalização de receptor associado à proteína G	170	JAK2 *(Janus kinase 2)*	- 2,91
Comunicação celular	353	NF-κB *(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1)*	- 2,19
Componente Celular			
Membrana plasmática	331	TLR1 *(toll-like receptor 1)*	- 3,20
Região extracelular	199	IL-33 *(interleukin 33)*	2,04
Parte da região extracelular	113	EDN1 *(ET-1 - endothelin 1)*	3,21
Matriz extracelular	46	FN1 *(fibronectin 1)*	- 2,41
		FBN2 *(fibrillin 2)*	2,01

As **figuras 31** e **32** ilustram os agrupamentos hierárquicos por dendograma, permitindo análise da interação entre os genes diferencialmente expressos, após tratamento dos macrófagos, respectivamente, com albumina DM 1 ou DM 2.

Por meio dos agrupamentos e da análise pelo *Gene Ontology,* é possível observar diferentes padrões de expressão gênica entre as amostras. As albuminas isoladas dos pacientes diabéticos modulam a expressão gênica nos macrófagos de forma distinta. Apesar de os efeitos funcionais no fluxo de lípides serem semelhantes, como a diminuição do efluxo de colesterol mediado por apo A-I e subfrações de HDL e aumento do acúmulo intracelular de lípides, as vias metabólicas que iniciam os processos parecem diferir.

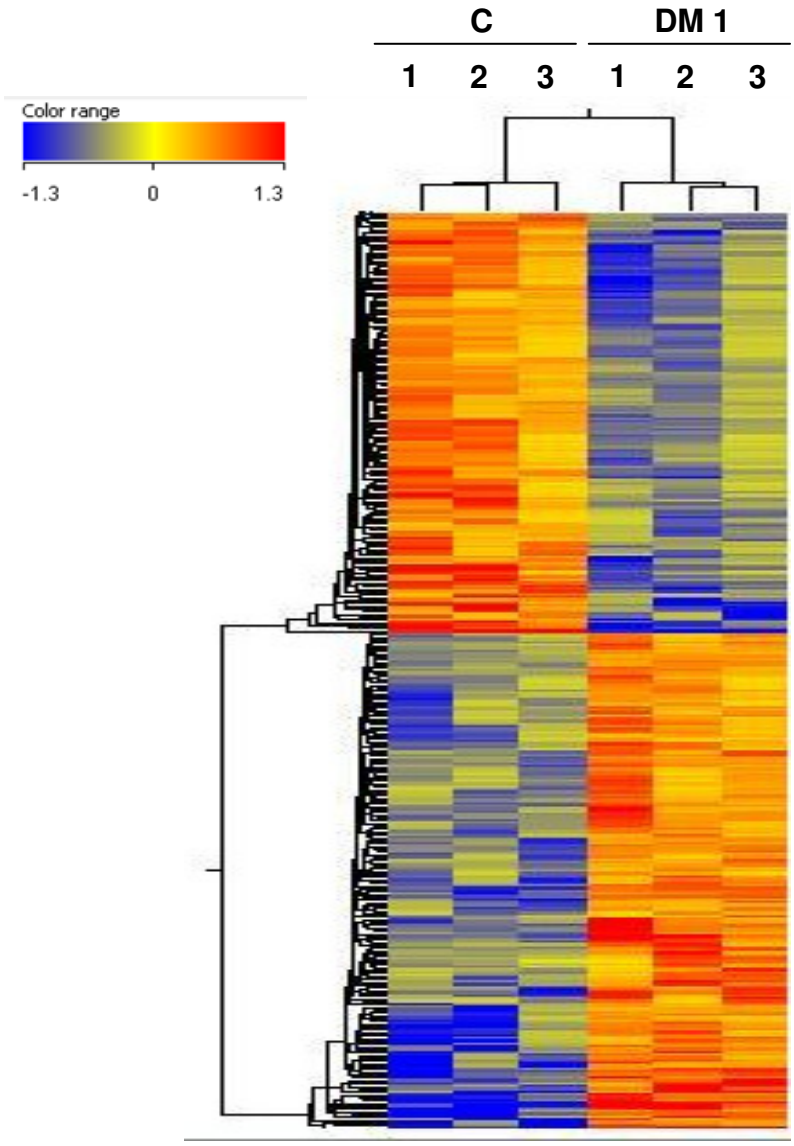


Figura 31. Agrupamento hierárquico dos 907 genes diferencialmente expressos após tratamento dos macrófagos com albumina DM 1

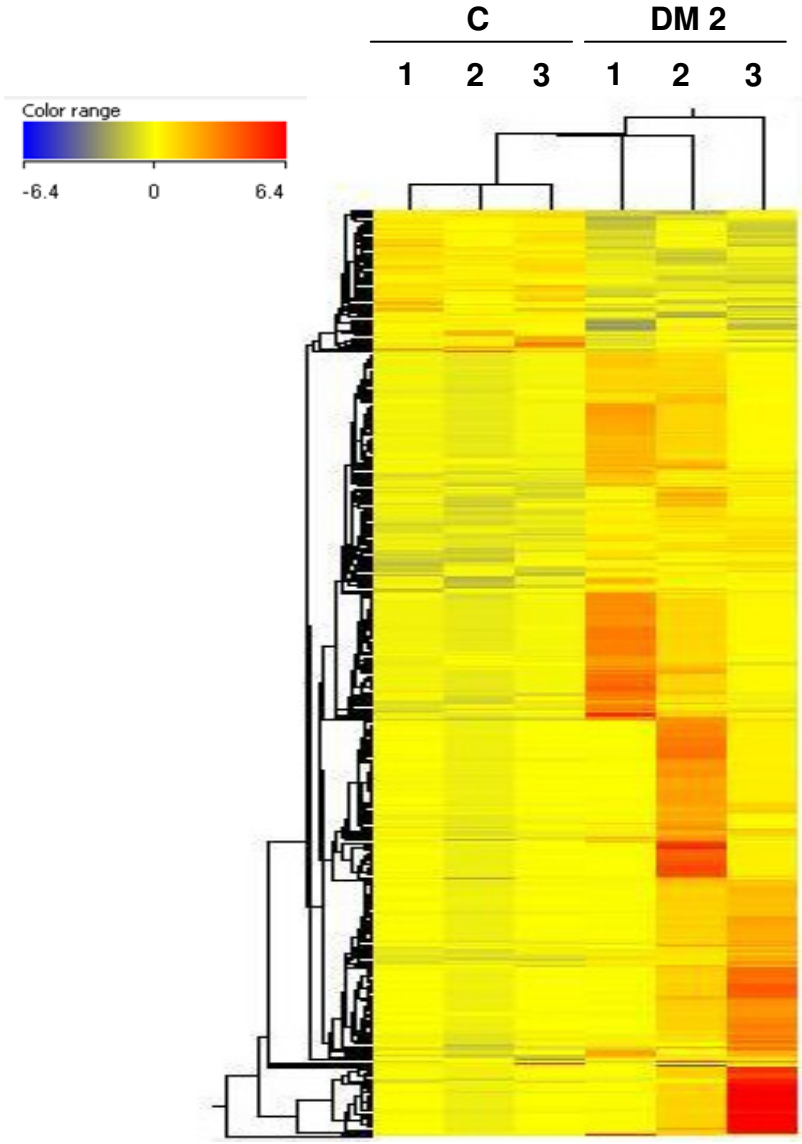


Figura 32. Agrupamento hierárquico dos 1.854 genes diferencialmente expressos após tratamento dos macrófagos com albumina DM 2

De acordo com os resultados metabólicos apresentados inicialmente, que evidenciaram prejuízo na remoção de colesterol celular, foram agrupados genes em 3 categorias: aqueles envolvidos no acúmulo de lípides e efluxo de colesterol (**tabela 10**), estresse oxidante (**tabela 11**) e apoptose (**tabela 12**).

Tabela 10. Genes envolvidos no efluxo de colesterol e no acúmulo de lípides

albumina DM 1	albumina DM 2	albumina GAD
⬆ SR-AI *(MSR1 macrophage scavenger receptor 1)* ⬆ SCD-1 e SCD-2 *(stearoyl-Coenzyme A desaturase 1 and 2)* ⬆ LOX-1 *(oxidized low density lipoprotein receptor 1)* ⬆ CYP27A1 *(sterol 27-hydroxylase)*	⬆ AGTR-1b *(AT-1b - angiotensin II receptor, type 1b)* ⬆ CYP7A1 *(cholesterol 7alpha hydroxylase)* ⬆ apoM *(apolipoprotein M)* ⬆ HMG-CoA sintase *(3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2)* ⬆ EDN1 *(ET-1 - endothelin 1)*	⬆ SR-AI *(MSR1 macrophage scavenger receptor 1)* ⬆ SCD-4 *(stearoyl-Coenzyme A desaturase 4)* ⬆ CYP7A1 (*cholesterol 7alpha hydroxylase)* ⬆ AGTR-1a e AGTR-1b *(AT-1 - angiotensin II receptor, type 1a e 1b)* ⬆ apo B, apo C1 e apo C4 ⬆ CPT1 *(carnitine palmitoyltransferase 1)* ⬆ Catepsinas ⬆ PPARgamma *(peroxisome proliferating activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha)* ⬆ OSBP *(oxysterol binding protein)* ⬆ SREBP2 *(sterol regulatory element binding factor 2)* ⬆ EDN 2 e EDN3 *(ET-1 - endothelin 2 e 3)*
⬇ Insig-1 *(insulin induced gene 1)* ⬇ PLIN3 *(perilipin 3 – TIP47)*	⬇ Receptor de LDL (B/E) *(low density lipoprotein receptor)* ⬇ JAK2 *(Janus kinase 2)*	⬇ AEBP1 *(adipocyte enhancer-binding protein-1)*

Tabela 11. Genes envolvidos no estresse oxidante

albumina DM 1	albumina DM 2	albumina GAD
⬆ UCP-2 *(uncoupling protein 2)*	⬆ UCP-2 *(uncoupling protein 2)* ⬆ AGTR-1b *(AT-1b - angiotensin II receptor, type 1b)*	⬆ UCP-1 *(uncoupling protein 1)* ⬆ NOX 1 e NOX 4 *(NADPH oxidase 1 e 4)* ⬆ AGTR-1a e AGTR-1b *(AT-1 - angiotensin II receptor, type 1a e 1b)*

Tabela 12. Genes envolvidos na apoptose

albumina DM 1	albumina DM 2	albumina GAD
⬆ BMF *(BCL2 modifying factor)*	⬆ caspase 14	⬆ BMF *(BCL2 modifying factor)* ⬆ caspase 14 ⬆ JNK *(Mapk8 mitogen-activated protein kinase 8)* ⬆ MAPK10 e MAPK15 *(mitogen-activated protein kinase 10 e 15)*
⬇ caspase 4 ⬇ caspase 7	⬇ NF-κB *(nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1)* ⬇ JAK2 *(Janus kinase 2)*	

As mesmas amostras utilizadas no ensaio de *microarray* foram utilizadas para RT-PCR em tempo real, para validação de alguns genes, como os receptores de HDL (ABCA-1 e ABCG-1), receptor de LDL (B/E), receptor *scavenger* para lipoproteínas modificadas, classe A, tipo I (SR-AI) e fator pró-apoptótico (BMF).

