Gabriela Castilho

**Inibição do estresse do retículo endoplasmático
restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de
colesterol em macrófagos tratados com albumina
modificada por glicação avançada**

**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

2012

Gabriela Castilho

**Inibição do estresse do retículo endoplasmático
restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de
colesterol em macrófagos tratados com albumina
modificada por glicação avançada**

**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

2012

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (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 10/50108-4.

Aos meus pais, Miguel e Lucia, meus exemplos, meus mentores, meus companheiros. À minha irmã, Fernanda, pelo apoio e por ser minha fiel confidente, sempre. Ao meu noivo, Reinaldo, pela paciência, parceria, admiração e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa Passarelli, primeiramente pela orientação e pelos ensinamentos. Agradeço também pela parceria, característica tão presente entre você e seus alunos. Nossos passos são, cuidadosamente, acompanhados por sua supervisão crítica e pela busca da próxima pergunta. Agradeço também por lições que não se ensinam, apenas são absorvidas quando nos saltam aos olhos. Levo comigo sua ética, seu perfeccionismo e o exemplo da sua competência. Obrigada. Não poderia deixar de agradecer pela paciência, perseverança e disponibilidade, sem as quais eu não teria começado a iniciação científica, ingressado no mestrado e passado para o doutorado. Darwin, de fato, está certo em relação à seleção natural.

À Dra. Patrícia Cazita por abrir as portas do Laboratório de Lípidos a uma aluna de graduação semi-desconhecida. Agradeço imensamente pela oportunidade e pelos ensinamentos iniciais sem os quais seria impossível seguir a diante. Agradeço pela convivência, pelo carinho, pelas discussões, acadêmicas, políticas, familiares e pela amizade e carinho.

À Profa. Dra. Edna Regina Nakandakare pelo constante apoio aos alunos de pós-graduação. A sua pronta disponibilidade para ajudar a todos nós em diversas situações, desde problemas estatísticos à burocracia que acompanha o processo acadêmico, permite que a trajetória da pós-graduação seja mais leve. Saiba que todos nós reconhecemos o difícil papel que é chefiar o Laboratório de Lípidos mantendo seu funcionamento, harmonia, organização.

Ao Dr. Eder Quintão, pela presença constante, por apostar nos mais absurdos experimentos propostos, e por ser a força motriz do laboratório. Seu entusiasmo mantém todos nós debruçados sobre nossos projetos, para um dia, quem sabe, chegarmos perto da sua sabedoria. Sabemos que sua dedicação foi levemente reduzida nos últimos anos, mas gostaria de deixar registrado que isso tem três ótimos motivos: Bernardo, Luisa e Estela.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, pela convivência, pelo apoio e pela amizade. Saiba que a sua dedicação aos seus trabalhos, os quais são os mais diversos, serve de modelo aos novos alunos que entram no laboratório. Agradeço pela amizade, pela força em momentos difíceis, dentro e fora do ambiente acadêmico. Levo seus

ensinamentos comigo, junto com sua generosidade, e sou grata por ter desenvolvido projetos associados aos seus, especialmente porque ocorrem em dias que rendem boas risadas...

À Dra. Valéria Suti Nunes pela incansável dedicação ao Laboratório de Lípidos, sem a qual muitos problemas, das mais diversas origens, não seriam resolvidos. Obrigada pela paciência, amizade, carinho e apoio em todos os passos da minha passagem pelo Laboratório de Lípidos.

À Dra. Ana Maria Pitta Lottenberg pelo constante apoio e incentivo. Agradeço pela companhia e discussões acadêmicas e profissionais, que abrem nossa mente às aplicações de nossas pesquisas, justificando todo o conhecimento e empenho dedicado à pós-graduação.

À Dra. Débora Rocco, minha amiga, confidente, companheira de laboratório e de momentos de descontração. Agradeço pela alegria que você emana, pela sua generosidade com todos ao seu redor, e por ser uma amiga de verdade, que levarei comigo por toda a vida. Saiba que você faz muita falta no Laboratório de Lípidos.

Ao Dr. Raphael de Souza Pinto, meu irmão de bancada. Agradeço pelo apoio, por estar sempre por perto quando os géis não polimerizavam, quando os macrófagos fungavam e quando tudo parecia não fazer mais sentido. Ser sua parceira por tantos anos de pós-graduação foi um privilégio. Levo um grande amigo e afilhado deste doutorado, saiba que foi uma honraabençoar seu casamento. Aguarde uma visita em breve em Maceió!

À Lígia Shimabukuro Okuda, minha fiel escudeira, minha companheira de todos os passos da pós-graduação, minha amiga. Ingressamos juntas, enfrentamos todos os obstáculos e recompensas do processo acadêmico juntas e sairemos juntas (espero!), adentrando novas fases de nossas vidas pessoais, que, por coincidência, também foram simultâneas. Foi um prazer, Lí, ter uma pessoa com tamanha generosidade ao lado, sempre me mostrando o lado positivo das coisas, mesmo quando eles pareciam estar tão distantes. Independente de nossos destinos pós-defesa, espero sempre tê-la por perto, mesmo que de longe.

À Dra. Adriana Machado Saldiba de Lima pelo constante incentivo desde o início. Obrigada pela ajuda com as planilhas de Excell, com a confecção de índices,

efluxos... E obrigada principalmente pelo apoio, amizade e carinho. Estamos sentindo sua falta.

À Camila de Holanda Sartori, pela grande ajuda no tratamento dos dados dos pacientes diabéticos, e também pelo carinho, pela companhia e pela admiração.

Ao Dr. Rodrigo Tallada Iborra, pela companhia, pelo apoio, pelo incentivo e pela paciência quando estamos às vésperas de qualificações/defesas. Pela calma, otimismo e disponibilidade em nos ajudar sempre que necessário. Agradeço também por toda a ajuda técnica em limitações experimentais aparentemente impossíveis, e também por alcançar todos os reagentes e livros que ficam acima de dois metros de altura.

À Dra. Camila Canteiro por todo apoio e carinho, especialmente na reta final da confecção da tese. Agradeço por sua serenidade em aconselhar aos demais alunos e pelo constante incentivo. Obrigada pela paciência e pela amizade, e também por ser uma excelente endocrinologista, auxiliando diversos membros da minha família. Obrigada.

À Roberta Marcondes Machado pelas inúmeras discussões de experimentos e possíveis experimentos que enriqueceram o processo acadêmico. Agradeço também pelos diversos papos extra-acadêmicos e pelo apoio sempre presente.

À Fabiana Ferreira pela ajuda de sempre em diversos experimentos, especialmente nos infinitos, que podem durar semanas. Obrigada pela paciência, pela amizade e pelos papos pessoais sempre enriquecedores. Levo comigo a amizade e companheirismo da família Moreno-Ferreira, sem os excessos futebolísticos, claro.

À Jussara Rocha pela ajuda inicial e constante no preparo de reagentes e soluções, e também pela companhia, carinho e amizade.

À Claudia Souza, primeiramente pela paciência e disponibilidade, imprescindíveis para lidar com alunas ansiosas. Obrigada pela ajuda de sempre com questões que envolvem a burocracia acadêmica, e agradeço também pelos papos matinais sempre muito descontraídos (mas nada acadêmicos!) que nos dão energia para começar o dia.

À Senária Egutti pela ajuda com as normas e regras da pós-graduação e por estar sempre nos auxiliando para evitar possíveis imprevistos. Obrigada pela ajuda, pelo carinho, pelo apoio e pela companhia.

À Rosibel, por manter a ordem no Laboratório de Lípidos, cuidando como ninguém de todos nossos equipamentos, materiais e reagentes. Não posso deixar de agradecer pelo delicioso café matinal que nos dá energia para iniciar o dia. Obrigada, Bel!

À Cida, secretária do nosso programa de pós-graduação. Agradeço por todo empenho em ajudar os pós-graduandos desesperados com prazos e normas da CPG. Obrigada!

À “nova leva” de alunos do laboratório: à Renata Bombo pela amizade, pelos conselhos, pelo apoio e incentivo constantes; à Juliana Tironi pela companhia, carinho e risadas durante muitos dias de longos experimentos; à Paula Ramos, pela amizade, pelo apoio nas horas difíceis e pelo carinho; ao Diego Gomes por sua irreverência e alegria, que nos faz dançar no laboratório às sete e meia da manhã; à Tatiana Venâncio pela companhia, pelas broncas (sempre fundamentadas), pelo carinho e por ser tão autêntica; à Fernanda Fusco, pela paciência, companhia e carinho; a Milessa Afonso, pelo bom-humor, pela paciência e alegria de todos os dias; à Maria Silvia Ferrari Lavrador pelo carinho, apoio e incentivo. Sem vocês não seria tão divertido ir todos os dias ao laboratório fazer pesquisa. Agradeço a cada um de coração, apenas por estarem lá e por terem feito parte da minha trajetória. Espero que depois de tantos anos vocês não tenham mais medo de mim...

A todos os colegas do Laboratório de Lípidos que, de alguma forma, fizeram parte da minha trajetória, me ajudando de uma forma ou de outra: Fabiana Góes, Maria Olívia Carvalho, Joilsa Monteiro, Márcia Dias, Karina Oliveira, Mila Alvarenga, Simone Batista, Angela Ilha, Klara Rahmann, Patrícia Rios, Alessandra Carreiro, Karoline Santana, Dra. Mônica Neves e Dr. Isio Schulz.

Ao Prof. Dr. Francisco Laurindo, pela pronta disponibilidade em discutir metodologias científicas, pelo apoio nas discussões do Projeto desde o início e por abrir as portas do Laboratório de Biologia Vascular aos alunos do LIM-10.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi e Dr. Bruno Paim, pela ajuda com os ensaios de citometria de fluxo e pela pronta disponibilidade em sanar nossas dúvidas metodológicas.

Às minhas amigas Gabriela Dias, Cristina Bressan, Luisa Nogara, Livia Garcia Leal e Carolina Garcia Leal, que sempre apostaram no meu potencial, e foram estusiasistas do meu projeto de doutorado desde o início.

Aos meus cunhados, Luciane, Rodrigo, Oswaldo e Soraia, e à minha sogra, Arlete, por sempre acreditarem em mim, e por me acolherem em sua família por tanto tempo e com tanto carinho.

Aos meus avós, Elie Daniel Nassi (i.m.) e Jandira Del Nero Nassi (i.m.) e Celeste dos Santos Castilho (i.m.), por acreditarem no potencial de uma menina de 16 anos que achava que ia mudar o mundo. Se soubessem que hoje haveria a possibilidade de terem uma neta Doutora ficariam verdadeiramente orgulhosos.

Aos meus tios Paulo, Marina, Paulette, Sérgio, Wisner, Maria Eugênia e Litton, por serem entusiasistas da pesquisa e por sempre apostarem no meu potencial, acreditando, ingênuamente, que eu seria capaz de efetuar grandes mudanças na Ciência no Brasil. Obrigada pela confiança e apoio.

À minha irmã, Fernanda, que sempre me apoiou incondicionalmente, sendo minha confidente, meu ombro auxiliar quando as coisas ficavam muito pesadas para eu carregar sozinha. Fê, agradeço por todo suporte e paciência nestes anos e em todos os outros que divimos em nossas vidas, sem você, tudo seria mais difícil.

Aos meus pais, Miguel e Lucia, por serem a base que sustenta a meu caminho. Sei que neste ponto as palavras apoio, incentivo, companheirismo parecem um tanto repetitivas e podem perder seu valor, mas é neste momento que elas reacendem seu propósito. Mãe e Pai, agradeço por toda a confiança depositada em mim nestes anos, agradeço por me levantarem em momentos de queda, de insegurança, e por celebrarem comigo conquistas adquiridas ao longo do caminho da pós-graduação. Sem o apoio e incentivo de vocês, tudo fica mais difícil. Vocês são os meus maiores modelos de vida, e aqui não caberiam palavras para expressar minha gratidão.