A expressão do mRNA de ABCA-1, avaliada por RT-PCR em tempo real, não foi modificada em macrófagos tratados com albumina DM 1 ou DM 2 em comparação à albumina C e em células tratadas com albumina GAD em comparação à albumina não glicada (**figura 33**). De fato, não foi observada alteração na expressão gênica de ABCA-1 no ensaio de microarray. Estes achados confirmam dados prévios de nosso grupo e da literatura (Passarelli et al., 2005; Isoda et al., 2007; Castilho et al., 2009), evidenciando que a redução do conteúdo proteico observada (**figura 21**) reflete regulação pós-traducional do ABCA-1 frente ao insulto glicoxidativo celular.

A expressão do mRNA de ABCG-1 foi reduzida apenas nos macrófagos tratados com albumina DM 2 (**figura 34**), embora isto não tenha sido evidenciado no *microarray*.

O mRNA do receptor de LDL (B/E) foi diminuído em macrófagos tratados com albumina DM 1 ou DM 2 (**figura 35, painel A**). Estes mesmos achados não foram encontrados com albumina modificada por glicação *in vitro* (**figura 35, painel B**).

Foi observado aumento do mRNA do receptor SR-AI nos macrófagos tratados com albumina DM 1 (**figura 36, painel A**) ou albumina GAD (**figura**

36, painel B), validando os dados do *microarray*. O mRNA do BMF apresentou-se elevado em células tratadas com albumina DM 2 ou albumina GAD (**figura 37**).

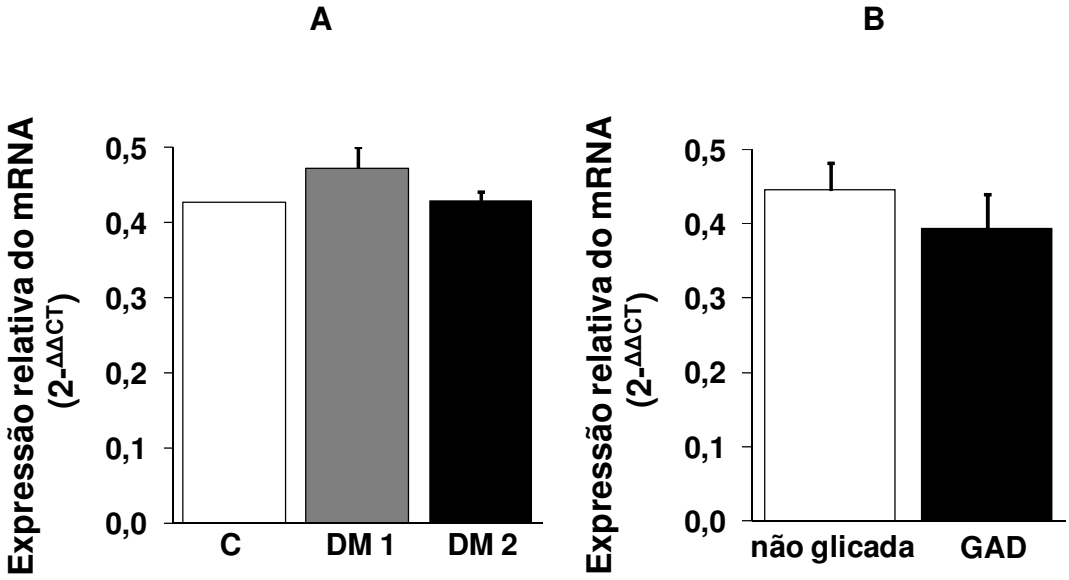


Figura 33. Expressão de mRNA de ABCA-1 por RT-PCR em tempo real

cDNA foi obtido a partir de 500 ng de RNA utilizados no ensaio de *microarray* (kit *High Capacity RNA-to-cDNA;* Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00442663_m1 (ABCA-1). O gene da β-actina (Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pel fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt = Ct gene alvo – Ct do controle endógeno. **A**: ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 3). **B**: Teste t de *Student*; média ± EP (n = 3).

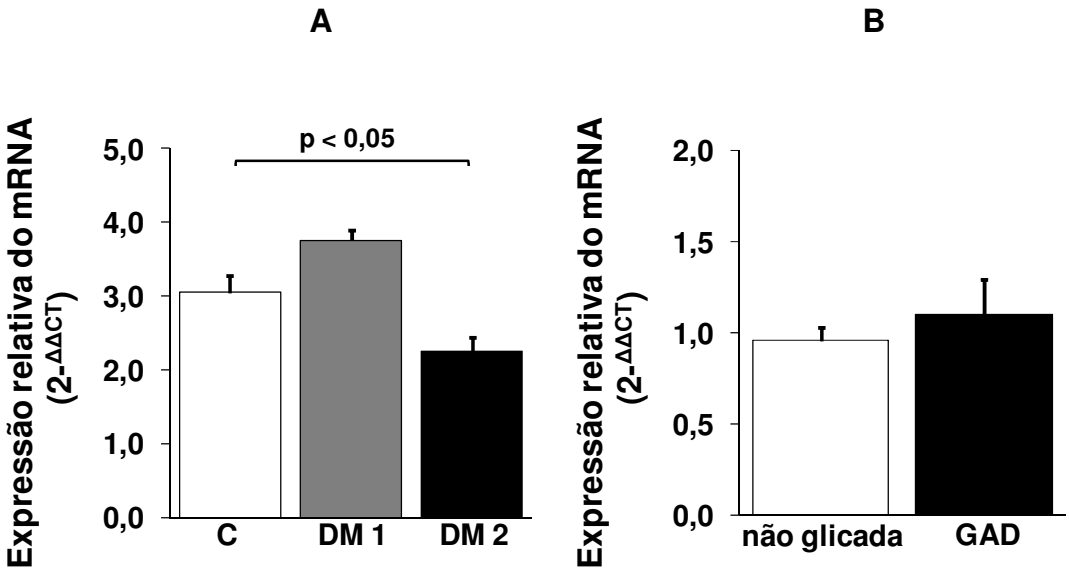


Figura 34. Expressão de mRNA de ABCG-1 m por RT-PCR em tempo real

cDNA foi obtido a partir de 500 ng de RNA utilizados no ensaio de *microarray* (kit *High Capacity RNA-to-cDNA;* Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01348250_m1 (ABCG -1). O gene da β-actina (Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pel fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt = Ct gene alvo – Ct do controle endógeno. **A**: ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 3). **B**: Teste t de *Student*; média ± EP (n = 3).

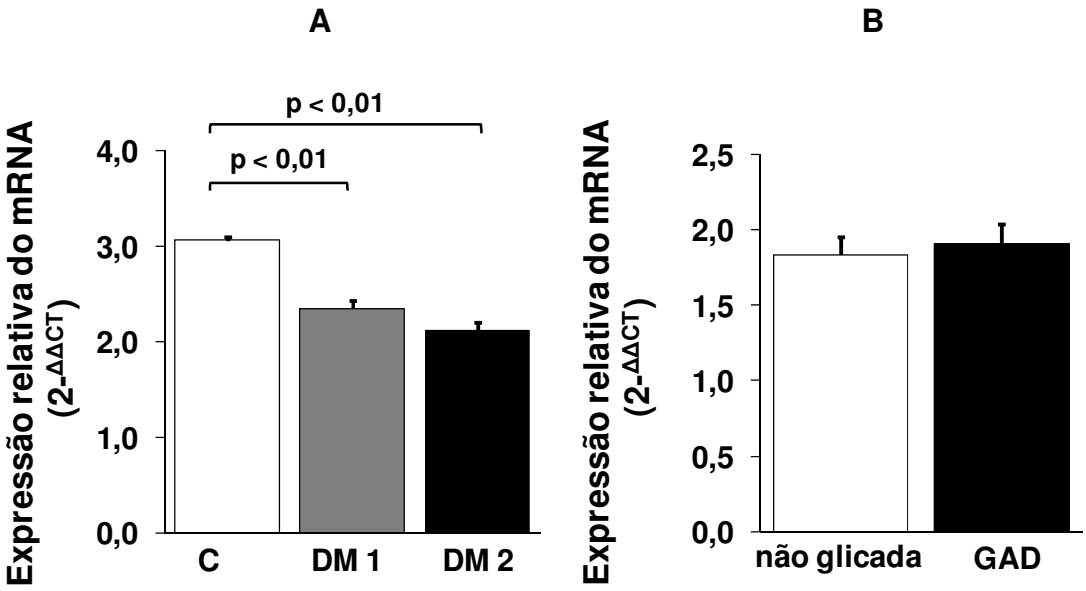


Figura 35. Expressão de mRNA do receptor de LDL (B/E) por RT-PCR em tempo real

cDNA foi obtido a partir de 500 ng de RNA utilizados no ensaio de *microarray* (kit *High Capacity RNA-to-cDNA;* Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00440169_m1 (receptor de LDL). O gene da β-actina (Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pel fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt = Ct gene alvo – Ct do controle endógeno. **A**: ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 3). **B**: Teste t de *Student*; média ± EP (n = 3).

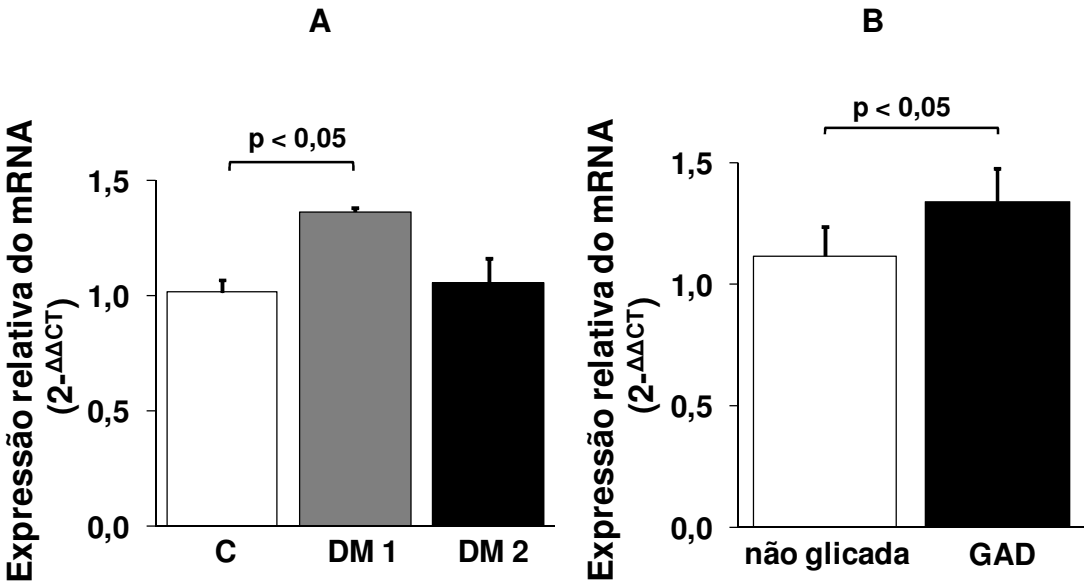


Figura 36. Expressão de mRNA de SR-AI por RT-PCR em tempo real

cDNA foi obtido a partir de 500 ng de RNA utilizados no ensaio de *microarray* (kit *High Capacity RNA-to-cDNA;* Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00446214_m1 (SR-AI). O gene da β-actina (Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pel fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt = Ct gene alvo – Ct do controle endógeno. **A**: ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 3). **B**: Teste t de *Student*; média ± EP (n = 3).