Ao meu noivo, Reinaldo, por ser, sem dúvida nenhuma, o meu maior fã. Obrigada por apostar em mim, confiar no meu potencial e sempre me fazer olhar para frente, onde está o nosso futuro. Agradeço pelo amor incondicional, pela paciência, pela compreensão, pela admiração, pelo incentivo e pelo bom-humor, que movem nossa relação. Agradeço pelos quase oito anos de alegria, amor e cumplicidade ao seu lado.

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

“Não seja escravo do seu passado - mergulhe em mares grandiosos, vá bem fundo e nade até bem longe; e voltarás com respeito por si mesmo, com novo vigor, com uma experiência a mais, que explicará e superará a anterior”

Ralph Waldo Emerson

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Homeostase de lípidos intracelulares e transporte reverso do colesterol.....	1
1.2 Transportadores ABCA-1 - função e regulação	6
1.3 Diabetes melito, produtos de glicação avançada e aterosclerose	11
1.4 Estresse do retículo endoplasmático	17
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MÉTODOS.....	29
3.1 Glicação da albumina <i>in vitro</i>	29
3.2 Isolamento e purificação da albumina sérica de indivíduos controles e de pacientes portadores de DM 1 e 2.....	30
3.3 Obtenção e cultivo dos macrófagos de peritônio de camundongos e macrófagos da linhagem J774.....	32
3.4 Quantificação do mRNA de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina- AGE.....	33
3.5 Determinação da expressão de marcadores da UPR, marcador de degradação proteasomal e de chaperonas - eIF2 α , ATF6, CHOP, ubiquitina, Grp78, Grp94, PDI e calreticulina - por Western Blot	34
3.6 Determinação da viabilidade celular pela liberação de lactato desidrogenase	35
3.7 Determinação, por imunocitoquímica, da expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência de inibidores do sistema proteasomal, e do estresse do RE.....	36
3.8 Determinação, por citometria de fluxo, da expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência de inibidor do sistema proteasomal e do estresse do RE.	38
3.9 Determinação do efluxo de ¹⁴ C-colesterol em macrófagos tratados com albumina-controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência do inibidor estresse do RE.....	39
3.10 Análise estatística	41
4. RESULTADOS.....	42

5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÃO	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

ACAT: acil colesterol aciltransferase

AGE: produtos de glicação avançada

Alb-AGE: albumina modificada por AGE

Alb-C: albumina não modificada

Alb-DM1: albumina isolada do soro de portadores de DM 1

Alb-DM2: albumina isolada do soro de portadores de DM 2

Alb-nãoDM: albumina isolada do soro de indivíduos saudáveis

Apo A-I: apolipoproteína A-I

Apo B: apolipoproteína B

Apo C: apolipoproteína C

Apo E: apolipoproteína E

ATF4: fator de transcrição ativador 4

ATF6: fator de transcrição ativador 6

B-E: receptores de lipoproteínas de baixa densidade

CETP: proteína de transferência de colesterol éster

CHOP: *C/EBP homologous protein*

CHOP/GADD153: *C/EBP homologous protein/growth arrest-and DNA damage-inducible gene GADD153*

CML: carboximetil-lisina

CEHN: colesterol éster hidrolase neutra

DAB: diaminobenzidina

DM 1: diabetes melito tipo 1

DM 2: diabetes melito tipo 2

eIF2 α : fator de iniciação eucariótico 2, subunidade α

ERAD: degradação associada ao RE

EROs: espécies reativas do oxigênio

Ero1: *endoplasmic reticulum oxireductase 1*

FAFA: albumina isenta de ácidos graxos

FDA: *Food and Drug Administration*

FPLC: cromatografia líquida para separação rápida de proteínas

GAD: glicolaldeído

Grp78: proteína regulada pela glicose de 78 KDa

Grp94: proteína regulada pela glicose de 94 KDa

HbA_{1c}: hemoglobina glicada

HDL: lipoproteínas de alta densidade

Hsp70: proteína de choque térmico 70

Hsp90: proteína de choque térmico 90

I κ K β : inibidor do fator nuclear *kappa B kinase* subunidade beta

HMG CoA redutase: hidroximetilglutaril coenzima A redutase

IDOL: *Inducible degrader of LDL receptor*

IL: interleucina

IMC: índice de massa corporal

INSIG: gene induzido pela insulina

IRE1: inositol requiring protein 1

JAK: Janus cinase

JNK: *JUN N-terminal kinase*

KDEL: sequência de aminoácidos; *lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina*

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDH: lactato desidrogenase

LDL: lipoproteínas de densidade baixa

LRP: proteína relacionada ao receptor de LDL

LXR: receptor X hepático (*liver X receptor*)

MGO: metilglioxal

mRNA: RNA mensageiro

NADPH oxidase: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NF- κ B: fator nuclear kappa B

PBA: ácido fenil butírico

PBS: tampão fosfato

PCSK9: pró-proteína convertase tipo subtilisina/kexina tipo 9

PDI: proteína dissulfeto isomerase

PERK: *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*

PEST: sequência de aminoácidos; *prolina, ácido glutâmico, serina e treonina*

QM: quilomícron

RAGE: receptor para produtos de glicação avançada

RE: retículo endoplasmático

Receptor B/E: receptores de LDL

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

RXR: receptor X retinóico (*retinoid X receptor*)

S1P: *site-1 protease*

S2P: *site-2 protease*

SCAP: proteína ativadora da clivagem de *SREBP*

SOAT: *stearoil O-acyltransferase*

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

SREBP: *sterol-regulatory element-binding protein*

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

TG: triglicérides

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

TRAF2: *TNF α receptor-associated factor 2*

TRC: transporte reverso de colesterol

TUDCA: ácido tauroursodeoxicólico

UPR: resposta a proteínas não-enoveladas

UPS: sistema ubiquitina-proteasoma

XBP-1: *X-box DNA-binding protein*

VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa

RESUMO

Castilho G. ***Inibição do estresse do retículo endoplasmático restaura o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol em macrófagos tratados com albumina modificada por glicação avançada*** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 96p.

Produtos de glicação avançada (AGE) prejudicam o metabolismo de lipoproteínas e o transporte reverso de colesterol, o que contribui para a aterosclerose no diabetes melito (DM). Em particular, a albumina modificada por AGE (albumina-AGE) reduz a remoção de colesterol por diminuir o conteúdo do receptor ABCA-1 em macrófagos. Isto se vincula ao insulto oxidativo e inflamatório, os quais são indutores do estresse do retículo endoplasmático (RE). O objetivo do presente estudo foi avaliar, em macrófagos, os efeitos do tratamento com albumina-AGE sobre o estresse do RE e suas vias adaptativas (UPR), relacionando-os com o prejuízo na expressão do ABCA-1 e efluxo de colesterol celular. Albumina-AGE foi produzida pela incubação de albumina isenta em ácidos graxos com glicolaldeído 10 mM e, albumina controle (albumina-C) com PBS apenas. Albumina foi isolada do soro de pacientes portadores de DM com controle glicêmico inadequado (albumina-DM) ou indivíduos controles (albumina não-DM) por cromatografia para separação rápida de proteínas seguida por purificação alcoólica. Macrófagos de peritônio de camundongos ou macrófagos da linhagem J774 foram tratados com os diferentes tipos de albumina na presença ou ausência de ácido fenil butírico (PBA; chaperona química que alivia o estresse do RE) ou MG-132 (inibidor do sistema proteasomal) por diferentes intervalos de tempo. A expressão de marcadores do estresse do RE, UPR, proteína dissulfeto isomerase (PDI), calreticulina e ubiquitina foi determinada por imunoblot e o conteúdo de ABCA-1, por citometria de fluxo e imunocitoquímica. O efluxo de ^{14}C -

colesterol foi avaliado, utilizando-se apoA-I como aceptora de colesterol. A albumina-AGE induziu aumento tempo-dependente na expressão das chaperonas marcadoras do estresse do RE - Gr78 e Grp94 - e de proteínas da UPR (ATF6 e eIF2 α -P) em comparação à albumina-C. O conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol foram reduzidos em, respectivamente, 33% e 47% e ambos foram restaurados pelo tratamento com PBA, o qual também reduziu o estresse do RE. A associação entre estresse de RE e redução de ABCA-1 foi confirmada pelo uso da tunicamicina (indutor clássico de estresse do RE), que diminuiu em 61% o conteúdo de ABCA-1, prejudicando em 82% o efluxo de colesterol. A albumina-AGE aumentou o conteúdo total de ubiquitina. A inibição do sistema proteasomal não foi capaz de restaurar o conteúdo de ABCA-1 em células tratadas com albumina-AGE. Em macrófagos expostos à albumina-DM evidenciou-se maior expressão da PDI e calreticulina, com tendência à maior expressão da Grp94. A albumina-AGE (produzida *in vitro* ou isolada de portadores de DM) induz estresse de RE, o qual se vincula à redução no conteúdo de ABCA-1 e efluxo de colesterol. Estes eventos podem contribuir para a aterosclerose no DM. Chaperonas químicas, que aliviam o estresse do RE, podem ser ferramentas úteis na prevenção e tratamento da aterosclerose.

Descritores: 1. produtos finais de glicação 2. estresse do retículo endoplasmático 3. transportadores de cassete de ligação de ATP (transportadores ABC) 4. diabetes mellitus 5. albumina sérica, colesterol.

SUMMARY

Castilho G. ***Inhibition of endoplasmic reticulum stress restores the ABCA-1 protein level and cholesterol efflux in advanced glycated albumin-treated macrophages*** [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012. 96p.

Advanced glycation end products (AGE) disturb lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport, contributing to atherosclerosis in diabetes mellitus (DM). Particularly, advanced glycated albumin (AGE-albumin) reduces cell cholesterol removal by impairing the expression of ABCA-1 in macrophages. This is ascribed to the oxidative and inflammatory stress, conditions that elicit endoplasmic reticulum (ER) stress. In this study it was investigated the effect of AGE-albumin on ER stress and adaptative pathways (UPR) development in macrophages, and its relationship to the reduction in ABCA-1 expression and cholesterol efflux. AGE-albumin was prepared by incubating fatty acid free albumin with 10 mM glycolaldehyde and control albumin (C-albumin) with PBS only. Albumin was isolated from poorly controlled DM patients (DM-albumin) and control individuals (nonDM-albumin) by fast liquid chromatography and purified by alcoholic extraction. Mouse peritoneal macrophages or J774 cells were treated along time with the different types of albumin in the absence or presence of phenyl butiric acid (PBA; a chaperone that alleviates ER stress) or MG132 (a proteasomal inhibitor). The expression of ER stress and UPR markers, protein disulfide isomerase (PDI), calreticulin and ubiquitin was determined by immunoblot and ABCA-1 protein level, by flow cytometry and immunocytochemistry. ¹⁴C-cholesterol efflux was evaluated utilizing apo A-I as cholesterol acceptor. AGE-albumin induced a time-dependent increase in the expression of ER stress chaperone markers - Gr78 and Grp94 - and UPR proteins (ATF6 and eIF2 α -P) in comparison to C-albumin. ABCA-1 content and cholesterol efflux

were diminished by, respectively, 33% and 47% and both were recovered by the treatment with PBA. The association between ER stress and ABCA-1 reduction was confirmed by the reduction, induced by tunicamycin (a classical ER stress inducer) in ABCA-1 protein level (61%) and cholesterol efflux (82%). AGE-albumin increased the amount of cellular total ubiquitin. The inhibition of proteasomal system was unable to restore ABCA-1 protein level in cells treated with AGE-albumin. In macrophages exposed to DM-albumin a higher expression of PDI and calreticulin was observed together with a trend of enhanced Grp94 expression. In conclusion, AGE-albumin (produced *in vitro* or isolated from DM patients) induces ER stress which is related to the reduction in ABCA-1 level and cholesterol efflux in macrophages. These events can contribute to atherosclerosis in DM. Chemical chaperones that alleviate ER stress may be useful in the prevention and treatment of atherosclerosis.

Descriptors: 1. advanced glycation end products 2. endoplasmic reticulum stress 3. ABC transporters 4. diabetes mellitus 5. serum albumin, cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Homeostase de lípides intracelulares e transporte reverso do colesterol

O conteúdo de colesterol intracelular é mantido em uma faixa estreita de variação graças à regulação da síntese, captação e exportação de esteróis. A síntese de colesterol é determinada, principalmente, pela atividade da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA redutase) que converte hidroximetil glutaril CoA em ácido mevalônico. Ao final da via biossintética é formado colesterol livre ou não esterificado, o qual, pela atividade da acilcolesterol aciltransferase (ACAT ou SOAT; *stearyl O-acyltransferase*), é convertido em colesterol esterificado. Isto permite a cristalização da molécula do colesterol e seu armazenamento no citosol em forma relativamente inerte, desde que em pequenas quantidades. A biodisponibilização do colesterol esterificado ocorre pela ação da colesterol éster hidrolase neutra (CEHN) que provê colesterol livre às células, caso necessário (Sekiya et al., 2011).

Além da síntese, as células obtêm colesterol por meio da captação de lipoproteínas - principalmente as lipoproteínas de densidade baixa (LDL) - por meio dos receptores de LDL ou receptores B-E. Isto ocorre pelo reconhecimento das apolipoproteínas B e E das lipoproteínas o que promove a internalização do complexo lipoproteína/receptor no endossomo, seguindo-se degradação lisossomal (Ikonen, 2008).

Tanto a síntese como a captação de colesterol são reguladas pela concentração de colesterol livre intracelular e, mais especificamente, por óxidos de colesterol. A ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroides (SREBP) ocorre em situações de depleção do conteúdo de colesterol e se caracteriza por sua migração do retículo endoplasmático, em associação à proteína ativadora de clivagem da SREBP (SCAP) ao complexo secretório celular. Neste local, a SREBP sofre duas clivagens proteolíticas o que libera seu fragmento aminoterminal que migra ao núcleo, onde modula positivamente a transcrição do gene do receptor B-E e da HMGCoA redutase, promovendo o aporte de colesterol à célula (Goldstein & Brown, 2009). Por outro lado, caso as células estejam enriquecidas em colesterol, este mecanismo é eficientemente bloqueado, graças à ligação de esteróis à SCAP e à proteína INSIG (gene induzido pela insulina) o que mantém o complexo SCAP/SREBP firmemente ancorado à membrana do retículo endoplasmático, contendo a síntese e captação de colesterol (Brown & Goldstein, 2009; Sun et al., 2007). A ativação de SREBP também promove a expressão da pró-proteína convertase tipo subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), que medeia a degradação do receptor B-E, modulando, portanto, a recaptação de lipoproteínas pelo fígado e o enriquecimento celular em colesterol advindo das lipoproteínas.

A exportação do excesso de colesterol contribui como mecanismo adicional ao ajuste de sua concentração intracelular e varia de acordo com o tipo celular. Sendo assim, em hepatócitos a maior parte do colesterol é convertida em ácidos biliares ou exportada na forma livre na bile, ou ainda,

ressecretada na forma de lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Nas gônadas e adrenal, o colesterol pode ser convertido em hormônios esteroídicos e na pele, convertido em precursor de vitamina D. No entanto, a principal via de exportação de colesterol ocorre por intermédio das lipoproteínas de alta densidade (HDL), as quais removem o excesso de colesterol celular. Isto ocorre graças à indução da expressão de receptores de HDL, em condições de acúmulo intracelular de colesterol e óxidos de colesterol, que será detalhado abaixo.

Em macrófagos, células intimamente envolvidas na gênese da aterosclerose, a captação de LDL nativa é mínima, devido à pequena expressão dos receptores B-E. Não obstante, a remoção de LDL modificadas, por oxidação, glicação, carbamilação, dessialização, associação a imunocomplexos, entre outras, ocorre por sua interação com receptores *scavenger*, em processo positivamente modulado pela concentração intracelular de lípidos (Han et al., 1997). Em geral, quanto maior a remoção de lipoproteínas modificadas, maior a expressão dos receptores que as reconhecem, criando-se um ciclo vicioso que culmina na formação de células espumosas, característica da lesão aterosclerótica precoce (Yancey et al., 2007). Neste aspecto, a exportação do excesso de colesterol para as HDL é o principal mecanismo de regulação do conteúdo de lípidos em macrófagos arteriais, desempenhando papel central na prevenção contra a gênese e progressão da doença macrovascular aterosclerótica (Tiwari et al., 2007).

As HDL são inversamente associadas ao desenvolvimento da doença arterial coronariana, graças à sua participação no transporte reverso de colesterol (TRC) e às suas ações antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptótica, vasodilatadora, antitrombogênica, antiproteolítica, hematopoiética e pela melhora do metabolismo glicídico. Estas funções são seletivamente desempenhadas pelas diferentes subpopulações de HDL (Asztalos et al., 2011).

Ao longo do transporte reverso de colesterol (TRC), o colesterol é removido das células periféricas pelas HDL e apolipoproteínas A-I (apo A-I) dissociadas sendo encaminhado ao fígado para eliminação na bile e excreção fecal, ou aos órgãos esteroideogênicos (Rosenson et al., 2012).

Apolipoproteínas A-I pobres em lípidos interagem com os receptores ABCA-1 (*ATP binding cassette transporter A1*) na superfície dos macrófagos, promovendo fluxo unidirecional de colesterol ao meio extracelular. Isto ocorre graças à hidrólise de duas moléculas de ATP ligadas ao ABCA-1, o que propela colesterol do folheto interno ao externo da membrana plasmática e, daí, para as apo A-I. A atividade intrínseca do ABCA-1 favorece a redistribuição de colesterol na membrana plasmática, mas apenas sua ligação específica à apo A-I é capaz de translocar fosfolípidos e colesterol ao meio extracelular, permitindo seu fluxo ao longo do TRC.

Após se enriquecerem em lípidos, as apo A-I formam partículas nascentes de HDL, denominadas pré-beta HDL. Graças à esterificação do

colesterol pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), estas partículas discoidais convertem-se em formas maiores de HDL, como as HDL₃ e HDL₂ que abrigam colesterol esterificado em seu núcleo hidrofóbico. Grandes partículas de HDL também removem colesterol celular, por meio da interação com os receptores ABCG-1 (*ATP binding cassette transporter G1*). Além de colesterol, o ABCG-1 exporta óxidos de colesterol, em particular 7-cetocolesterol, minimizando seus efeitos citotóxicos.

No fígado, o colesterol pode ser diretamente removido das HDL, por meio de sua interação com os receptores SR-BI (*scavenger receptor class B type I*). O SR-BI remove seletivamente o colesterol esterificado das HDL, em detrimento de seus componentes proteicos, os quais retornam ao interstício, reiniciando a retirada de colesterol celular. Além disso, por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), o colesterol esterificado é transferido para lipoproteínas que contêm apo B, como quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e LDL, sendo estas removidas pelos receptores B-E e pela proteína relacionada ao receptor de LDL no fígado (LRP; *LDL receptor - related protein*) (Ohashi et al., 2005) (**figura 1**).

Alterações em diversas etapas do TRC podem comprometer o fluxo centrípeto de colesterol ao fígado, predispondo à aterosclerose precoce.

Figura 1. Transporte Reverso de Colesterol - Apo A-I e partículas nascentes de HDL (pré-β-HDL) removem o excesso de colesterol celular por meio da interação com o receptor ABCA-1. Após esterificação do colesterol pela LCAT, formam-se gradativamente partículas maiores de HDL - HDL₃ e HDL₂. O colesterol esterificado (CE) pode ser diretamente removido das HDL pelo receptor SR-BI no fígado ou órgãos esteroidogênicos, podendo ser convertido em ácidos biliares ou hormônios esteroídicos. Por intermédio da CETP, o CE é transferido para QM, VLDL e LDL, as quais podem ser removidas pelos receptores B-E ou LRP no fígado.

1.2 Transportadores ABCA-1 - função e regulação

Os receptores ABCA-1 são membros da superfamília dos transportadores ABC (*ATP binding cassette transporters*), caracterizados por utilizarem a hidrólise do ATP como fonte de energia para o transporte de diversas moléculas através de membranas. Seu gene consiste em 50 exons

que abrangem 149 kb, codificando uma proteína de 2.261 aminoácidos e aproximadamente 220 KDa (Nagao et al., 2012).

A estrutura tridimensional do ABCA-1 é caracterizada pela presença de dois domínios transmembrânicos contendo seis hélices cada, além de um sítio de ligação a nucleotídeos contendo duas sequências peptídicas altamente conservadas evolutivamente, denominadas *Walker A* e *Walker B*. Além disso, o receptor dispõe ainda de duas alças extracelulares, unidas por pontes dissulfeto, cuja importância, além da manutenção da configuração do peptídeo, envolve a afinidade do transportador às moléculas de apo A-I (Soumian et al., 2005).

A expressão gênica de ABCA-1, aumentada substancialmente em células expostas à sobrecarga de colesterol, resulta da ativação dos LXR (*liver X receptor*), fatores de transcrição pertencentes a uma família de receptores nucleares intimamente envolvidos no metabolismo lipídico. Sua ligação a óxidos de colesterol, derivados da modificação oxidativa do colesterol, favorece a dimerização com RXR (*retinoid X receptors*) e o desacoplamento de correpressores, o que resulta na transativação de ABCA-1 e ABCG-1. Agonistas de LXR, como 22-hidroxicolesterol e 24,25-hidroxicolesterol também promovem a transativação do gene do ABCA-1. Além disso, AMP cíclico também eleva a expressão de ABCA-1, por mecanismos distintos da via do LXR, mas ainda não elucidados (Oram & Vaughan, 2006).

Wellington et al. (2002) demonstraram uma discordância significativa entre o perfil de expressão do mRNA e do conteúdo proteico final de ABCA-

1 em tecidos de camundongos. Isto tem sido reiterado em estudos experimentais (Passarelli et al., 2005; Isoda et al., 2007) e decorre da modulação pós-transcricional e traducional da proteína.

Estudos de imunofluorescência demonstraram que embora a maior massa de ABCA-1 localize-se na membrana plasmática, observa-se também um intenso intercâmbio vesicular com um *pool* de ABCA-1 presente em compartimentos intracelulares endocíticos. A meia-vida do receptor parece ser curta e depende da reciclagem da proteína dos endossomos primários à membrana plasmática. A interação com apo A-I, embora não previna a internalização do receptor no endossomo, previne sua degradação (Arakawa & yokoyama, 2002; Martinez et al., 2003; Zhao et al., 2012).

Em 1996, Rechsteiner & Rogers descreveram uma sequência de aminoácidos (PEST - prolina, glutamato, serina e treonina) responsável pela regulação da degradação do ABCA-1. Quando fosforilada, a PEST permite a proteólise do receptor por ação da calpaína, uma tiol-protease de membrana (Wang et al., 2003). De fato, Arakawa & Yokoyama (2002) demonstraram que o *turnover* do ABCA-1 é reduzido sob a ação de inibidores de tiol-proteases, como a calpeptina (inibidor da calpaína). Resultados do mesmo grupo evidenciaram que, embora o probucol reduza a atividade do ABCA-1, seus produtos oxidados - espiroquinona e difenoquinona - diminuem a degradação deste receptor mediada pela calpaína, sem alterar a transcrição do gene e a funcionalidade da proteína em exportar colesterol para as apo A-I. É importante notar que este efeito aumentou a biossíntese de HDL e

reduziu a deposição de lípides na aorta de coelhos, sem alterações nas defesas antioxidantes plasmáticas (Arakawa et al., 2009).