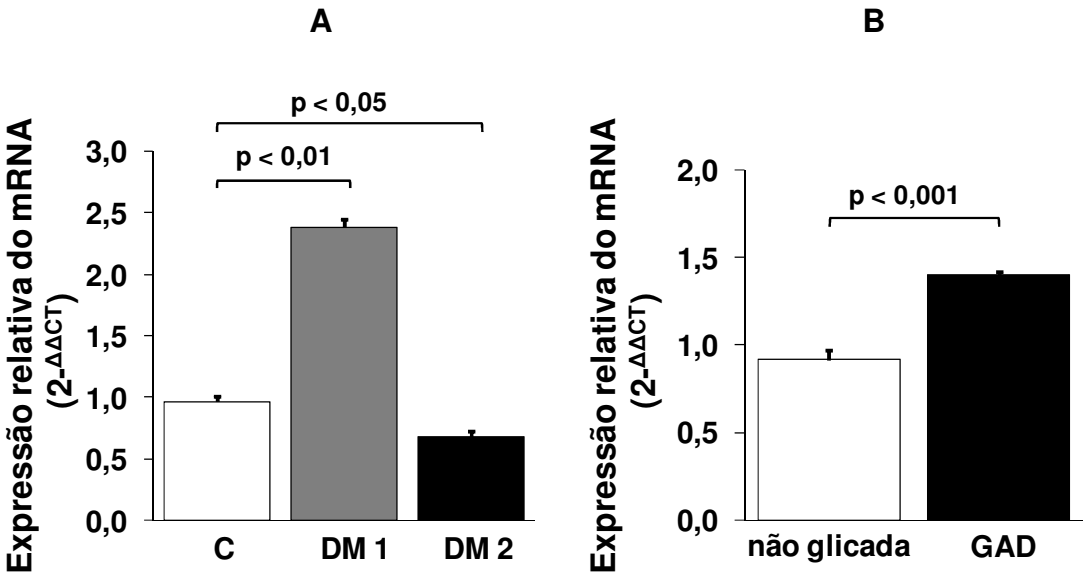


Figura 37. Expressão de mRNA do BMF por RT-PCR em tempo real

cDNA foi obtido a partir de 500 ng de RNA utilizados no ensaio de *microarray* (kit *High Capacity RNA-to-cDNA;* Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação do cDNA foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00506773_m1 (BMF). O gene da β-actina (Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pel fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual ΔCt = Ct gene alvo – Ct do controle endógeno. **A**: ANOVA de 1 fator – pós teste *Dunnett´*s; média ± EP (n = 3). **B**: Teste t de *Student*; média ± EP (n = 3).

6. DISCUSSÃO

Produtos de glicação avançada (AGE) são prevalentes no diabete melito (DM) e associam-se com o desenvolvimento de complicações tardias, inclusive a doença macrovascular aterosclerótica (Cohen et al., 2006; Yamagishi et al., 2007, Yamagishi et al., 2008a; Yamagishi et al., 2008b; Jandeleit-Dahm e Cooper, 2008; Peppa e Raptis, 2008; Basta, 2008). Embora a glicação avançada de diversas macromoléculas *in vitro* tenha sido utilizada como modelo para o estudo da gênese e evolução das complicações do DM (Machado et al., 2006; Isoda et al., 2007; Hoang et al., 2007; Matsuki et al., 2009), não se sabe ao certo a contrapartida da modificação *in vivo* que ocorre no organismo diabético.

Neste estudo, avaliamos o papel da albumina isolada do soro de indivíduos controles e de portadores de DM 1 e DM 2, com controle glicêmico inadequado, sobre o transporte reverso de colesterol. O efluxo de colesterol, mediado por apo A-I e HDL é a primeira etapa do transporte reverso de colesterol e é limitante na prevenção contra o acúmulo de colesterol em macrófagos da íntima arterial (Sviridov e Nestel, 2002; Cuchel e Rader, 2006; Oram e Vaughan, 2006).

A albumina modificada *in vivo,* no DM com controle glicêmico inadequado, afetou adversamente o efluxo de colesterol de macrófagos. A albumina DM 1 e DM 2 removeram maior quantidade de colesterol celular. Nesse caso, estudos que demonstraram aumento do efluxo de colesterol para o plasma de indivíduos portadores de DM (De Vries et al., 2005; De

Vries et al., 2008), podem ter mascarado, em sua quantificação, o efluxo inespecífico mediado pela albumina, visto ser esta a proteína mais abundante do plasma.

A albumina sérica humana tem maior capacidade de remover colesterol celular, quando comparada à albumina bovina e ovoalbumina (Ha et al., 2003). Zhao e Marcel (1996) demonstraram, em fibroblatos, que a albumina humana apresenta capacidade de remoção de colesterol semelhante à de aceptores sintéticos contendo apo A-I. Os mesmos autores evidenciaram que a albumina pode transferir colesterol livre para LDL e partículas reconstituídas contendo apo A-I. No entanto, sua atuação como intermediária no transporte reverso de colesterol não está totalmente esclarecida e a transferência de colesterol livre para subfrações de HDL, em modelos experimentais *in vivo*, ainda deve ser demonstrada.

Na albumina, é mínima a esterificação do colesterol livre, pela LCAT, considerando-se que a apo A-I é o principal cofator da ação enzimática e que a acomodação do colesterol esterificado requer o núcleo hidrofóbico de uma lipoproteína (Zannis et al., 2006). Isso pode propiciar a recaptação de colesterol livre pelas células ou sua troca inespecífica com eritrócitos ou superfície de várias lipoproteínas sem, entretanto, garantir eficiência ao tráfego de colesterol ao fígado por meio do transporte reverso.

Uma maior concentração de apo A-I foi observada nas albumina isoladas de DM 1 e DM 2 (apo A-I/mg de albumina). Esse fato pode favorecer a maior retirada de colesterol celular pela albumina DM 1 e DM 2, no entanto sem garantir diminuição efetiva do conteúdo intracelular de

lípides, conforme evidenciado pelos estudos com coloração por *Oil Red O*. De fato, nas incubações realizadas com albumina DM 1 e DM 2 na presença de apo A-I, HDL_3 ou HDL_2, maior acúmulo de lípides foi evidenciado nos macrófagos, em comparação às incubações com albumina C e aceptores exógenos de colesterol. Nesse aspecto, prevaleceu o prejuízo na atividade da apo A-I e das subfrações de HDL em remover colesterol, a despeito da maior remoção desse esteróide pela albumina DM.

Yamazaki et al. (2005) demonstraram que, *in vitro*, conforme aumenta o grau de modificação da albumina humana por glicação, diminui sua capacidade de se ligar a diferentes ácidos graxos. Em outro estudo, a mutação seletiva de resíduos de lisina ao longo da cadeia peptídica reduziu a afinidade da albumina por ácidos graxos e aumentou por colesterol (Ha et al., 2003). Caracteristicamente, na reação de glicação, resíduos de lisina são mascarados, o que poderia favorecer maior afinidade da albumina glicada pelo colesterol, com maior remoção desse esteroide da membrana dos macrófagos.

Carboximetil-lisina (CML) é o AGE mais comumente encontrado *in vivo* (Ahmed et al., 1986) e correlaciona-se com as complicações do DM (Beisswenger et al., 1995; Ahmed et al., 2007). O conteúdo de CML nas albuminas isoladas dos pacientes DM foi maior que nas albuminas do grupo C. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre o conteúdo de CML na albumina e albumina glicada no plasma e concentração plasmática de frutosamina.

Além da glicação, outros tipos de modificações podem ocorrer na albumina, como a modificação por lipoxidação que leva à formação de grupos pirrois em resíduos de lisina (Sayre et al., 1996; Xu et al., 1999). Produtos derivados do composto pirrol são estáveis e foram encontrados em concentrações elevadas em pacientes com insuficiência renal e com aterosclerose, quando comparados com indivíduos saudáveis (Salomon et al., 2000).

Não se pode descartar que componentes inflamatórios e de fase aguda, como amiloide sérico A, fármacos e hormônios, como insulina e cortisol, entre outros, possam estar presentes nas albuminas isoladas dos indivíduos DM 1 e DM 2. No entanto, foi observado prejuízo no efluxo de colesterol promovido por albumina purificada (disponível comercialmente) glicada *in vitro*, mesmo na ausência desses componentes.

Além de remover mais colesterol, a albumina DM 1 reduziu a retirada de colesterol pela apo A-I e pela HDL_2, embora nenhum efeito dela tenha sido observado no efluxo mediado pela HDL_3. Por outro lado, a albumina DM 2 reduziu o efluxo mediado tanto pela apo A-I, HDL_2, como pela HDL_3. Sendo assim, independente das concentrações de HDL, as quais foram similares em todas as incubações, a albumina isolada do grupo DM 1 e DM 2 reduziu a habilidade das HDL em remover colesterol. Esses dados se refletiram no maior conteúdo de lípides encontrado em macrófagos expostos à albumina DM, mesmo na presença de apo A-I, HDL_2 e HDL_3.

A HDL isolada de portadores de DM 2 remove menor quantidade de colesterol celular (Passarelli et al., 2000), o que, em parte, tem sido atribuído

à modificação dessa lipoproteína por glicação avançada, conforme evidenciado por estudos com HDL glicadas *in vitro* (Matsuki et al., 2009). Além disso, outras vias de regulação do efluxo de lípides celulares podem estar alteradas no DM, entre elas o complexo mecanismo de regulação da expressão dos receptores de HDL por óxidos de colesterol e receptores nucleares, bem como a participação de outros aceptores exógenos de colesterol.

Hoang et al. (2007) demonstraram que a apo A-I modificada por glicação, pelo tratamento com metilglioxal, diminuiu o efluxo de colesterol de macrófagos. De modo semelhante, Matsuki et al. (2009) verificaram que HDL modificada por glicação avançada, pelo tratamento com 3-deoxiglicosona, diminuiu o efluxo de colesterol celular, o que foi dependente do conteúdo de CML da HDL e prevenido por metformina e aminoguanidina. Entretanto, Shao et al. (2010) demonstraram que apenas apo A-I modificada por malondialdeído (MDA), um produto de peroxidação lipídica, prejudica o efluxo de colesterol celular. Nesse mesmo estudo, a apo A-I modificada por outros oxoaldeídos, como glioxal, metilglioxoal e glicolaldeído, não acarretou prejuízo na remoção de colesterol celular.

Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que a albumina modificada *in vitro* por glicação avançada (albumina AGE) reduziu o efluxo de colesterol mediado por HDL. Os efeitos da albumina AGE relacionaram-se com o grau de modificação por CML e foram prevenidos pelo tratamento com compostos inibidores de glicação avançada e antioxidantes, como metformina e aminoguanidina (Machado et al., 2006). Considerando-se que

os achados com albumina modificada *in vivo* assemelham-se àqueles obtidos com albumina humana e bovina glicada *in vitro*, é possível inferir que a redução no efluxo de colesterol esteja relacionada com a diminuição da expressão dos receptores de HDL, ABCA-1 e ABCG-1 (Pinto et al., 2007). De fato, encontramos diminuição do conteúdo de ABCA-1 nos macrófagos expostos à albumina DM 1 e DM 2.

A glicoxidação intracelular, induzida pelo tratamento com oxoaldeídos, como glioxal e glicolaldeído, reduziu a expressão do receptor ABCA-1 em macrófagos. Tal decréscimo ocorreu mesmo na ausência de variação no mRNA deste transportador (Passarelli et al., 2005). Dados do *microarray* validados pelo RT-PCR em tempo real demonstraram que macrófagos tratados com albumina DM 1, albumina DM 2 ou albumina glicada *in vitro,* produzida pelo tratamento com 10 mM de glicolaldeído (albumina GAD), não apresentaram alteração na expressão gênica de ABCA-1, sugerindo que vias de degradação pós-traducionais estejam envolvidas na redução deste transportador.

Pinto et al. (2009) evidenciaram que a redução na expressão de ABCA-1, em macrófagos tratados com albumina AGE, vincula-se à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pode ser parcialmente prevenida por inibidores do sistema NADPH oxidase e desacoplamento mitocondrial. Além disso, compostos antioxidantes e bloqueadores da geração de AGE, como aminoguanidina e benfotiamina, são capazes de restaurar a expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina AGE.

No presente estudo, foi observado aumento da UCP-2 (*uncoupling protein-2*) em macrófagos tratados com albumina DM 1 e DM 2. Nesse tipo celular, a UCP-2 está envolvida no controle da formação de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (Moukdar et al., 2009), as quais por sua vez aumentam o mRNA e o conteúdo proteico da UCP-2 (Giardina et al., 2008).

A albumina DM 2 e albumina GAD provocaram aumento da expressão do receptor AT-1 (AT-1- *angiotensin II receptor, type 1b*) em macrófagos. A ativação destes receptores também favorece maior geração de ROS pela NADPH oxidase (Yatabe et al., 2009), aumento da peroxidação lipídica e captação de LDL modificadas (Keidar et al., 1995), aumento da biossíntese do colesterol (Keidar et al., 1999) e diminuição do efluxo de colesterol (Kaplan et al., 2002), o que contribui para o acúmulo intracelular de lípides.

A NADPH oxidase (NOX) é uma família de proteínas com 7 subunidades, sendo a NOX 4 a isoforma mais abundante (Nauseef, 2008). Em nosso estudo, encontramos aumento da NOX 1 e NOX 4 nos macrófagos tratados com albumina GAD. Albumina glicada aumenta a expressão da NOX 4 em células endoteliais (Rodiño-Janeiro et al., 2010).

A expressão da UCP-2, do receptor AT-1 e NOX 4 precisam ser validadas por RT-PCR em tempo real.

Desequilíbrio redox e acúmulo de colesterol celular desencadeiam a resposta a proteínas mal enoveladas, mecanismo adaptativo ao estresse do retículo endoplasmático (Ron e Walter, 2007). Marcadores de estresse do retículo endoplasmático encontram-se elevados em macrófagos

enriquecidos em colesterol livre (Feng et al., 2003) e em áreas de lesão aterosclerótica sensíveis à ruptura (Myoishi et al., 2007). O aumento do estresse do retículo leva ao aumento da apoptose e à morte de macrófagos, o que contribui para a instabilidade da placa aterosclerótica (Tsukano et al., 2010).

O acúmulo preferencial de colesterol livre em macrófagos, em detrimento ao esterificado, favorece a diminuição de ABCA-1, independentemente de modificações transcricionais e em seu RNA mensageiro Feng e Tabas (2002). Interessante que macrófagos tratados com albumina AGE apresentam aumento da expressão das chaperonas Grp78 e Grp 94, marcadoras do estresse do retículo endoplasmático, e de outros sinalizadores da via adaptativa de resposta a proteínas mal enoveladas (Castilho et al., 2009). O uso de inibidor químico do estresse do retículo endoplasmático (ácido fenilbutírico) é capaz de reestabelecer a expressão de ABCA-1 em macrófagos glicoxidados (Castilho et al., 2010).

Esses achados estabelecem paralelismo entre o estresse glicoxidativo, causado pela albumina AGE em macrófagos, e vias de degradação pós-traducional do ABCA-1. Além disso, o papel da albumina AGE na sensibilização de macrófagos a estímulos inflamatórios, como calgranulinas e lipopolissacarídeos bacterianos (Okuda et al., 2009), pode contribuir para reduzir a expressão de ABCA-1 ou sua atividade na translocação de lípides entre os folhetos da membrana plasmática. A avaliação do estresse inflamatório provocado pela albumina DM 1 e DM 2 nos macrófagos poderá fornecer mais dados acerca da ação da glicação

avançada sobre o fluxo de lípides em função da possível indução de resposta inflamatória. Nesse sentido, estudos da literatura demonstram que a adição direta de TNF-α prejudica a expressão de ABCA-1 e o efluxo de colesterol celular (Mei et al., 2007; Yin et al., 2010; Field et al., 2010).

Demonstrou-se, ainda, no presente estudo, o aumento da expressão SCD 1 e 2 (estearoil-CoA desaturase 1 e 2) em macrófagos tratados com albumina DM 1, e de SCD 4 em macrófagos tratados com albumina GAD. Esta enzima catalisa a conversão do palmitoil-CoA estearoil-CoA (ácidos graxos saturados) a palmitoleoil-CoA e oleil-CoA (ácidos graxos monoinsaturados), respectivamente. A super-expressão da SCD 1 e 2 leva a alterações na composição de fosfolípides da membrana plasmática, levando a diminuição do efluxo de colesterol mediado por apo A-I (Sun et al., 2003). Além disso, o aumento da geração de ácidos graxos insaturados pela SCD leva à desestabilização do ABCA-1 na membrana plasmática (Wang et al., 2004) e se contrapõe aos efeitos estimulantes do receptor X hepático (LXR) sobre a transcrição do gene do ABCA-1 (Sun et al., 2003).

Em macrófagos tratados com albumina DM 2, foi observada diminuição da *Janus kinase 2* (JAK2). Esta proteína parece modular a interação da apo A-I com o receptor ABCA-1 (Tang et al., 2004); quando ativada, garante a estabilidade do ABCA-1 e permite a interação da apo A-I com o receptor, favorecendo a remoção de colesterol celular. Além disso, a ligação específica de apo A-I ao ABCA-1 aumenta sua meia-vida, graças à fosforilação da sequência PEST (prolina, ácido glutâmico, serina, treonina) de sua estrutura, o que impede a ação de proteases (Wang et al., 2003).

Albumina DM 1 e DM 2, mesmo que por vias diferentes, interferem na estabilidade do ABCA-1 na membrana celular, provocando a queda no efluxo de colesterol mediado por apo A-I.

Dados do *microarray* validados pelo RT-PCR em tempo real demonstraram que macrófagos tratados com albumina DM 1 e albumina GAD apresentaram aumento da expressão de BMF (*Bcl2-modifying factor*). O BMF é um fator pró-apoptótico, membro da família do BCL2 (Hitomi et al., 2008; Hübner et al., 2010), relacionado com a morte celular. Esses dados sugerem que a albumina glicada possa ativar vias que medeiam a apoptose nos macrófagos, embora uma análise mais detalhada deva ser realizada, já que a apoptose é um processo complexo que participam várias proteínas sinalizadoras. Importante salientar que, em macrófagos tratados com albumina AGE não se observou pela técnica de anexina V morte celular por apoptose (Pinto et al., 2010 submetido).

Por sua vez, o ABCG-1 tem a transcrição de seu gene negativamente modulada pela albumina AGE (Isoda et al., 2007), o que evidencia que a ação da albumina AGE sobre a expressão dos receptores de HDL ocorre de maneira distinta. Neste estudo, evidenciou-se diminuição na expressão de ABCG-1 apenas nos macrófagos tratados com albumina DM 2. Isto, de fato, pode afetar diferentemente o efluxo de colesterol mediado por apo A-I e subfrações de HDL, conforme observado nas incubações com albumina DM 1 que reduziu o efluxo mediado por HDL_2, mas não por HDL_3. Já albumina DM 2 diminuiu o efluxo mediado por HDL_3 e HDL_2.

Redução na expressão de ABCG-1 em macrófagos de animais db/db e de humanos portadores de DM 2 com controle glicêmico inadequado (HbA_{1c} > 7,9%) foi observada em associação à diminuição do efluxo de colesterol mediado por HDL e ao acúmulo intracelular de lípides (Mauldin et al., 2006; Mauldin et al. 2008). Da mesma forma, Zhou et al. (2008) verificaram diminuição da expressão de ABCG-1 em monócitos de portadores de DM 2 (HbA1c = 7,7%), mas não dos receptores ABCA-1 e SR-BI.

Na presença de albumina AGE, observa-se maior expressão de receptores SR-BI, SR-A, LOX-1 (*oxidized low density lipoprotein receptor 1*), CD-36 e RAGE em macrófagos (Ywashima et al. 2000; Pinto et al. 2007), com maior captação de LDL por macrófagos (Castilho et al., 2006).

Macrófagos tratados com albumina DM 1 e albumina GAD apresentaram aumento da expressão do receptor SR-AI - dados do *microarray* validados pelo RT-PCR em tempo real. O aumento da expressão de receptores *scavanger* está relacionado com o aumento da captação de lipoproteínas modificadas pelos macrófagos, favorecendo o acúmulo intracelular de lípides (Jalkanen et al., 2003; Moradi et al., 2009).

Além do SR-AI, a albumina DM 1 aumentou também a expressão do LOX-1, o qual promove a captação específica de LDL oxidadas pelos macrófagos (Mehta et al., 2006; Ishiyama et al., 2010).

Diferentemente do receptor de LDL (B/E), que é fortemente regulado pela concentração intracelular de colesterol (Brown e Goldstein, 1997), os receptores *scavanger*, inclusive o SR-AI, não são regulados pelo conteúdo

intracelular de esteroides (De Winther e Hofker, 2000). Portanto, o aumento da expressão desses receptores incrementa a captação de lipoproteínas modificadas e o consequente acumúlo intracelular de lípides.

A homeostase do colesterol é regulada pela proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroides (SREBP; *sterol-regulatory element-binding protein*), localizada na membrana do retículo endoplasmático. Quando aumenta o colesterol celular, a ligação deste e de seus derivados oxigenados (óxidos de colesterol) à proteína ativadora de clivagem da SREBP (SCAP; *SREBP cleavage-activating protein*) e à proteína INSIG-1 *(insulin induced gene 1)* promove a associação dessas proteínas com a SREBP. Sendo assim, o complexo proteico INSIG/SCAP/SREBP permanece na membrana do retículo. Por outro lado, a redução do conteúdo intracelular de colesterol favorece a dissociação do complexo INSIG/SCAP, permitindo que a SCAP direcione a SREBP ao complexo secretório celular (complexo de Golgi). Neste compartimento, a SREBP sofre duas clivagens proteolíticas subsequentes, de modo que a porção ativa do fator de transcrição seja liberada e migre ao núcleo, onde induz a transcrição do gene do receptor de LDL (B/E), HMG-CoA redutase (enzima chave da biossíntese do colesterol) e da proteína que degrada o receptor de LDL (PCSK9; *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (Horton et al., 2003; Rawson, 2003; Goldstein et al., 2006; Radhakrishnan et al., 2008; Jeong et al., 2008).