A apo A-I, além de seu papel na retirada do colesterol celular, exerce importante função na estabilidade do ABCA-1, já que inibe a fosforilação da PEST pela interação física com o ABCA-1, impedindo a ação da calpaína (Martinez et al., 2003). Lu et al. (2008) demonstraram, em macrófagos, derivados de monócitos humanos, que na ausência da apo A-I o ABCA-1 reside na membrana plasmática por 10 minutos, sendo internalizado por endocitose e degradado intracelularmente. Na presença da apo A-I, o ABCA-1 não é internalizado e se mantém mais tempo na membrana dos macrófagos, o que favorece a geração de partículas de HDL.

Hozoji et al., (2008) demonstraram a existência de um *pool* de ABCA-1 rapidamente acessível à membrana, o qual se mantém associado ao LXR β nas proximidades da superfície celular. O enriquecimento em óxidos de colesterol favorece a dissociação do complexo ABCA-1/LXR, disponibilizando ABCA-1 para a exportação rápida de colesterol, e LXR para modulação da expressão proteica.

Ademais, a regulação do ABCA-1 por outros processos biológicos, como degradação lisossomal e autofagia é, de fato, efetiva e acrescenta mais etapas à fina regulação do conteúdo final de ABCA-1 disponível na membrana das células (Beers et al., 2011; Boadu et al., 2011).

Os mecanismos moleculares responsáveis pela interação entre apo A-I e ABCA-1 não estão totalmente elucidados, uma vez que o ABCA-1

apresenta especificidade com diversas apolipoproteínas associadas à HDL, tais como apo A-I, A-II, C-I, C-II e C-III. Fitzgerald et al. (2004) propuseram uma forte ligação proteína/proteína entre apo A-I e ABCA-1, o que ocorre sob alta afinidade ($K_d < 10^{-7}$ mol/L), em processo reversível e termossensível. Contudo, outros pesquisadores (Ito et al., 2000) defendem a idéia de que moléculas de apo A-I ancoram-se a resíduos de fosfatidilserina, dispostos no folheto externo da membrana pela ação *flipase* do ABCA-1, promovendo a redistribuição de moléculas lipídicas nas camadas da membrana plasmática. No entanto, os exatos mecanismos e estruturas que participam da remoção do colesterol celular via ABCA-1 ainda não estão completamente descritos e são tema de intensa discussão na literatura (Chambenoit et al., 2001).

As vias de sinalização suscitadas pela interação entre apo A-I e ABCA-1 parecem variar de acordo com o tipo celular, embora todas converjam para a estabilização do ABCA-1 na superfície das células e para mobilização de colesterol para aceptores externos. Dentre os principais componentes das vias intracelulares destacam-se: janus cinase 2/STAT1 (JAK/STAT1), proteína cinase A, Rho GTPase, além de vias mediadas por cálcio (Tang et al. 2006; Tang & Oram, 2009; Zhao et al., 2012). A ativação do sistema JAK/STAT1 parece também implicar na diminuição da transcrição de genes inflamatórios, estabelecendo um elo entre a remoção de colesterol de macrófagos arteriais e a redução do insulto oxidativo, ambos modulados pela atividade do ABCA-1.

O papel do ABCA-1 é especialmente importante no TRC de macrófagos, e, mutações em seu gene associam-se à aterosclerose

prematura, como na doença de Tangier e na Deficiência Familiar de HDL (Oram, 2002; Bissoendial et al., 2003; Singaraja et al., 2006). Embora, em macrófagos, pouco contribua para o *pool* de HDL plasmática, devido à pequena massa de colesterol destas células, no fígado e intestino este receptor participa da formação de novas partículas de HDL, contribuindo com a concentração plasmática desta lipoproteína.

1.3 Diabetes melito, produtos de glicação avançada e aterosclerose

No diabetes melito (DM), a hiperglicemia crônica ou picos de glicemia no período pós-prandial promovem a modificação não-enzimática de diversas macromoléculas, o que pode culminar na geração de produtos de glicação avançada (AGE) (Ahmed & Thornalley, 2007). A concentração sérica de AGE é independentemente associada ao desenvolvimento de doença macrovascular aterosclerótica (Ahmed et al., 2009) e, juntamente, com outras vias convergentes do metabolismo da glicose – via das hexosaminas, ativação de proteína cinase C e via do poliol – favorece o aumento do estresse oxidativo celular. Este é apontado como elo comum na gênese das complicações tardias do DM, como nefropatia, retinopatia, neuropatia e aterosclerose (Baynes & Thorpe, 2000; Brownlee, 2001).

Os AGE são formados por meio da reação de glicação não enzimática, de escurecimento ou Maillard. Ela se inicia com a formação de uma base de Schiff instável, gerada a partir da reação de grupos carbonila de açúcares redutores com resíduos de lisina e arginina de porções amino-

terminais de proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos (**figura 2**). A base de Schiff pode progredir para um produto Amadori, que, sendo mais estável, sofre pouca dissociação.

A autooxidação da glicose, a decomposição da base de Schiff e rearranjos moleculares do produto Amadori levam à formação dos açúcares dicarbonila, como glicoxal, metilglicoxal, 3-deoxiglicosona e de glicolaldeído, extremamente reativos, que propagam a reação de glicação em sentido irreversível, com formação dos AGE (Baynes & Thorpe, 2000).

Figura 2. Reação de glicação, escurecimento ou Maillard. Resíduos aminoterminais de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolípidos são modificados por açúcares redutores de forma não-enzimática. O primeiro composto formado, a Base de Schiff é bastante instável, sofrendo fácil dissociação. No

entanto, caso a reação prossiga, são formados produtos mais estáveis, denominados Produto Amadori. A decomposição da Base de Schiff e rearranjos do Produto Amadori levam à formação de oxoaldeídos, tais como glioxal, 3-deoxiglicosona, metilglioxal e glicolaldeído que propagam a reação de glicação de forma rápida e irreversível com a formação dos produtos de glicação avançada (AGE).

A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, certos aminoácidos e corpos cetônicos, bem como a reação mediada pela mieloperoxidase em neutrófilos ativados, também promovem a formação de oxoaldeídos, com propagação do estresse glicoxidativo (Mentink et al., 2006). Além disso, o tabaco e a dieta constituem fontes exógenas de AGE, que podem ser absorvidos no trato gastrointestinal e transportados pela albumina e por partículas de LDL (Lu et al., 2004). É importante ressaltar que as concentrações de AGE encontram-se aumentadas não só na hiperglicemia, mas também em outras situações como a insuficiência renal crônica, doenças inflamatórias e autoimunes, estas últimas representando um importante elo entre inflamação e aterosclerose (Ramasamy et al., 2005, Uribarri et al., 2003).

Os principais AGE encontrados *in vivo* são: carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina, pentosidina, pirralina e dímeros de glioxal e metilglioxal. Os AGE circulantes são reconhecidos por uma vasta gama de receptores de superfície celular, destacando-se os receptores para AGE (RAGE). A sinalização decorrente da interação AGE-RAGE promove a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), com ativação do fator nuclear kappa

B (NF- κ B). Disto resulta o aumento de expressão de marcadores inflamatórios e moléculas de adesão, que agravam o dano vascular do DM. A expressão de RAGE encontra-se aumentada no DM e na uremia, e a atenuação de sua via de sinalização reduz o desenvolvimento de lesão aterosclerótica (Yan et al., 2009; Ramasamy et al., 2011).

Em camundongos diabéticos *knock out* para apo E, o bloqueio do RAGE, promovido pela administração da forma solúvel do receptor (sRAGE) retardou a aterosclerose e diminuiu o insulto inflamatório vascular. Interessante notar que estes efeitos foram obtidos independentemente de alterações na glicemia e no perfil lipídico, mas foram associados à redução nas concentrações plasmáticas e teciduais de AGE. (Park et al., 1998; Wendt et al., 2006; Harja et al., 2008.)

Alterações no metabolismo de lípidos plasmáticos e celulares são observadas no DM, frente à modificação de macromoléculas por glicação. A modificação de LDL por açúcares redutores reduz seu reconhecimento por receptores B-E e favorece sua captação por macrófagos da parede arterial (Brown et al., 2007). De fato, macrófagos derivados de monócitos apresentam acúmulo de colesterol esterificado frente à incubação com VLDL e LDL isoladas de portadores de DM ou glicadas *in vitro* (Klein et al., 1995).

Lipoproteínas ricas em triglicérides (VLDL e quilomícrons) glicadas são menos sensíveis à ação da lipoproteína lipase e menos reconhecidas pelos receptores B-E, o que favorece o aumento da meia-vida plasmática destas partículas. Isto contribui para a hipertrigliceridemia, importante

componente da dislipidemia diabética. A atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado é facilitada pelo aumento da concentração sérica de triglicérides e pela glicação das lipoproteínas (Passarelli et al., 1997; Zimmerman et al., 2001). Em decorrência, há um aumento na transferência de colesterol esterificado das HDL para lipoproteínas potencialmente aterogênicas, como as VLDL e LDL glicadas, as quais podem ser captadas por macrófagos arteriais.

As HDL glicadas apresentam menor tempo de residência na circulação, graças ao deslocamento das apo A-I modificadas de sua estrutura. Embora a habilidade das HDL na remoção do colesterol celular não seja diretamente prejudicada pela glicação precoce (Passarelli et al., 2000; Rashiduni et al., 1999), a menor concentração plasmática e intersticial desta lipoproteína limita a remoção do colesterol arterial. Por outro lado, estudos mais recentes demonstram que a glicação avançada da HDL ou da apo A-I reduz a remoção de colesterol celular, intermediada pelo receptor ABCA-1 (Hoang et al., 2007, Matsuki et al., 2009).

A albumina é a principal proteína modificada por glicação na circulação sanguínea representando cerca de 80% das proteínas que sofrem glicação no plasma (Cohen, 2003) e, embora sua meia-vida plasmática seja reduzida pela glicação (Karner & Perktold, 2000), considera-se a modificação desta proteína no compartimento arterial, onde são gerados açúcares dicarbonila, frente à hiperglicemia, reações inflamatórias e acúmulo de lípidos que caracterizam a aterosclerose (Shao et al., 2005). A albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE) é mais captada e

degradada por macrófagos (Machado et al., 2006). Nestas células, a albumina-AGE induz a geração de EROs, em particular ânion superóxido, derivadas da mitocôndria e sistema NADPH oxidase. Este evento associa-se à redução na expressão dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 e com o prejuízo na remoção de colesterol pelas HDL (Machado et al., 2006; de Souza et al., 2012).

Interessante notar que a diminuição na expressão de ABCA-1 ocorre independentemente de modificações na taxa de tradução da proteína e do seu mRNA, sugerindo que vias de degradação pós-traducional, suscitadas pela glicação avançada, possam reduzir o conteúdo proteico de ABCA-1 em macrófagos (Passarelli et al., 2005). Por outro lado, a redução observada no receptor ABCG-1, em decorrência da glicação avançada em macrófagos, decorre da menor taxa de transcrição de seu gene (Isoda et al., 2007).

Feng & Tabas (2002) observaram resultados semelhantes em células tratadas com concentrações pré-tóxicas de colesterol. Macrófagos incubados com sobrecarga de colesterol livre apresentaram prejuízo do efluxo de colesterol e fosfolípidos para as apo A-I e não para as HDL₂, indicando menor expressão do ABCA-1, que se mostrou, de fato, 90% reduzida. Os efeitos foram independentes de alterações nas taxas do mRNA do ABCA-1 e não foram prevenidos por inibidores de caspases (ativadas classicamente em concentrações de colesterol citotóxicas), nem por inibidores de cisteína-proteases, como a calpeptina. A inibição do sistema proteasomal, recuperou parcialmente o conteúdo de ABCA-1, enquanto a inibição do tráfego de colesterol para o retículo endoplasmático foi mais

eficiente em recuperar a expressão do receptor, sugerindo forte participação da organela na estabilidade do receptor.