Diminuição na expressão de INSIG-1 foi observada em macrófagos tratados com albumina DM 1. Nesse aspecto, seria esperado que a redução da INSIG favorecesse maior ativação de SREBP e, consequentemente, a

maior expressão do receptor de LDL (B/E). Não obstante, macrófagos tratados com albumina DM 1 e DM 2 apresentaram diminuição da expressão do mRNA do receptor de LDL (B/E), o que pode ser reflexo do acúmulo intracelular de colesterol, frente ao prejuízo da expressão do ABCA-1.

Castilho et al. (2007) demonstraram que em resposta ao acúmulo de colesterol, macrófagos tratados com albumina AGE apresentaram redução da atividade da HMG-CoA redutase e aumento da enzima que esterifica o colesterol intracelular - acil colesterol aciltransferase (ACAT). Entretanto, esse achado não foi compartilhado por Kaplan et al. (2008) que demonstraram, ao contrário, aumento da expressão da HMG-CoA redutase em macrófagos tratados com elevadas concentrações de glicose (30 mM).

Aumento do SREBP2 foi observado em macrófagos tratados com albumina GAD. Ye et al. (2009) demonstraram que, na vigência da inflamação crônica, aumenta a expressão de SCAP, o que favorece a migração da SREBP do retículo endoplasmático para o Golgi, mesmo na presença de altas concentrações de colesterol. Além disso, já foi demonstrado que o acúmulo de colesterol em macrófagos pode ser favorecido por maior atividade da HMG-CoA redutase por meio da ativação do receptor AT-1 (Keidar et al., 1999), o qual pode ser ativado por produtos de glicação avançada (Fukami et al., 2004; Yamagishi et al., 2005; Matsui et al., 2007).

Os LXR são fatores de transcrição que regulam o conteúdo intracelular de colesterol. LXRα (NR1H3) e LXRβ (NR1H2) são receptores nucleares dependentes de esteroides (Zelcer e Tontonoz, 2006). Em

resposta ao acúmulo de colesterol, os receptores ABCA-1 e ABCG-1 podem ser ativados pelos LXR, o que favorece, em última instância, o efluxo desse esteroide (Repa et al., 2000; Kennedy et al., 2005). Zelcer et al. (2009) demonstraram que a ativação de LXR induz a síntese da proteína Idol (*inducible degrader of LDL receptor*), que aumenta a degradação intracelular do receptor de LDL (B/E), evidenciando uma regulação pós-traducional desse receptor.

A captação hepática de colesterol esterificado pelo receptor SR-BI é uma importante via de remoção do colesterol pelo fígado para ser excretado na bile. Ogahmi et al. (2001b) demonstraram que albumina modificada por glicação *in vitro* diminui a captação seletiva de colesterol esterificado da HDL pelo receptor SR-BI. No presente estudo, demonstrou-se que a albumina dos pacientes diabéticos reduz a captação de colesterol via receptor SR-BI quando comparados à albumina dos indivíduos controles.

Esses resultados reforçam o fato de que a albumina modificada *in vivo* prejudica o transporte reverso de colesterol, não só por interferir no efluxo de colesterol, contribuindo para o acúmulo intracelular de lípides, como também por prejudicar a captação de colesterol esterificado no fígado e, possivelmente, órgãos esteroidogênicos, nos quais a expressão de receptor SR-BI é elevada e promove aporte adicional de colesterol para a síntese hormonal.

Além do prejuízo conferido ao metabolismo de lípides e lipoproteínas, os AGE estão implicados na deterioração da função da célula beta pancreática (Lim et al., 2008) e na diminuição da via de sinalização insulínica

no músculo (Miele et al., 2003). Alterações em coagulação, reatividade vascular, função endotelial e potencial inflamatório também são atribuídos aos AGE (Vlassara e Palace, 2002; Peppa e Raptis, 2008), agravando a evolução da síndrome metabólica DM e, consequentemente, da doença macrovascular.

No presente estudo, demonstrou-se que albumina isolada de pacientes portadores de diabete melito mal compensado provoca acúmulo de lípides nos macrófagos por aumentar as vias de captação de LDL modificadas, diminuir o efluxo de colesterol celular e modular vias da homeostase do colesterol que regulam a sua biossíntese. Sendo assim, independentemente da concentração de apo A-I e HDL, o controle glicêmico inadequado no DM, por favorecer a modificação de albumina por glicação avançada, prejudica o transporte reverso de colesterol de macrófagos por favorecer a modificação de albumina por glicação avançada. Considerando-se que a albumina, à semelhança da HDL, tem sua meia-vida plasmática reduzida pela glicação, nossos achados podem até terem sido minimizados pela limitação na obtenção de albumina glicada. Não obstante, considera-se a modificação glicoxidativa da albumina no compartimento arterial como consequente ao estresse oxidante e inflamatório e ao acúmulo de lípides (Nerlich e Schleicher, 1999; Shao et al., 2005; Brown et al., 2005; Sima et al., 2009). Estes podem exacerbar a geração de AGE e os efeitos da albumina AGE sobre o acúmulo de lípides em macrófagos arteriais.

Juntamente com os demais efeitos dos AGE que acarretam prejuízo no metabolismo glicolipídico (Miele et al., 2003; Riboulet-Chavey et al., 2006;

Peppa e Raptis, 2008), a albumina modificada por glicação avançada é prejudicial ao balanço de colesterol de macrófagos, contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose no DM.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram que a modificação *in vivo* da albumina por glicação avançada prejudica o transporte reverso de colesterol no diabete melito por reduzir a expressão de ABCA-1 e a remoção de colesterol de macrófagos, bem como a captação seletiva de colesterol esterificado de HDL pelo SR-BI. Independentemente de variação na concentração e composição de HDL, a glicação da albumina pode contribuir para o acúmulo de lípides em macrófagos e gênese da aterosclerose no diabete melito.

8. REFERÊNCIAS

Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group (ACCORD), Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC JR, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH JR, Probstfield JL, SIMONS-Morton DG, Friedewald WT. Effects of intensive glucose lowering in 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2545-59.

Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, Rothblat GH. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res*. 2007;48(11):2453-62.

ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, de Galan BE, Joshi R, Travert F.Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;358(24):2560-72.

Ahmed KA, Muniandy S, Ismail IS. Role of *Nε*-(Carboxymethyl)Lysine in the Development of Ischemic Heart Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;41:97–105.

Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J*. 1997;324 (Pt 2):565-70.

Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem*. 1986;261(11):4889-94.

Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of

fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(10):2465-71.

Baidoshvili A, Niessen HW, Stooker W, Huybregts RA, Hack CE, Rauwerda JA, Meijer CJ, Eijsman L, Van Hinsbergh VW, Schalkwijk CG. N(omega)-(carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels. *Atherosclerosis*. 2004;174(2):287-92.

Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):9-21.

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 USA*. 1976;73(9):3178-82.

Baumann M, Richart T, Sollinger D, Pelisek J, Roos M, Kouznetsova T, Eckstein HH, Heemann U, Staessen JA. Association between carotid diameter and the advanced glycation endproduct Nepsilon-carboxymethyllysine (CML). *Cardiovasc Diabetol*. 2009;8:45.

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

Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*. 2002;287(19):2570-81.

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

Beisswenger PJ, Howell SK, O´Dell RM, Wood MR, Touchette AD, Szwergold BS. α-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*. 2001;24(4):726-732.

Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ, Moore LL, Jean S, Brinck-Johnsen T, Bucala R, Vlassara H. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products precedes and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes.* 1995;44(7):824-9.

Blaauw J, Smit AJ, Van Pampus MG, Van Doormaal JJ, Aarnoudse JG, Rakhorst G, Graaff R. Skin autofluorescence, a marker of advanced glycation end products and oxidative stress, is increased in recently preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;195(3):717-22.

Brown BE, Dean RT, Davies MJ. Glycation of low-density lipoproteins by methylglyoxal and glycolaldehyde gives rise to the in vitro formation of lipid-laden cells. *Diabetologia*. 2005;48(2):361-9.

Brown BE, Rashid I, Van Reyk DM, Davies MJ. Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. *FEBS J*. 2007;274(6):1530-41.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997;89(3):331-40.

Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem*. 1981;50:385-432.

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

Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(20):9441-5.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(4):365-79.

Castilho G, Philipson PB, Pinto RS, Machado AP, Nakandakare ER, Passarelli M. Glicação avançada altera a incorporação de ácido oléico em lípides e reduz a síntese de colesterol em macrófagos. Publicação na forma de abstract: *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2006;50:S171.

Castilho G, Philipson PB, Pinto RS, Nakandakare ER, Quintão ECR, Passarelli M. Glycoxidation Reduces Cholesterol Biosynthesis and Increases Cholesterol Esterification in J-774 Macrophages. *Diabetes*. 2007;56(suppl 1):728-P.

Castilho G, Xavier C, Nakandakare E, Laurindo F, Passarelli M. In vitro macrophage glycoxidation induces cholesterol accumulation due to reticulum endoplasmic stress. *Atherosclerosis Supplement*. 2009;10(2):P713.

Castilho G, Sartori CH, Machado-Lima A, Nakandakare ER, Santos CX, Laurindo FR, Passarelli M. Endoplasmic reticulum stress inhibition prevents the ABCA-1 reduction in glycated albumin-treated macrophages. *Atherosclerosis Supplement*. 2010;11(2):P136.

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;94(25):13915-20.

Chiang KH, Huang PH, Huang SS, Wu TC, Chen JW, Lin SJ. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products are associated with endothelial function and predict cardiovascular events in nondiabetic patients. *Coron Artery Dis*. 2009;20(4):267-73.

Cohen MP, Ziyadeh FN, Chen S. Amadori-modified glycated serum proteins and accelerated atherosclerosis in diabetes: pathogenic and therapeutic implications. *J Lab Clin Med*. 2006;147(5):211-9.

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

Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation*. 2006;113(21):2548-55.

De Vries R, Groen AK, Perton FG, Dallinga-Thie GM, Van Wijland MJ, Dikkeschei LD, Wolffenbuttel BH, Van Tol A, Dullaart RP. Increased cholesterol efflux from cultured fibroblasts to plasma from hypertriglyceridemic type 2 diabetic patients: roles of pre beta-HDL, phospholipid transfer protein and cholesterol esterification. *Atherosclerosis.* 2008;196(2):733-41.

De Vries R, Kerstens MN, Sluiter WJ, Groen AK, Van Tol A, Dullaart RP. Cellular cholesterol efflux to plasma from moderately hypercholesterolaemic type 1 diabetic patients is enhanced, and is unaffected by simvastatin treatment. *Diabetologia*. 2005;48(6):1105-13.

De Winther M, Hofker M. Scavenging new insights into atherogenesis. *J Clin Invest*. 2000;105: 1039-1041.

Diabetes Control And Complications Trial/Epidemiology Of Diabetes Interventions And Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ, Raskin P, Zinman B. Intensive diabetes treatment and

cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2643-53.

Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux is defective in free cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem*. 2002;277(45):43271-80.

Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*. 2003;5(9):781-92.

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;51(6):1407-15.

Fielding CJ, Moser K. Evidence for the separation of albumin- and apo A-I-dependent mechanisms of cholesterol efflux from cultured fibroblasts into human plasma. *J Biol Chem*. 1982;257(18):10955-60.

Figge J, Rossing TH, Fencl V. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J Lab Clin Med*. 1991;117(6):453-67.

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem*. 1998;273:18714-18719.

Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, Takeuchi M, Motomiya Y, Bucala R, Iida S, Tamaki K, Imaizumi T, Cooper ME, Okuda S. AGEs activate mesangial TGF-beta-Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction. *Kidney Int.* 2004;66(6):2137-47.

Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W. ABCA1 and ABCG1

synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(3):534-40.

Giardina TM, Steer JH, Lo SZ, Joyce DA. Uncoupling protein-2 accumulates rapidly in the inner mitochondrial membrane during mitochondrial reactive oxygen stress in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1777(2):118-29.

Goldberg T, Cai W, Peppa M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(8):1287-91.

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

Goldstein JL, Debose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 2006;13;124(1):35-46.

Gugliucci A, Stahl AJC. In vitro glycation of human apolipoprotein A-I reduces its efficiency in lecithin: cholesterol acyltransferase activation. *Clin Chim Acta*. 1991;204:37-42.

Ha JS, Ha CE, Chao JT, Petersen CE, Theriault A, Bhagavan NV. Human serum albumin and its structural variants mediate cholesterol efflux from cultured endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1640(2-3):119-28.

Haslbeck KM, Bierhaus A, Erwin S, Kirchner A, Nawroth P, Schlotzer U, Neundorfer B, Heuss D. Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE)-mediated nuclear factor-kappaB activation in vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve*. 2004;29(6):853-60.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The Distribution and Chemical Composition of Ultracentrifugally Separated Lipoproteins in Human Serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345-53.

Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM. Aging of proteins immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillar reaction in vivo. *J Biol Chem*. 1989;264(7):3758-64.

He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992;358(6383):209-15.

Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*. 2008;135(7):1311-23.

Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, Thomas MC, Forbes JM, O'brien R, Cooper ME, Chin-Dusting JP, Sviridov D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia.* 2007;50(8):1770-9.

Horiuchi S, Unno Y, Usui H, Shikata K, Takaki K, Koito W, Sakamoto Y, Nagai R, Makino K, Sasao A, Wada J, Makino H. Pathological roles of advanced glycation end product receptors SR-A and CD36. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:671-5.

Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(21):12027-32.

Hübner A, Cavanagh-Kyros J, Rincon M, Flavell RA, Davis RJ. Functional cooperation of the proapoptotic Bcl2 family proteins Bmf and Bim in vivo. *Mol Cell Biol*. 2010;30(1):98-105.

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 a 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.

Ishiyama J, Taguchi R, Yamamoto A, Murakami K. Palmitic acid enhances lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1) expression and promotes uptake of oxidized LDL in macrophage cells. *Atherosclerosis*. 2010;209(1):118-24.

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

Jalkanen J, Leppänen P, Närvänen O, Greaves DR, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted decoy human macrophage scavenger receptor (SR-AI) in LDL receptor knock-out mice. *Atherosclerosis*. 2003;169(1):95-10.

Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. The role of AGEs in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10):979-86.

Jeong HJ, Lee HS, Kim KS, Kim YK, Yoon D, Park SW. Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J Lipid Res.* 2008;49(2):399-409.

Jin C, Lu L, Zhang RY, Zhang Q, Ding FH, Chen QJ, Shen WF. Association of serum glycated albumin, C-reactive protein and ICAM-1 levels with diffuse coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2009;408(1-2):45-9.

Kallner A. Elimination of ^{14}C-glycated albumin from serum of rabbit. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990;50(7):763-8.

Kaplan M, Aviram M, Knopf C, Keidar S. Angiotensin II reduces macrophage cholesterol efflux: a role for the AT-1 receptor but not for the ABC1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(5):1529-34.

Kaplan M, Kerry R, Aviram M, Hayek T. High glucose concentration increases macrophage cholesterol biosynthesis in diabetes through activation of the sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1): inhibitory effect of insulin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;52(4):324-32.

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;33(6):709-15.

Kato H, Shin DB, Hayase F. 3-Deoxyglucosone cross-links proteins under physiological conditions. *Agric Biol Chem*. 1987;51:2009-2011.

Keidar S, Attias J, Heinrich R, Coleman R, Aviram M. Angiotensin II atherogenicity in apolipoprotein E deficient mice is associated with increased cellular cholesterol biosynthesis. *Atherosclerosis*. 1999;146(2):249-57.

Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 1995;115(2):201-15.

Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1(2):121-31.

Kisugi R, Kouzuma T, Yamamoto T, Akizuki S, Miyamoto H, Someya Y, Yokoyama J, Abe I, Hirai N, Ohnishi A. Structural and glycation site

changes of albumin in diabetic patient with very high glycated albumin. *Clin Chim Acta*. 2007;382(1-2):59-64.

Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J*. 2010;57(9):751-62.

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 USA*; 1997;94(12):6474-9.

Kouzuma T, Uemastu Y, Usami T, Imamura S. Study of glycated amino acid elimination reaction for an improved enzymatic glycated albumin measurement method. *Clin Chim Acta*. 2004;346(2):135-43.

Kouzuma T, Usami T, Yamakoshi M, Takahashi M, Imamura S. An enzymatic method for the measurement of glycated albumin in biological samples. *Clin Chim Acta*. 2002;324(1-2):61-71.

Krook M, Ghosh D, Strömberg R, Carlquist M, Jörnvall H. Carboxyethyllysine in a protein: native carbonyl reductase/NADP(+)-dependent prostaglandin dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(2):502-6.

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

Kumeda Y, Inaba M, Shoji S, Ishimura E, Inariba H, Yabe S, Okamura M, Nishizawa Y. Significant correlation of glycated albumin, but not glycated haemoglobin, with arterial stiffening in haemodialysis patients with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol* (Oxf). 2008;69(4):556-61.

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;41(9):1166-73.

Layton GJ, Jerums G. Effect of glycation of albumin on its renal clearance in normal and diabetic rats. *Kidney Int*. 1988;33(3):673-6.

Lee CF, Qiao M, Schröder K, Zhao Q, Asmis R. Nox4 is a novel inducible source of reactive oxygen species in monocytes and macrophages and mediates oxidized low density lipoprotein-induced macrophage death. *Circ Res*. 2010;106(9):1489-97.

Lim M, Park L, Shin G, Hong H, Kang I, Park Y. Induction of apoptosis of Beta cells of the pancreas by advanced glycation end-products, important mediators of chronic complications of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1150:311-5.

Livak KJ, Schmitgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001;25:402-408.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.

Lu L, Pu LJ, Xu XW, Zhang Q, Zhang RY, Zhang JS, Hu J, Yang ZK, Lu AK, Ding FH, Shen J, Chen QJ, Lou S, Fang DH, Shen WF. Association of serum levels of glycated albumin, C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha with the severity of coronary artery disease and renal impairment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem*. 2007;40(11):810-6.

Lu L, Pu LJ, Zhang Q, Wang LJ, Kang S, Zhang RY, Chen QJ, Wang JG, De Caterina R, Shen WF. Increased glycated albumin and decreased

esRAGE levels are related to angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2009;206(2):540-5.

Machado AP, Pinto RS, Moyses ZP, Nakandakare ER, Quintao EC, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(3):392-403.

Marsche G, Weigle B, Sattler W, Malle E. Soluble RAGE blocks scavenger receptor CD36-mediated uptake of hypochlorite-modified low-density lipoprotein. *FASEB J*. 2007;21(12):3075-82.

Masumi AI, Otokozawa S, Schaefer EJ, Asztalos BF, Nakajima K, Shrader P, Kathiresan S, Meigs JB, Williams G, Nathan DM. Glycated albumin and direct low density lipoprotein cholesterol levels in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2009;406(1-2):71-4.

Matsui T, Yamagishi S, Ueda S, Nakamura K, Imaizumi T, Takeuchi M, Inoue H. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, inhibits advanced glycation end-product (AGE)-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through downregulation of receptor for AGEs via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *J Int Med Res*. 2007;35(4):482-9.

Matsuki K, Tamasawa N, Yamashita M, Tanabe J, Murakami H, Matsui J, Imaizumi T, Satoh K, Suda T. Metformin restores impaired HDL-mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis*. 2009;206(2):434-8.

Mauldin JP, Nagelin MH, Wojcik AJ, Srinivasan S, Skaflen MD, Ayers CR, Mcnamara CA, Hedrick CC. Reduced expression of ATP-binding cassette transporter G1 increases cholesterol accumulation in

macrophages of patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2008;117(21):2785-92.

Mauldin JP, Srinivasan S, Mulya A, Gebre A, Parks JS, Daugherty A, Hedrick CC. Reduction in ABCG1 in Type 2 diabetic mice increases macrophage foam cell formation. *J Biol Chem*. 2006;281(30):21216-24.

Mehta JL, Chen J, Hermonat PL, Romeo F, Novelli G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res*. 2006;69: 36-45.

Mei CL, Chen ZJ, Liao YH, Wang YF, Peng HY, Chen Y. Interleukin-10 inhibits the down-regulation of ATP binding cassette transporter A1 by tumour necrosis factor-alpha in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Cell Biol Int*. 2007;31(12):1456-61.

Mentink CJ, Kilhovd BK, Rondas-Colbers GJ, Torjesen PA, Wolffenbuttel BH. Time course of specific AGEs during optimised glycaemic control in type 2 diabetes. *Neth J Med.* 2006;64(1):10-6.

Mera K, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, Nagai R, Otagiri M. Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin. *J Pharm Sci*. 2010;99(3):1614-25.

Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, GIUDICELLI J, Beguinot F, Van Obberghen E. Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278(48):47376-87.

Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, Van Ypersele De Strihou C, Maeda K. Accumulation of albumin-linked and free-form

pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol*. 1996;7(8):1198-206.

Moradi H, Yuan J, Ni Z, Norris K, Vaziri ND. Reverse cholesterol transport pathway in experimental chronic renal failure. *Am J Nephrol*. 2009;30(2):147-54.

Morris MA, Preddy L. Glycosylation accelerates albumin degradation in normal and diabetic dogs. *Biochem Med Metab Biol*. 1986;35(3):267-70.

Moukdar F, Robidoux J, Lyght O, Pi J, Daniel KW, Collins S. Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice. *J Lipid Res*. 2009;50(1):59-70.

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

Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;116(11):1226-33.