1.4 Estresse do retículo endoplasmático

O lúmen do retículo endoplasmático representa um ambiente celular ímpar, sendo o sítio onde ocorre o recrutamento de ribossomas e a produção de chaperonas que atuam auxiliando o enovelamento adequado de proteínas recém-formadas. Esta organela é composta por uma rede de membranas nas quais proteínas celulares e proteínas direcionadas à secreção são sintetizadas e assumem suas estruturas primária, secundária e terciária, que garantem sua estabilidade e função. Inevitavelmente, algumas proteínas mal formadas escapam do controle de qualidade da maquinaria do RE, sendo rapidamente degradadas por sistemas de destoxificação (Hosoi & Ozawa, 2009).

As modificações pós-traducionais, como a aquisição de resíduos de monossacarídeos (*N*-glicosilação ou *O*-glicosilação) e a oxidação e isomeração de tióis pelo sistema Ero1 (*endoplasmic reticulum oxireductase 1*) associado à proteína dissulfeto isomerase (PDI; *protein-disulfide isomerase*) garantem a estabilidade dos novos peptídeos. A formação de pontes dissulfeto, formadas a partir da oxidação dos grupos tiol de dois resíduos de cisteína, tem papel determinante na manutenção conformacional das proteínas recém-formadas, especialmente daquelas destinadas à superfície celular e que não estão sob a vigília direta das chaperonas

(Riemer et al., 2009). Além disso, por possuir sítios com afinidade por cadeias polipeptídicas mal enoveladas, há evidências demonstrando que a PDI promove a translocação destes peptídeos, do lúmen do RE ao citosol, favorecendo sua ubiquitinação e degradação proteasomal, em processo designado degradação associada ao RE (ERAD; *ER-associated degradation*) (Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008).

Laurindo et al. (2012) descreveram a versatilidade da PDI em revisão recente, ressaltando as múltiplas funções da proteína e apontando o papel sinalizador de muitos metabólitos celulares, tais como ânion superóxido, que, dependendo de seu contexto biológico, podem intermediar a sinalização redox, ao invés de propagar o insulto oxidativo, como inicialmente postulado. Como ressaltaram os autores, há uma convergência entre o papel da PDI e o complexo NADPH oxidase, considerando que, dependendo do modelo experimental, a PDI pode mediar processos fisiológicos e/ou patofisiológico. Entretanto, é certo que a ação desta proteína multifuncional é um importante componente da homeostase redox intracelular.

Como descrito acima, o RE participa de diversos processos biológicos que transcendem a síntese de proteínas e tangem também mecanismos de regulação transcricionais, fundamentais para o funcionamento celular adequado. A ERAD, processo também mediado pelo RE, evita possíveis efeitos citotóxicos de polipeptídios agregados. O sistema ubiquitina-proteasoma (UPS - *Ubiquitin proteasome system*) é a principal via de degradação de proteínas de meia-vida curta em eucariotos, é um sistema

que dispõe de importante gasto energético, apresenta alta seletividade e conta com a ação de um arsenal enzimático conservado evolutivamente (Demasi & Laurindo, 2012).

A atividade do UPS participa de diversos mecanismos celulares fisiológicos, no entanto, a degradação inadvertida de moléculas intracelulares pode acarretar prejuízos. Chade et al. (2004) demonstraram que a inibição do UPS reduz o estresse inflamatório e melhora a função endotelial nos rins de porcos hipercolesterolêmicos, o que ocorre em detrimento do aumento do estresse oxidativo, evidenciado pela maior atividade da NADPH oxidase e elevação das concentrações de LDL oxidadas circulantes, confirmando que a inibição do UPS é uma ferramenta útil, porém, que deve ser utilizada com cautela devido à possíveis efeitos pleiotrópicos celulares.

Em macrófagos, albumina modificada por glicação inibe enzimas envolvidas na degradação proteasomal, o que implica em redução do *clearance* de novos peptídeos modificados, que são acumulados no compartimento intracelular, promovendo prejuízo vascular ou ainda piora no estado aterogênico (Moheimani et al., 2010). Desta forma, ainda permanece controverso o uso de inibidores do UPS em sistemas biológicos, uma vez que estes interferem em processos sistêmicos podendo proteger ou agravar a aterogênese, dependendo do contexto experimental. Não obstante, Engin & Hotamisligil, (2010) ainda sugerem, em revisão sobre chaperonas químicas, o uso de inibidores do UPS como potenciais alvos terapêuticos,

especialmente em casos de doenças caracterizadas por deficiências lisossomais.

O acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE pode resultar de um aumento súbito na demanda da síntese proteica, de distúrbios na glicosilação, de perturbações na concentração de cálcio e também da sobrecarga de nutrientes (Ron & Walter, 2007). Caso estas condições sobrepujem a capacidade da organela de restaurar a síntese proteica, gera-se o chamado estresse do RE (Lionetti et al., 2009). Particularmente, o RE é bastante sensível às oscilações da concentração intracelular de colesterol e ao desbalanço redox, os quais também contribuem para o estresse do RE, dependendo de sua magnitude.

Em resposta a esse desequilíbrio, ou antes mesmo do estabelecimento deste, diversos mecanismos são ativados, visando o restabelecimento da homeostase da síntese proteica. Frente ao estresse vigente, são ativadas, então, vias adaptativas conhecidas coletivamente como resposta a proteínas não-enoveladas (UPR; *unfolded protein reponse*) (Hotamisligil, 2006; Ron & Walter, 2007). Neste contexto, três proteínas residentes da membrana do RE são sequencialmente ativadas, modulando respostas orquestradas de acordo com o tempo e a intensidade do estresse vigente (**figura 3**).

Inicialmente, a ativação de uma cinase do RE (PERK; *PK-like ER Kinase*), induz a fosforilação da porção α do fator eucariótico de iniciação traducional (eIF2; *eukariotic translation initiation factor 2*), uma proteína conservada ao longo da escala evolutiva, que participa do acoplamento das

subunidades 40S e 60S dos ribossomos, desempenhando importante papel no início da síntese proteica. Uma vez fosforilada, a eIF2 α reduz a taxa de tradução total, diminuindo o aporte de novas proteínas ao lúmen do RE, em uma resposta imediata que evita a sobrecarga da maquinaria da organela. Simultaneamente, são ativadas vias que envolvem a transcrição de genes envolvidos na recuperação celular.

O ATF6 (*activating transcription factor 6*) é um eficiente mediador da ativação transcricional, uma vez que a geração de seu fragmento funcional envolve a clivagem proteolítica de uma proteína já existente. Mais precisamente, a ativação do ATF6 induz seu tráfego da membrana do RE ao Golgi, onde o fator de transcrição é gerado pela ação de duas proteases (S1P e S2P) sendo, então, direcionado ao núcleo, onde modula a expressão de genes-alvo da UPR, dentre eles as chaperonas Grp78/BiP (*glucose-regulated protein-78*) e Grp94 (*glucose-regulated protein-94*) que assistem o enovelamento de proteínas recém-formadas (Kincaid & Cooper, 2007). A sequência de aminoácidos KDEL (lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina) está presente nestas e em outras proteínas e é responsável pela alocação das mesmas no lúmen do RE (Teasdale & Jackson, 1996).

A presença prolongada do estresse resulta na ativação da cinase IRE1 (*inositol-requiring enzyme-1*), que uma vez ativada, exerce sua ação endonucleotídica clivando pequenas porções intrônicas do mRNA do XBP-1 (*X-box DNA-binding protein*). A remoção destes nucleotídeos ativa o fator de transcrição, que induz a expressão de uma série de genes-alvo da UPR, tais

como os de enzimas proteolíticas, como caspases (Zhang & Kaufman, 2008).

Lee et al. (2002) demonstraram que o fragmento ativo do ATF6 e o XBP-1 reconhecem sequências semelhantes do DNA, podendo formar um heterodímero que integra respostas da UPR. É importante notar que estas proteínas (PERK, ATF6 e IRE1), atuam como sensores do estado metabólico da organela, já que em condições fisiológicas elas se encontram associadas à chaperona Grp78, desativadas. Caso haja uma sobrecarga de proteínas mal enoveladas, as chaperonas são recrutadas, e, na ausência da ligação com a Grp78, os sensores da membrana do RE desencadeiam suas respectivas respostas.

Figura 3. Vias da UPR em mamíferos. A UPR caracteriza-se pela ativação sequencial da PERK, IRE1 α e ATF6, proteínas residentes da membrana de RE, em decorrência do acúmulo de proteínas mal formadas. Redução da síntese proteica total e ativação de genes-alvo da UPR, que culminam na síntese de chaperonas (Grp78 e Grp94), biossíntese de aminoácidos, defesas antioxidantes, são conseqüentes destas vias adaptativas, o que garante a sobrevivência celular. Em última instância, ativação de caspases medeia a morte celular por apoptose (adaptado de Zhang & Kauffman, 2008).

Na ativação destes mecanismos, vias de degradação proteica são suscitadas como parte integrante da UPR e agem clivando as proteínas que perderam sua estrutura/função. Estudos revelam que, em condições de estresse do RE, a ativação do ATF6, além de induzir a expressão da Grp78, estimula a degradação proteasomal (Hong et al., 2004; Nadanaka et al., 2007). Neste caso, as proteínas recebem resíduos de ubiquitina que agem como uma etiqueta permitindo o endereçamento dos peptídeos mal formados para o sistema proteasomal, onde ocorre a clivagem proteolítica. Sendo assim, por meio da ERAD, o UPS tem um importante papel no controle de qualidade das proteínas (Kincaid & Cooper, 2007).

Caso o equilíbrio da síntese proteica não seja restabelecido, estas mesmas proteínas levam à ativação de mecanismos apoptóticos. O primeiro deles, é induzido pela fosforilação da eIF2 α , o que tradicionalmente reduz a síntese proteica, mas ao mesmo tempo estimula a tradução seletiva de alguns mRNA por meio de ORFs (*open reading frames*) na porção 5'-não traduzida. É o caso do ATF4, que, além de estimular a expressão de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e ao balanço redox celular,

estimula a expressão da CHOP/GADD153 (*C/EBP homologous protein/growth arrest-and DNA damage-inducible gene GADD153*) que exibe potente efeito apoptótico (Kim et al., 2008, Vatter & Wek, 2004). A ativação da IRE1 α induz mudanças conformacionais em sua porção citosólica que permitem sua associação ao TRAF2 (*TNF α receptor-associated factor 2*) levando à ativação do NF κ B (*nuclear factor kappa B*) e da JNK (*JUN N-terminal kinase*). Finalmente, mecanismos acessórios do RE podem induzir apoptose por meio da ativação de cisteína-proteases, como a caspase-12 (Van der Kallen et al., 2009).

A hiperglicemia, o estresse oxidativo, a inflamação crônica e o acúmulo de lipídeos são conhecidos indutores do estresse do RE. Estudos em modelos de obesidade animal mostram o aumento de marcadores de vias da UPR em adipócitos e hepatócitos, o que se correlaciona com a ativação da JNK e do I κ K β (*Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase beta subunit*), levando à resistência insulínica, independentemente de alterações nos ácidos graxos livres, o que reforça a ligação entre obesidade, estresse do RE e DM 2 (Ozcan et al., 2004). Em macrófagos arteriais, o acúmulo de colesterol esterificado é o estágio inicial no desenvolvimento de células espumosas, ao qual se somam eventos inflamatórios e hemostáticos que agravam o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A atividade da acil colesterol aciltransferase (ACAT) mantém os estoques de colesterol esterificado no citosol. No entanto, na lesão tardia, há prejuízo na atividade desta enzima, que, aliado à redução no efluxo de colesterol, favorece o aumento do conteúdo de colesterol livre, o qual exerce importantes efeitos

intracelulares, incluindo a modificação da composição de membranas de compartimentos microssomais.