Nauseef WM. Biological roles for the NOX family NADPH oxidases. *J Biol Chem*. 2008;283(25):16961-5.

Nerlich AG, Schleicher ED. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in atherosclerotic vascular lesions as a marker for local oxidative stress. *Atherosclerosis.* 1999;144(1):41-7.

Nobecourt E, Davies MJ, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, Januszewski AS, Jenkins AJ, Barter PJ, Rye KA. The impact of

glycation on apoliprotein A-1 structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase. *Diabetologia*. 2007;50:643-53.

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 Comm*. 1999;256:89-93.

Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H. Cd36, a member of the class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001a;276(5):3195-202.

Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, Nakayama H. Scavenger receptor class B type I – mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001b;276:13348-55.

Ohkawara E, Nohara Y, Kanno Y, Suzuki H, Matsumoto G, Kinoshita T, WATANABE M. Fructosamine assay using albumin extracted from serum. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(9):1121-4.

Okuda L, Rocco D, Nakandakare E, Catanozi S, Passarelli M. Disturbances in cholesterol efflux from macrophage foam cells induced by advanced glycated albumin are not related to the inflammatory cytokine production. *Atherosclerosis Supplement*. 2009;10(2):P686.

Oram JF, Vaughan AM. ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2006;99(10):1031-43.

Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. *Diabetes.* 2006;55(5):1463-9.

Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Morton RE, Shimabukuro AF, Quintao EC. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and "in vitro" glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia*. 1997;40(9):1085-93.

Passarelli M, Shimabukuro AFM, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Carrilho AJF, Quintão ECR. The diminished rate of mouse peritoneal macrophage cholesterol efflux is not related to the degree of HDL glycation in diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*. 2000;301:119-34.

Passarelli M, Tang C, Mcdonald TO, O'brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes*. 2005;54(7):2198-205.

Peppa M, Raptis SA. Advanced glycation end products and cardiovascular disease. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4(2):92-100.

Peters T Jr. Serum albumin. *Adv Protein Chem*. 1985;37:161-245.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.

Pinto RS, Machado AP, Paim BA, Vercesi AE, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. Intracellular Oxidative Stress Induced by Advanced Glycated Albumin Reduces ABCA-1, ABCG-1 and Increases RAGE and CD-36 Expression). *Diabetes.* 2007;56(suppl 1):724-P.

Pinto RS, Paim BA, Machado-Lima A, Inada NM, Nakandakare E, Vercesi AE, Passarelli M. Reduced ABCA-1 expression in macrophages submitted to glycoxidation relates to an increased mitochondrial and NADPH oxidase-mediated oxidative stress and to a diminished

mitochondrial respiratory chain activity. *Atherosclerosis Supplement*. 2009;10(2):P1139.

Pinto RS, Paim BA, Castilho G, Machado-Lima A, Philipson PB, Inada NM, Nakandakare E, Vercesi AE, Passarelli M. Advanced glycated albumin disrupts macrophage-cholesterol homeostasis by inducing production of reactive oxygen species. Submetido 2010.

Pu LJ, Lu L, Shen WF, Zhang Q, Zhang RY, Zhang JS, Hu J, Yang ZK, Ding FH, Chen QJ, Shen J, Fang DH, Lou S. Increased serum glycated albumin level is associated with the presence and severity of coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Circ J*. 2007;71(7):1067-73.

Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. Diabetes. 2000;49(9):1561-70.

Radhakrishnan A, Goldstein JL, Mcdonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab*. 2008;8(6):512-21.

Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Herold K, Yan SF, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*. 2005;15(7):16R-28R.

Rashiduni DL, Rifici VA, Schneider SH, Khachadurian AK. Glycation of high density lipoprotein does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity. *Metabolism*. 1999;48:139-43.

Rawson RB. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(8):631-40.

Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem*. 1975;12;65(1-2):42-9.

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*. 2000;289(5484):1524-9.

Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes*. 2006;55(5):1289-99.

Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1783-7.

Rodiño-Janeiro BK, González-Peteiro M, Ucieda-Somoza R, González-Juanatey JR, Alvarez E. Glycated albumin, a precursor of advanced glycation end-products, up-regulates NADPH oxidase and enhances oxidative stress in human endothelial cells: molecular correlate of diabetic vasculopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26(7):550-8.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29.

Salomon RG, Kaur K, Podrez E, Hoff HF, Krushinsky AV, Sayre LM. HNE-derived 2-pentylpyrroles are generated during oxidation of LDL, are more prevalent in blood plasma from patients with renal disease or atherosclerosis, and are present in atherosclerotic plaques. *Chem Res Toxicol*. 2000;13(7):557-64.

Sayre LM, Sha W, Xu G, Kaur K, Nadkarni D, Subbanagounder G, Salomon RG. Immunochemical evidence supporting 2-pentylpyrrole formation on

proteins exposed to 4-hydroxy-2-nonenal. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(7):1194-201.

Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G, Simionescu N, Simionescu M, Stern D. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(19):8807-11.

Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest*. 1995;96(3):1395-403.

Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest.* 1990;85(2):380-4.

Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Dalal M, Varadhan R, Walston J, Guralnik JM, Fried LP. Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. *Aging Clin Exp Res*. 2009;21(2):182-90.

Serfaty-Lacrosniere C, Civeira F, Lanzberg A, Isaia P, Berg J, Janus ED, Smith MP JR, Pritchard PH, Frohlich J, Lees RS, Barnard GF, Ordovas JM, Schaefer EJ. Homozygous Tangier disease and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 1994;107:85–98.

Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem*. 1984;259(6):3812-7.

Shao B, Fu X, Mcdonald TO, Green PS, Uchida K, O'brien KD, Oram JF, Heinecke JW. Acrolein Impairs ATP Binding Cassette Transporter A1-dependent Cholesterol Export from Cells through Site-specific Modification of Apolipoprotein A-I. *J Biol Chem.* 2005;280(43):36386-96.

Shao B, Pennathur S, Pagani I, Oda MN, Witztum JL, Oram JF, Heinecke JW. Modifying apolipoprotein A-I by malondialdehyde, but not by an array of other reactive carbonyls, blocks cholesterol efflux by the ABCA1 pathway. *J Biol Chem*. 2010;285(24):18473-84.

Sima AV, Botez GM, Stancu CS, Manea A, Raicu M, Simionescu M. Effect of irreversibly glycated LDL in human vascular smooth muscle cells: Lipid loading, oxidative and inflammatory stress. *J Cell Mol Med*. In press 2009.

Stitt AW, He C, Friedman S, Scher L, Rossi P, Ong L, Founds H, Li YM, Bucala R, Vlassara H. Elevated AGE-modified ApoB in sera of euglycemic, normolipidemic patients with atherosclerosis: relationship to tissue AGEs. *Mol Med*. 1997;3(9):617-27.

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;278(8):5813-20.

Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;161(2):245-54.

Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:123-39.

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.

Tamura Y, Adachi H, Osuga J, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, Okazaki H, Tomita S, Iizuka Y, Shimano H, Nagai R, Kimura S, Tsujimoto M, Ishibashi S. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12613-7.

Tang C, Vaughan AM, Oram JF. Janus kinase 2 modulates the apolipoprotein interactions with ABCA1 required for removing cellular cholesterol. *J Biol Chem*. 2004;279(9):7622-8.

Tarr PT, Tarling EJ, Bojanic DD, Edwards PA, Baldán A. Emerging new paradigms for ABCG transporters. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(7):584-93.

Terpstra AH, Nicolosi RJ, Herbert PN. In vitro incorporation of radiolabeled cholesteryl esters into high and low density lipoproteins. *J Lipid Res*. 1989;30(11):1663-71.

Thornalley PJ. Advanced glycation end products in renal failure. *J Ren Nutr*. 2006;16(3):178-84.

Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:111-7.

Torreggiani M, Liu H, Wu J, Zheng F, Cai W, Striker G, Vlassara H. Advanced glycation end product receptor-1 transgenic mice are resistant to inflammation, oxidative stress, and post-injury intimal hyperplasia. *Am J Pathol*. 2009;175(4):1722-32.

Tsukano H, Gotoh T, Endo M, Miyata K, Tazume H, Kadomatsu T, Yano M, Iwawaki T, Kohno K, Araki K, Mizuta H, Oike Y. The Endoplasmic Reticulum Stress-C/EBP Homologous Protein Pathway-Mediated

Apoptosis in Macrophages Contributes to the Instability of Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(10):1925-32.

Uk Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet.* 1998;352(9131):837-53.

Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppa M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body´s AGE pool and induced inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:461-466.

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911-16.

VADT Investigators. Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, Mccarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD; Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360(2):129-39.

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;47(5):844-52.

Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A. Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*, 240(4858):1546-8, 1988.

Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med*. 1995;1(6):634-46.

Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*. 2002;251(2):87-101.

Wang N, Chen W, Linsel-Nitschke P, Martinez LO, Agerholm-Larsen B, Silver DL, Tall AR. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest*. 2003;111(1):99-107.

Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, Tall AR, Rader DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2216-24.

Wang Y, Kurdi-Haidar B, Oram JF. LXR-mediated activation of macrophage stearoyl-CoA desaturase generates unsaturated fatty acids that destabilize ABCA1. *J Lipid Res*. 2004;45(5):972-80.

Xu G, Liu Y, Kansal MM, Sayre LM. Rapid cross-linking of proteins by 4-ketoaldehydes and 4-hydroxy-2-alkenals does not arise from the lysine-derived monoalkylpyrroles. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(9):855-61.

Yamada S, Inaba M, Shidara K, Okada S, Emoto M, Ishimura E, Nishizawa Y. Association of glycated albumin, but not glycated hemoglobin, with peripheral vascular calcification in hemodialysis patients with type 2 diabetes. *Life Sci.* 2008;83(13-14):516-9.

Yamagishi S, Matsui T, Ueda S, Nakamura K, Imaizumi T. Advanced Glycation End Products (AGEs) and Cardiovascular Disease (CVD) in Diabetes. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2007;5(3):236-40.

Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Noda Y, Imaizumi T. Receptor for advanced glycation end products (RAGE): a novel therapeutic target for diabetic vascular complication. *Curr Pharm Des*. 2008a;14(5):487-95.

Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Ueda S, Noda Y, Imaizumi T. Inhibitors of advanced glycation end products (AGEs): potential utility for the treatment of cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther*. 2008b;26(1):50-8.

Yamagishi S, Takeuchi M, Matsui T, Nakamura K, Imaizumi T, Inoue H. Angiotensin II augments advanced glycation end product-induced pericyte apoptosis through RAGE overexpression. *FEBS Lett*. 2005;579(20):4265-70.

Yamazaki E, Inagaki M, Kurita O, Inoue T. Kinetics of fatty acid binding ability of glycated human serum albumin. *J Biosci*. 2005;30(4):475-81.

Yatabe J, Sanada H, Yatabe MS, Hashimoto S, Yoneda M, Felder RA, Jose PA, Watanabe T. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the activation of ERK and NADPH oxidase by mechanical strain in mesangial cells in the absence of angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(5):F1052-60.

Ye Q, Chen Y, Lei H, Liu Q, Moorhead JF, Varghese Z, Ruan XZ. Inflammatory stress increases unmodified LDL uptake via LDL receptor: an alternative pathway for macrophage foam-cell formation. *Inflamm Res*. 2009;58(11):809-18.