O acúmulo intracelular de colesterol livre favorece a apoptose de macrófagos, agravando a instabilidade da placa aterosclerótica, podendo culminar com a ruptura do ateroma (Tabas, 2005). Tal fato advém da distribuição irregular de colesterol livre em diferentes organelas, alterando a função das mesmas. Em particular, as membranas do RE apresentam conteúdo reduzido deste esteroide e a função desta organela é bastante sensível às alterações na concentração de lípidos. Na vigência de sobrecarga de colesterol observa-se depleção dos estoques de cálcio do RE, que propaga vias da UPR (Zhang & Kaufman, 2003). O aumento da expressão de proteínas envolvidas na síntese de fosfolípidos e re-esterificação de esteroides atuam como elementos compensatórios ao acúmulo tóxico de colesterol no retículo e em outras membranas celulares (Ron & Hampton, 2004).

Feng et al. (2003) demonstraram que a UPR, desencadeada pelo excesso de colesterol no RE, é semelhante àquela observada mediante incubação com tunicamicina, indutor clássico do estresse de RE. A ativação de CHOP (*C/EBP homologous protein*), mediada pela MAP cinase 3-p38 e dependente de via de sinalização desencadeada pelos receptores *scavenger* da classe A, é importante mediadora de apoptose em macrófagos (Devries-Seimon et al., 2006). Consequente ao aumento do tráfego de colesterol no RE observa-se maior secreção de citocinas inflamatórias que exacerbam o dano vascular (Li et al., 2005).

Marcadores de estresse do RE estão presentes em diversas fases do desenvolvimento da lesão aterosclerótica, provavelmente em decorrência dos vários fatores de risco que atuam predispondo ao seu desenvolvimento. Além disso, a interação entre os elementos da placa e fatores hemodinâmicos e metabólicos que a remodelam constantemente têm ação sinérgica, agravando o prejuízo celular.

Os mecanismos celulares responsáveis pela redução do conteúdo de ABCA-1 no diabetes melito, onde a formação de AGE é prevalente, não foi diretamente abordada até o momento, e pode relacionar-se ao estresse do RE e vias de degradação associadas.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivos gerais*

Avaliar, em macrófagos, o efeito do tratamento com albumina modificada por glicação avançada sobre o estresse do RE e suas vias adaptativas, relacionando-os com o prejuízo na expressão do ABCA-1 e efluxo de colesterol celular.

2.2 *Objetivos específicos*

Determinar em macrófagos tratados com albumina controle ou albumina-AGE - produzidas *in vitro* ou isoladas do soro de portadores de diabetes melito com controle glicêmico inadequado:

- a expressão do ABCA-1 e o efluxo de colesterol mediado por apo A-I;
- a expressão de proteínas marcadoras do estresse do RE (Grp78, Grp94, PDI, calreticulina) e de componentes da resposta a proteínas mal enoveladas (ATF6, eIF2 α -P, CHOP);
- o efeito da indução do estresse do RE, com tunicamicina, sobre a expressão do ABCA-1 e sobre o efluxo de colesterol em macrófagos;
- o efeito da chaperona química - PBA - *ácido fenil butírico* (que promove melhora na função secretora do RE) - sobre proteínas marcadoras de estresse do RE e sobre a expressão do ABCA-1;

- o efeito do inibidor do sistema ubiquitina-proteasoma, MG132, sobre a expressão do ABCA-1 e sobre o efluxo de colesterol.

3. MÉTODOS

O protocolo para utilização de animais foi de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e todos os procedimentos experimentais deste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (Cappesq # 0424/08).

3.1 Glicação da albumina *in vitro*

A modificação da albumina por glicação avançada foi induzida pela incubação de albumina bovina isenta em ácidos graxos (FAFA) com PBS/EDTA pH 7,4 contendo 10 mM de glicolaldeído (GAD), em condições estéreis, atmosfera de nitrogênio e banho-maria a 37°C. Esta incubação foi feita sob agitação lenta, durante 4 dias (40 mg de albumina/mL de solução de glicolaldeído). O glicolaldeído promove rápida derivatização de resíduos de lisina e arginina da albumina por AGE, especialmente, carboximetil-lisina. Albumina controle foi preparada na presença de PBS/EDTA, apenas. Ao final da preparação, as amostras foram dialisadas contra PBS e esterilizadas em filtro de 0,22 µm. As amostras foram mantidas a -80°C até o uso. Ambas as albuminas, controle e AGE, foram diluídas para concentração final de 2 mg/mL em meio de cultura DMEM (*baixa concentração de glicose* - Gibco®) e incubadas por diferentes intervalos de tempo com macrófagos.

3.2 Isolamento e purificação da albumina sérica de indivíduos controles e de pacientes portadores de DM 1 e 2

A albumina foi isolada do soro de pacientes portadores de diabetes melito tipo 1 e tipo 2 e de indivíduos controles, por cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (FPLC), utilizando-se coluna HiTraptmBlue (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Os indivíduos controles foram selecionados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e os portadores de DM, no Ambulatório de Diabetes e na Liga de Diabetes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Foram selecionados pacientes com valores de hemoglobina glicada (HbA1c) superiores a 1,5% do limite de normalidade, e com concentração plasmática de triglicérides abaixo de 400 mg/dL. Não foram incluídos indivíduos com hipotireoidismo ou hipertireodismo descompensado, insuficiência renal ou hepática, microalbuminúria e etilistas. Todos os participantes assinaram termo de consentimento informado, segundo critério de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP (Cappesq 740/06, referente ao projeto de Doutorado de Adriana Machado-Lima, processo FAPESP 06/55496-7).

A idade, o índice de massa corporal (IMC) e os dados bioquímicos dos indivíduos (**tabela 1**) foram gentilmente cedidos por Adriana Machado-Lima (Lima, 2010).

Tabela 1. Idade, IMC e dados bioquímicos dos indivíduos do grupo C, DM1 e DM2.

	C (n=6)	DM1 (n=6)	DM2 (n=6)
Idade (anos)	28 ± 6,8	26 ± 8 ^a	61 ± 17 ^a
IMC (Kg/m ²)	27 ± 3,8	22,3 ± 2,6 ^b	27,8 ± 4,3 ^b
Glicose (mg/dL)	78,5 ± 5,8	153,5 ± 89 ^c	226,5 ± 86 ^d
Hb1Ac (%)	5,3 ± 0,14	10,2 ± 1,36 ^a	10 ± 1 ^a
Frutosamina (μmol/L)	233,6 ± 26	478 ± 85,2 ^a	392,8 ± 73 ^a
Albumina Glicada (%)	8,8 ± 1,9	28 ± 6,4 ^a	23 ± 6 ^a
CML (ng/mg de proteína)	0,38 ± 0,04	0,71 ± 0,12 ^b	0,59 ± 0,05 ^d

Adaptado de Lima (2010); ^ap < 0,001 vs C; ^bp < 0,05 vs DM1; ^cp < 0,0001 vs C, ^dp < 0,01 vs C.

As amostras do soro de cada paciente foram dialisadas contra solução de 50 mM de KH₂PO₄, pH 7,0 (Tampão A) e filtradas em filtro de 0,45 μm. A coluna HiTraptmBlue conectada ao FPLC foi equilibrada com o Tampão A. Um mL de soro de cada paciente foi injetado no FPLC, em uma taxa de fluxo de 1 mL/min. As amostras foram, então, eluídas com Tampão B (50 mM KH₂PO₄, 1,5 M KCl, pH 7,0). Ao final de cada sequência, a coluna HiTraptmBlue (*GE Healthcare, Uppsala, Sweden*) foi re-equilibrada com o Tampão A. As amostras foram esterilizadas em filtro 0,22 μm. A concentração final da fração total da albumina sérica de cada indivíduo foi determinada pelo método de Lowry et al., (1951). As amostras foram estocadas a -70°C até sua utilização.

Em seguida, as amostras foram purificadas pelo método adaptado por Ohkawara et al. (2002). Duzentos μL da fração de albumina isolada por

FPLC foram adicionados a 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. As amostras foram agitadas em *vortex* e deixadas em repouso por 10 min a TA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 10000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 600 µL de etanol absoluto. As amostras foram centrifugadas novamente por 2 minutos a 10000 g e o sobrenadante, contendo a albumina purificada, foi mantido a 4°C até uso.

3.3 Obtenção e cultivo dos macrófagos de peritônio de camundongos e macrófagos da linhagem J774

Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos da linhagem suíça, lavando-se o peritônio com solução de tampão fosfato (PBS - NaCl 150 mmol/L, Na^2HPO_4 20mmol/L, NaH^2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1 mmol/L – pH 7,4) estéril, acrescido com penicilina G potássica e sulfato de estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA). As células foram mantidas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (FCS) e antibióticos e foram cultivadas em placas de cultura de 10 mm (30×10^6 células/placa), em incubadora de CO_2 5% a 37°C, durante 24 h. A seguir, as placas foram lavadas com PBS/FAFA para remoção de células não aderidas. Os macrófagos foram, então, incubados com DMEM contendo albumina glicada *In vitro* ou albumina isolada dos indivíduos controles ou DM. Em ensaios de citometria de fluxo foram utilizados macrófagos de peritônio de camundongos da linhagem tumoral J774, cedidos gentilmente pela Dra. Hiro

Goto do Laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT) da FMUSP (LIM-38). Macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em meio RPMI/FCS até atingirem confluência. Após confluência total, as células foram trispsinizadas para determinação da viabilidade celular e do número de células, e por fim, foram transferidas para placas de 12 cavidades (1×10^6 células/*well*).

3.4 Quantificação do mRNA de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-AGE

Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados com albumina-C ou albumina-AGE por 18h e o RNA total foi extraído pelo método do TRIzol e mantido a -70°C até seu processamento. A RT-PCR foi realizada com cDNA obtido a partir de 500 ng de RNA. Para a amplificação 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 pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, no qual $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene alvo} - \text{Ct do controle endógeno}$.

3.5 Determinação da expressão de marcadores da UPR, marcador de degradação proteasomal e de chaperonas - eIF2 α , ATF6, CHOP, ubiquitina, Grp78, Grp94, PDI e calreticulina - por Western Blot

Após tratamento, as células foram removidas das placas com tampão tris (TBS) 1X acrescido com inibidores de protease (aprotinina 1,5 μ M; leupeptina 1 μ M; pepstatina 2 μ M e 0,1mM), centrifugadas e ressuspensas em SDS glicerol. Nas amostras testadas para expressão de eIF2 α -P as células foram descoladas da placa em TBS acrescido de inibidores de fosfatase (fluoreto de sódio 4,2 mg/mL; pirofosfato de sódio 4,5 mg/mL e ortovanadato de sódio 0,18 mg/mL). As amostras foram mantidas a -70°C até seu processamento.

Quantidades iguais de proteína celular (40 μ g) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, (Grp78, Grp94, ATF6 e calreticulina), 12% (eIF2 α -P e CHOP) e 15% (ubiquitina) e separadas por eletroforese (150 V, por 1h). Após transferência para membrana de nitrocelulose (346 mA, por 1h) e bloqueio de sítios não ocupados na mesma (solução de leite desnatado 5% em PBS acrescido de Tween 0,05%), as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anti-KDEL 1:1000 (*Stressgen, Ann Arbor, MI, EUA*), anti-eIF2 α 1:1000 (*Upstate*), anti-ATF6 1:1000 (*Abcam, Cambridge, MA, EUA*), anti-CHOP (*ABR - Affinity Bioreagents, Fisher Scientific, EUA*), anti-PDI 1:1000 (*Stressgen*), anti-calreticulina 1:1000 (*Stressgen*) e anti-ubiquitina 1:750 (*ZYMED[®] Laboratories Carlsbad, CA, EUA*) e β -actina (*Fitzgerald Industries International Inc, Concord, MA*) *overnight*. Ao final da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por

10 min com TBS com Tween 20 (0,05%) e reagidas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (*enhanced chemiluminescence* – *Pierce, Rockford, IL, EUA*) e a revelação da quimioluminescência foi executada com o aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). As bandas foram avaliadas em pixels, pelo software de análise ImageQuant TL (*GE Healthcare*). Os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias corrigidas pela expressão de β -actina.

Em algumas situações as mesmas membranas foram incubadas com mais de um anticorpo. Para tanto, ao final da revelação, a membrana foi lavada 5 vezes com água deionizada e foram adicionados 50 mL de NaOH 0,8 M. A membrana foi agitada vigorosamente por 5 min, o NaOH foi descartado e a membrana foi lavada com água deionizada por diversas vezes ao longo de 5 min. A membrana permaneceu em água por 1 h sob agitação lenta, foi lavada por 2 vezes com TBS-T e bloqueada com solução de leite desnatado (5% em PBS-T) por 30 min. Ao final do bloqueio a membrana foi incubada novamente com o novo anticorpo primário *overnight*.

3.6 Determinação da viabilidade celular pela liberação de lactato desidrogenase

Para determinar o possível efeito citotóxico dos inibidores de proteases, ensaios de viabilidade foram executados. A liberação da lactato desidrogenase no meio de cultura foi avaliada com o kit *In Vitro Toxicology*

assay (Sigma-Aldrich). Ao final da incubação, alíquotas do meio de cultura foram removidas e centrifugadas a 250 g por 4 min, o sobrenadante foi transferido para tubos estéreis onde foram adicionados o substrato, o cofator e o corante da reação (1:1:1) em um volume 2X maior que o volume de meio. A solução foi incubada a TA por 25 min e a reação foi interrompida com a adição de 1/10 do volume de HCl para posterior leitura no espectrofotômetro. A leitura da absorbância foi feita a 490/690 nm. A liberação de LDH no meio de cultura não diferiu entre os tratamentos controles e tratados, em nenhuma situação.

3.7 Determinação, por imunocitoquímica, da expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência de inibidores do sistema proteasomal, e do estresse do RE

Macrófagos de peritônio de camundongos foram cultivados em lamínulas e pré-incubados por 8 h na presença das albuminas-AGE e controle. Posteriormente, as células foram incubadas por 2 h, em quadruplicata, ainda na presença e ausência das albuminas-AGE e controle, com o inibidor específico do sistema proteasomal, MG132 1 μ M. Incubações com albuminas-C e AGE também foram feitas na presença e ausência do 4-ácido fenil butírico (*Alfa Aesar*) - PBA 5 mM - inibidor do estresse do RE. Ao final do período de incubação, as células foram lavadas (3X por 5 minutos) com PBS e fixadas em álcool 70%, por 10 minutos a 4°C. Após lavagens (3X

por 10 minutos em PBS) as células foram então permeabilizadas em PBS + Tween 20 (0,05%) por 30 minutos a 37° e simultaneamente incubadas com 1% de albumina com o objetivo de bloquear os sítios inespecíficos. As células foram lavadas novamente (2X por 5 minutos em PBS) e incubadas com o anticorpo primário anti-ABCA-1 (1:250) diluído em PBS contendo albumina 1% por 2 h a 37°C. Duas lamínulas não foram incubadas com o anticorpo primário para verificar posteriormente eventuais marcações inespecíficas.

Após sucessivas lavagens (4X por 10 minutos em PBS), as células foram incubadas na presença do anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído em PBS (1:800) por 90 minutos a 4°C e lavadas novamente em PBS (3X por 5 minutos). O protocolo de marcação consistiu na incubação das lamínulas com DAB (diaminobenzidina - *Peroxidase Substrate Kit DAB - Vector Laboratories Inc*) por 2 minutos, seguida de sucessivas lavagens com água destilada. Posteriormente, as lamínulas foram contracoradas com hematoxilina de Carazzi por 30 segundos, lavadas por várias vezes com água destilada, desidratadas em xilol e montadas com Entellan (*Merck, Darmstadt, Germany Sigma Chemical Co. St. Louis, USA*) em lâminas de microscopia.

A quantificação do número total de células e de células marcadas por DAB (positivas para o ABCA-1) foi feita de maneira cega em microscópio óptico (*Leica, DMSL, Alemanha*), e as imagens foram capturadas por câmera acoplada ao microscópio (*Kohler*), utilizando o software QWin V3 Standard. A leitura foi feita em cada quadrante da lamínula, sendo quatro

lamínulas para cada situação experimental. Os resultados são apresentados como porcentagem de células positivas para ABCA-1.

3.8 Determinação, por citometria de fluxo, da expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência de inibidor do sistema proteasomal e do estresse do RE.

Macrófagos de peritônio de camundongos da linhagem J774 foram pré-incubados por 24 h com 0,5 mM de 8-Br AMPc, e em seguida, foram incubados na presença das albuminas AGE e controle por 8 h. Nas duas últimas horas de incubação com as albuminas, foram adicionados à cultura o inibidor específico do sistema proteasomal, o MG132 (1 μ M) e o inibidor seletivo da calpaína, a calpeptina (30 μ g/mL). Estas incubações foram feitas isolada e concomitantemente. Incubações com tunicamicina (2 μ g/mL) foram feitas por 8 h para avaliar o efeito do estresse do RE na expressão do ABCA-1. Ao final das incubações, as células foram tripsinizadas para contagem e avaliação da viabilidade celular. Amostras contendo $1,5 \times 10^6$ células, com viabilidade $\geq 95\%$ foram centrifugadas (3 min, 2500 rpm, 4°C), o botão celular foi lavado por 2 vezes com PBS gelado (4°C) e transferido para tubos *ependorf*. Após lavagens, o *pellet* foi ressuspenso e fixado em paraformaldeído (PFA) 4%, por 20 min a temperatura ambiente. Ao final da fixação as amostras foram centrifugadas e lavadas novamente em PBS. O

pellet foi ressuspensionado em uma alíquota de 200 μ L de solução de PBS contendo 1:250 de anti-ABCA-1 (*Novus Biological, Littleton, CO, EUA*).

A reação com o anticorpo primário foi feita por 1 h. Ao final desta incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS para posterior incubação com 200 μ L de solução contendo 4 μ g/mL do anticorpo secundário Alexa Fluor[®] 488 (*Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA*), por 1 h. Ao final desta última incubação as células foram lavadas novamente com PBS para avaliação da fluorescência em citômetro de fluxo FACS Calibur e pelo software Cellquest (*BD, San Jose, CA, USA*). Em todos os experimentos a fluorescência celular obtida foi corrigida pela fluorescência basal das leituras de amostras celulares incubadas na ausência de anticorpos primários e/ou secundários.

3.9 Determinação do efluxo de ¹⁴C-colesterol em macrófagos tratados com albumina-controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência do inibidor estresse do RE.

Macrófagos de peritônio de camundongos foram cultivados em placas de 48 *wells* em concentração de $0,5 \times 10^6$ células por poço. Após confluência, os macrófagos foram incubados com DMEM (*Gibco, Grand Island, NY, USA*) contendo 1 mg de albumina isenta em ácidos graxos (FAFA) (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha*), acrescido de 50 μ g de LDL acetilada/mL e 0,3 μ Ci de ¹⁴C-colesterol/mL, durante 48h. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram tratadas por 24 h com 0,5 mM de 8-Br AMPc e, em seguida, com as

albuminas-AGE ou controle, por 8 h. Após lavagens, as células foram então incubadas, ainda na presença das albuminas controle e AGE, na presença e ausência de apo A-I por 8 h. O meio de cultura foi recolhido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora (*Perkin Elmer, Turko, Finlândia*) para determinação da radioatividade no meio de cultura. 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) e a radioatividade determinada, após evaporação do solvente. Foram adicionados 150 µL de NaOH 0,2 N aos poços da placa para extração do conteúdo proteico (3 h, sob agitação, à temperatura ambiente). A determinação da concentração de proteína foi determinada pelo método do BCA (*Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA*).

A quantidade de radioatividade presente no meio em incubações feitas na ausência da apo A-I indica o efluxo de colesterol mediado pela albumina (efluxo inespecífico); e a radioatividade presente no meio nas incubações feitas na presença da apo A-I indica o efluxo mediado por ambos aceptores de colesterol, apo A-I e albumina (efluxo total). Desta forma, calcula-se a percentagem do efluxo específico, mediado por apo A-I, subtraindo-se o efluxo mediado pela albumina do efluxo total. A percentagem do efluxo foi calculada pela fórmula abaixo:

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

3.10 Análise estatística

As comparações foram feitas pelo teste t de *Student* não pareado ou por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman-Keuls. Utilizou-se o programa GraphPad Prisma Versão 4.0, considerando-se como significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Macrófagos tratados com albumina-AGE não apresentaram alteração na expressão de mRNA de ABCA-1 (**figura 1**). A figura **1A** demonstra a qualidade das amostras de RNA extraído e a **1B** a representação gráfica da reação de RT-PCR.

A

B

Figura 1. Quantificação da expressão de mRNA de ABCA-1 em macrófagos tratados com Albumina-C ou Albumina-AGE por RT-PCR em tempo real. Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados com albumina-C ou albumina-AGE, por 18h. O RNA total foi extraído e a RT-PCR foi realizada com cDNA obtido a partir de 500 ng de RNA. A quantificação do mRNA de ABCA-1 foi corrigida pelo gene da β -actina, utilizado como normalizador da reação. **A)** Teste de integridade dos RNA extraídos, demonstrando as bandas 18S e 28S; **B)** Expressão do mRNA de ABCA-1 em 18h de incubação com albumina-C e -AGE (n=3).

Após 18 h de tratamento, a albumina-AGE aumentou em 5,6 vezes a expressão da chaperona Grp78 em comparação à albumina-C (**figura 2A**). O incremento na expressão da chaperona Grp78 ocorreu de maneira tempo-dependente, atingindo maior pico após 8 h. O **painel interno** da figura destaca o aumento de 130% na expressão da Grp78, seguido de decréscimo nos tempos posteriores de incubação. O tratamento com albumina-AGE condicionou também maior expressão da Grp94 em macrófagos (**figura 2B**), em padrão semelhante ao da Grp78. A expressão de ambas chaperonas, induzida pela albumina-AGE, foi maior do que aquela obtida na presença de tunicamicina, indutor clássico do estresse do RE. Simultaneamente, observou-se expressão aumentada de proteína de aproximadamente 55 KDa, detectada pelo anticorpo anti-KDEL.

A **B**

Figura 2. Expressão das proteínas Grp78 e Grp94 em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com albumina-C, por 18 h, ou albumina-AGE, por diferentes intervalos de tempo (2 mg/mL). Incubação com tunicamicina (Tun - 2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo para indução do estresse do RE. Quantidades iguais de proteína celular foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Estas foram incubadas com anticorpo anti-KDEL (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL. Figura

representativa de dois experimentos independentes. **A)** Expressão da Grp78; **Painel interno:** expressão da Grp78 em macrófagos incubados por 8 h com albumina-C e albumina-AGE (n=3) **B)** Expressão da Grp94.