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;50(6):1495-504.

Yin K, Liao DF, Tang CK. ATP-binding membrane cassette transporter A1 (ABCA1): a possible link between inflammation and reverse cholesterol transport. *Mol Med*. 2010;16(9-10):438-49.

Younis N, Sharma R, Soran H, Charlton-Menys V, Elseweidy M, Durrington PN. Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(4):378-84.

Ywashima Y, Eto M, Hata A, Kaku K, Horiuchi S, Ushikubi F, Sano H. Advanced glycation end products-induced gene expression of scavenger receptors in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277:368-380.

Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med*. 2006;84(4):276-94.

Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science*. 2009;325(5936):100-4.

Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest*. 2006;116(3):607-14.

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

Zhou H, Tan KC, Shiu SW, Wong Y. Determinants of leukocyte adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 gene expression in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2008;57(8):1135-40.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 09.08.06 **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa n ° **740/06**, intitulado: **"Influência da glicoxidação sobre a expressão diferencial de genes em macrófagos e sobre o fluxo de lípides,mediado por HDL"** apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Dr(a): Edna Regina Nakandakare
Pesquisador(a)Executante ;Sr(a): Adriana Penno Machado

CAPPesq, 09 de agosto de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5° andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
fê

Carta datada de 06/02/2009

Ao
Departamento de Clínica Médica

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/05/2009, tomou conhecimento da **alteração do Pesquisador Responsável** do Protocolo de Pesquisa nº **0740/06**, intitulado: **"Influência da glicoxidação sobre a expressão diferencial de genes em macrófagos e sobre o fluxo de lípides, mediado por HDL"**, passando a responsabilidade da **Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare** para a **Profa. Dra. Marisa Passarelli**, bem como tomou ciência do **Relatório de Andamento do Estudo.**

CAPPesq, 06 de maio de 2009.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos. 225, 5º andar - CEP 05430 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
hf

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: / /
ENDEREÇO.....Nº.....APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE : .....
CEP: . ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: / /
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO:.... .....
BAIRRO:..... CIDADE: .....
CEP: .....TELEFONE: DDD ( ) .....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Influência da glicoxidação sobre a expressão diferencial de genes em macrófagos e o fluxo de lípides, mediado por HDL.

2.PESQUISADOR: **Adriana Machado Saldiba de Lima (Orientação: Dra. Edna Regina Nakandakare/ Dra. Marisa Passarelli)**

CARGO/FUNÇÃO: **Nutricionista** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **18133**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Laboratório de Lípides (LIM-10) da Faculdade de Medicina da USP**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(em virtude da necessidade de coletas de sangue)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **4 anos**

III –REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO

1. justificativa e os objetivos da pesquisa; **2**. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; **3**. desconfortos e riscos esperados; **4**. benefícios que poderão ser obtidos; **5**. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo;

1) O controle do diabetes é importante para prevenir as doenças cardíacas, renais, neurais e oculares. Este estudo tem a finalidade de avaliar parâmetros importantes para o controle do diabetes, como a glicose, colesterol, triglicérides, hemoglobina glicada e as frações que transportam o colesterol no sangue

2) Será colhida uma amostra de sangue, após jejum de 12 horas, para determinação da glicose, colesterol, triglicérides e HDL do plasma, além do isolamento de todas as frações que transportam o colesterol no sangue.

3) Os riscos e desconfortos serão mínimos, apenas decorrentes da coleta de sangue.

4) Os resultados contribuirão para melhor controle do diabetes.

5) Deverá ser mantida a dieta e a medicação habitual, de acordo com recomendação médica, bem como o agendamento de todas as consultas, como usual.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

O sujeito da pesquisa tem o direito de acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas, assim como a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O mesmo terá salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Toda a assistência médica será realizada pela equipe do ambulatório de Dislipidemias do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP. Não cabe indenização pelo fato do estudo apresentar risco mínimo à saúde.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra Edna Regina Nakandakare
Laboratório de Lípides da Faculdade de Medicina da USP
Av. Dr. Arnaldo, 455 - 3° andar sala 3317 fone: 3066-7263

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, e ter entendimento o que me foi explicado consinto em participar do presente; Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20

_____ _____

assinatura do sujeito ou responsável legal **assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível)**

Medicamentos utilizados e tabagismo no grupo C

	Indivíduos C												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total
Anti-hipertensivos						■					■		2
L-tiroxina								■					1
Tabagismo				■	■	■							3

Medicamentos utilizados e tabagismo no grupo DM 1

	Indivíduos DM 1													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total
Insulina	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13
Carbamazepina	■													1
Fluoxetina					■									1
L-tiroxina					■			■						2
Tabagismo			■											1

Medicamentos utilizados e tabagismo no grupo DM 2

	Indíviduos DM 2											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
Insulina	■	■	■	■	■	■		■	■	■	■	10
Sulfoniluréia	■		■		■		■	■	■	■		7
Metformina	■				■	■	■	■	■		■	7
Acarbose	■						■					2
Pioglitazona					■							1
Estatinas	■	■	■	■	■	■	■	■		■	■	10
Fibratos					■			■				2
Anti-hipertensivos	■				■			■			■	5
AAS	■	■				■	■	■	■	■	■	8
Tabagismo			■			■						2

1

Idade, dados antropométricos e bioquímicos do grupo C

Indivíduos C	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Idade (anos)	40	23	27	28	23	441	22	28	23	26	28	26
Peso (Kg	90,6	75,2	57,9	49,3	67,4	90,4	78,3	82,0	47,8	56,3	111,4	64,7
Altura (m)	1,72	1,76	1,62	1,54	1,63	1,64	1,78	1,71	1,58	1,58	1,98	1,71
IMC (Kg/m^2)	30,6	24,3	22,1	20,8	25,4	33,6	24,7	28,0	19,3	22,6	28,4	22,3
Glicose (mg/dL)	74	83	84	75	78	81	69	84	80	84	75	69
HbA_{1c} (%)	4,6	6,2	5,2	4,7	5,4	5,5	5,2	5,4	5,5	5,3	5,1	5,2
Frutosamina (µmol/L)	218	231	245	233	223	211	268	204	290	260	236	238
Albumina Glicada (%)	11,1	10,5	10,3	9,3	10,0	7,8	9,8	7,4	11,3	11,4	6,5	12,6
Albumina (g/dL	5,2	5,3	4,9	5,2	4,7	4,8	5,5	4,4	5,5	5,0	5,3	5,9
Microalbuminúria (mg/dL)	5,4	4,5	2,9	9,7	27	7,8	6,2	3,7	5,2	2,3	11,2	6,8
CT (mg/dL)	207	152	124	167	164	169	183	177	183	187	172	157
HDL-c (mg/dL)	56	64	46	83	83	63	59	49	74	99	51	68
LDL-c (mg/dL	105	80	62	63	72	89	106	110	77	73	93	79
VLDL-c (mg/dL)	46	8	16	21	9	17	18	18	32	15	28	10
TG (mg/dL)	229	41	79	104	44	86	88	89	162	76	139	52

IMC: Índice de Massa Corporal, CT: colesterol total, TG: triglicérides

Idade, tempo de DM, dados antropométrico e bioquímicos do grupo DM 1

Indivíduos C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Idade (anos)	31	20	25	22	28	26	22	21	20	32	42	25	23
Tempo de DM (anos)	21	3	8	11	16	10	18	12	10	27	15	24	12
Peso (Kg	63,3	62,1	53,3	53,5	75,3	61,2	59,2	62	69,5	60,4	78,5	57	54
Altura (m)	1,80	1,75	1,57	1,62	1,65	1,61	1,61	1,76	1,72	1,53	1,72	1,58	1,64
IMC (Kg/m^2)	19,5	20,3	21,6	20,4	27,7	23,8	22,8	20,1	23,5	25,8	26,7	22,8	20,1
Glicose (mg/dL)	191	198	259	254	111	154	249	149	299	173	26	260	89
HbA_{1c} (%)	8,7	14,5	8,4	11,0	9,2	10,4	11,8	10,0	9,3	9,0	10,7	9,5	7,8
Frutosamina (µmol/L)	452	656	363	572	356	502	493	542	429	423	338	376	423
Albumina Glicada (%)	27,5	42,7	24,8	32,4	18,9	28,3	36,5	29,9	26,2	24,0	19,6	19,9	21,7
Albumina (g/dL	5,2	4,3	3,8	4,8	5,0	6,8	4,7	4,6	5,1	4,2	3,9	4,3	5,4
Microalbuminúria (mg/dL)	6,8	7,0	8,2	2,3	18,5	4,4	14,2	9,5	2,3	2,4	27,0	20,5	14,4
CT (mg/dL)	125	194	186	162	167	122	171	142	141	183	171	181	128
HDL-c (mg/dL)	70	50	63	69	45	49	50	72	47	77	60	48	45
LDL-c (mg/dL	45	111	105	63	102	53	85	61	84	98	97	115	72
VLDL-c (mg/dL)	10	33	18	30	20	20	36	9	10	8	14	18	11
TG (mg/dL)	52	166	90	152	98	99	180	44	51	41	70	91	56

IMC: Índice de Massa Corporal, CT: colesterol total, TG: triglicérides

Idade, tempo de DM, dados antropométrico e bioquímicos do grupo DM 2

Indivíduos C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Idade (anos)	52	62	42	37	73	72	48	54	75	65	68
Tempo de DM (anos)	15	14	8	21	24	15	6	14	7	12	24
Peso (Kg	102,5	87,3	61,4	71,3	92,3	70,0	52,0	80,7	85,0	61,4	63,7
Altura (m)	1,70	1,60	1,60	1,67	1,62	1,70	1,51	1,72	1,74	1,47	1,46
IMC (Kg/m^2)	35,7	34,3	24,1	25,6	35,4	24,2	22,8	27,4	28,1	28,4	29,9
Glicose (mg/dL)	180	235	352	109	154	251	191	170	229	323	264
HbA_{1c} (%)	10,2	9,5	11,8	9,6	10,2	9,2	9,1	10,1	10,4	13,4	9,2
Frutosamina (µmol/L)	434	379	529	362	328	420	315	322	354	579	364
Albumina Glicada (%)	29,6	21,7	34,6	21,8	18,4	24,3	17,5	16,6	19,3	41,1	19,4
Albumina (g/dL)	4,5	4,9	5,1	4,0	4,6	4,5	4,6	4,6	4,1	4,2	5,2
Microalbuminúria (mg/dL)	10,6	16,2	8,9	8,9	4,8	8,9	8,9	15,7	24,1	15	4,4
CT (mg/dL)	117	154	200	246	158	240	186	175	183	185	207
HDL-c (mg/dL)	42	47	68	58	34	114	55	42	38	59	57
LDL-c (mg/dL	39	76	119	176	77	114	101	107	88	93	122
VLDL-c (mg/dL)	36	31	13	12	47	12	30	26	57	33	28
TG (mg/dL)	178	155	67	60	364	62	150	131	284	165	304

IMC: Índice de Massa Corporal, CT: colesterol total, TG: triglicérides