A expressão do ATF6, importante mediador da síntese de chaperonas, também se mostrou elevada em macrófagos expostos à albumina-AGE, principalmente após 8 h de tratamento (**figura 3**). A expressão da eIF2 α -P foi determinada com o objetivo de verificar se o insulto glicoxidativo ativa vias precoces da UPR, envolvidas na redução global da tradução. De fato, logo após 2 h de exposição dos macrófagos à albumina-AGE foi observado aumento na expressão da eIF2 α -P, a qual atingiu seu máximo após 8 h (3,24 vezes maior do que incubação com albumina-C). A intensidade do sinal foi reduzida em intervalos subsequentes de tempo. A **figura 4** ilustra a expressão da eIF2 α -P corrigida pela β -actina. À semelhança dos resultados obtidos com as chaperonas, a expressão da eIF2 α -P em macrófagos incubados com tunicamicina foi inferior àquela observada com albumina-AGE.

Figura 3. Expressão do ATF6 em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE ao longo do tempo. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com albumina-C, por 18 h, ou albumina-AGE, por diferentes intervalos de tempo (2 mg/mL). Incubação com tunicamicina (Tun - 2 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo para indução do estresse do RE. Quantidades iguais de proteína celular foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Estas foram incubadas com anticorpo anti-ATF6 (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL. Figura representativa de dois experimentos distintos.

Figura 4. Expressão de eIF2 α -P em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE ao longo do tempo. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com albumina-C, por 18 h, ou albumina-AGE, por diferentes

intervalos de tempo (2 mg/mL). Incubação com tunicamicina (Tun - 2 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo para indução do estresse do RE. Quantidades iguais de proteína celular foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, onde foram incubadas com anticorpo anti-elf2 α -P (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:10000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL.

A CHOP, mediadora de vias pró-apoptóticas da UPR, teve sua expressão minimamente afetada pela albumina-AGE, nos diversos intervalos de tempo analisados (**figura 5**). Da mesma forma, a PDI, proteína sensora do estado redox do RE, não teve sua expressão alterada em macrófagos tratados com albumina-AGE (**figura 6**).

Figura 5. Expressão da CHOP em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE ao longo do tempo. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com albumina-C, por 18 h, ou albumina-AGE, por diferentes intervalos de tempo (2 mg/mL). Incubação com tunicamicina (Tun - 2 μ g/mL) foi utilizada como controle positivo para indução do estresse do RE. Quantidades iguais de proteína celular foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Estas foram incubadas

com anticorpo anti-CHOP (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL.

Figura 6. Expressão da PDI em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE ao longo do tempo. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com a albumina-AGE ou albumina-C (2 mg/mL) ao longo do tempo. Incubação com tunicamicina (Tun - 2 µg/mL) foi utilizada como controle positivo para indução do estresse do RE. Quantidades iguais de proteína celular foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Estas foram incubadas com anticorpo anti-PDI (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL.

Na **figura 7**, observa-se que a expressão da ubiquitina foi gradualmente aumentada ao longo do tempo em macrófagos incubados com albumina-AGE. A elevação obtida após 18 h de incubação com albumina-AGE foi 4,3 vezes superior àquela obtida com albumina-C.

Figura 7. Expressão da ubiquitina em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com a albumina-AGE ao longo do tempo. Após incubação com 2mg/mL de albumina-AGE por diferentes intervalos de tempo, os macrófagos foram raspados da placa em tampão TBS acrescido de inibidores de protease. Quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida (15%), submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, onde foram incubadas com anticorpo anti-ubiquitina (1:750) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL.

O efeito inibitório do PBA sobre o estresse do RE foi confirmado pela redução na expressão da chaperona Grp78 (**figura 8A**) em macrófagos tratados com albumina-AGE por 8 horas. O mesmo foi observado em relação à expressão de componentes da UPR, ATF6 e eIF2 α -P, cujas expressões, previamente induzidas pela albumina-AGE foram minimizadas na presença do PBA (**figuras 8B e 8C**).

Figura 8. Expressão da chaperona Grp78 e dos componentes da UPR, ATF6 e eIF2α-P, na presença de PBA. Macrófagos de peritônio de camundongo foram submetidos ao tratamento com a albumina-AGE (2 mg/mL) por 8 h, na presença e ausência de 4-PBA (2,5 mM e 5 mM). Quantidades iguais de proteína celular foram aplicadas em gel de poliácridamida 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo **A)** anti-KDEL (1:1000), **B)** anticorpo anti-ATF6 (1:1000) e anticorpo **C)** anti-eIF2α-P (1:1000) seguido de anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi feita após reação com ECL e revelação em câmara escura. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Macrófagos tratados com albumina-AGE apresentaram uma redução de 25% na expressão de ABCA-1, determinada por imunocitoquímica, em comparação aqueles incubados com albumina-C (**figura 9A**). Entretanto, a inibição do sistema proteasomal, pelo MG132, não foi capaz de recuperar o conteúdo de ABCA-1 nestas células. Na **figura 9B** nota-se que, em comparação aos macrófagos tratados com albumina-AGE, a porcentagem de células DAB-positivas não foi diferente após a adição do MG132.

Por outro lado, em macrófagos tratados com albumina-AGE, o PBA foi capaz de prevenir a redução no conteúdo celular de ABCA-1, observada no tratamento isolado com albumina-AGE (**figura 9C**). De fato, o número de células DAB-positivas nas incubações com albumina-AGE na presença do PBA foi semelhante às incubações controles.

A**s/ ac primário** **AlbC** **AlbAGE** **AlbC
+ MG132** **AlbAGE
+ MG132** **AlbC
+ PBA** **AlbAGE
+ PBA**

B **C**

Figura 9. Expressão do ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-AGE na presença ou ausência do MG132 ou PBA. Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados com Albumina C ou Albumina AGE na presença e ausência de inibidores do sistema proteasomal e do estresse do RE, por 10 h (**A**). As células foram fixadas e incubadas com anticorpo anti-ABCA-1, seguindo-se incubações com anticorpo secundário conjugado à peroxidase, DAB e hematoxilina de Carazzi. **B)** Marcação de DAB em células tratadas PBA na presença ou ausência do MG132 (1 μM) nas 2 últimas horas; **C)** Marcação de DAB em células tratadas na presença ou ausência de PBA (5 mM) por 10h.

A avaliação da expressão do ABCA-1 por citometria de fluxo confirmou os resultados obtidos por imunocitoquímica. Previamente às incubações com PBA, foram feitas incubações piloto para verificar a sensibilidade do método. Na **figura 10A** observamos que, na ausência de estímulo com AMPc e ausência de marcação com anticorpos o citômetro detecta apenas a autofluorescência do macrófago, que é posteriormente corrigida nas incubações de interesse. Ademais, foram feitas incubações na presença de AMPc e, como esperado, o estímulo elevou a expressão do ABCA-1. Por outro lado, tratamentos com albumina-AGE e tunicamicina, compostos sugeridos como supressores da expressão do ABCA-1, de fato, executaram seus efeitos previstos, validando o método para a aferição da expressão do ABCA-1 em macrófagos.

Assim como a imunocitoquímica, a citometria demonstrou que a presença da albumina-AGE reduziu a expressão do ABCA-1 em 33% quando comparada à incubação controle. Isto foi prevenido pela incubação com PBA 2,5 mM (**figura 10C**). Contrariamente, o MG132 não foi capaz de recuperar o prejuízo na expressão do ABCA-1, induzido pela albumina-AGE (**figura 10B**).

A **B**

Figura 10. Expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-C ou albumina-AGE, na presença e ausência de MG132 e PBA. Ao final do tratamento, macrófagos J774 foram descolados e fixados em PFA (4%). As amostras foram incubadas na ausência de anticorpos (BG) e na presença de anticorpos primários (anti-ABCA-1 - 1:250) reagidos com anticorpos secundários conjugados à fluoróforos (Alexa488 - 4µg/mL). As unidades de fluorescência foram quantificadas por citometria de fluxo. **A)** Padronização do método - macrófagos J774 pré-incubados na presença ou ausência de AMPc por 24h e incubados com albumina-C (BG e Albumina C), Albumina-AGE e tunicamicina (Tun) por 8h; **B)** macrófagos J774 incubados com albuminas C e AGE por 10h, sendo o MG132 (1 µM) adicionado nas 2 últimas horas de incubação; **C)** macrófagos incubados com albuminas C e AGE, na presença de 2,5 e 5 mM de PBA.

Para verificar se a melhora na expressão de ABCA-1 reflete, de fato, na recuperação de sua funcionalidade, foram realizados ensaios de efluxo de colesterol, que consistem na avaliação da capacidade de remoção de

colesterol pelas apo A-I. Corroborando os dados anteriores, macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-AGE apresentaram redução de 47% na taxa de efluxo de colesterol. A incubação com PBA recuperou a capacidade de exportação de colesterol para as apo A-I (**figura 11**).

Figura 11. Efluxo de colesterol mediado por apo A-I de macrófagos tratados com albumina-AGE, na presença e ausência de PBA. Macrófagos de peritônio de camundongos, enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol, foram pré-incubados com AMPc (24h) e tratados com albuminas C e AGE (8h) na presença e ausência de PBA (5 mM). O efluxo de colesterol específico foi determinado na presença da apo A-I por 8h.

A íntima associação entre estresse do RE e prejuízo no efluxo de colesterol mediado por ABCA-1 foi confirmada por experimentos com tunicamicina, potente indutor de estresse de RE. Macrófagos incubados com tunicamicina, à semelhança das células incubadas com albumina-

AGE, apresentaram redução na expressão de ABCA-1 (-61%) (**figura 12A**), efeito que prejudicou drasticamente a exportação do colesterol para as apo A-I, que foi reduzido em 82% (**figura 12B**), em consequência da diminuição do conteúdo de ABCA-1.

Figura 12. Expressão do ABCA-1 e efluxo de colesterol em macrófagos tratados com tunicamicina. Macrófagos de peritônio de camundongo foram tratados por 18 horas com tunicamicina (Tun - 2 µg/mL), incubações controles foram feitas apenas na presença de DMEM. **A)** o conteúdo de ABCA-1 foi determinado por citometria de fluxo em macrófagos J774 (n=6). **B)** Macrófagos de peritônio de camundongos sobrecarregados com LDL-acetilada e ¹⁴C-colesterol foram tratados por 18 horas tunicamicina (2 µg/mL), incubações controles foram feitas apenas na presença de DMEM. O efluxo de colesterol foi determinado utilizando-se partículas de apo A-I (30 µg/mL) como aceptores de colesterol por 8 horas.

Albuminas glicadas *in vivo*, purificadas do soro de portadores de diabetes melito tipo 1 e 2 com controle glicêmico inadequado, e de indivíduos não diabéticos foram utilizadas para determinação da expressão de

proteínas marcadoras do estresse do RE. A incubação de macrófagos com albumina-DM1 ou -DM2 não alterou a expressão das chaperonas Grp78 e Grp94, em comparação às células tratadas com albumina-nãoDM, embora apenas um número reduzido de amostras tenha sido analisado (**figura 13A e 13B**). A incubação com tunicamicina foi realizada como controle positivo, evidenciando maior expressão de Grp78 e 94 em comparação às albuminas. Quando a análise estatística foi realizada com albumina-DM1 e -DM2 conjuntamente, observou-se que a albumina-DM não modificou a expressão da Grp78 (**figura 13C**), embora observa-se uma tendência ($p = 0,08$) de aumento na expressão da Grp94 em comparação aos macrófagos tratados com albumina-nãoDM (**figura 13D**).

Figura 13. Expressão das chaperonas Grp94 e Grp78 em macrófagos submetidos ao tratamento com albuminas isoladas de indivíduos controles (C), diabéticos tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados com albumina isolada do soro de indivíduos C, DM 1 ou DM 2 por 18 h. Quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10%), submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta foi incubada com anticorpo anti-KDEL (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL. Figura representativa de 2 imunoblots independentes. **(A e B)** Expressão da Grp78 e Grp94 em macrófagos tratados com albumina de indivíduos C, DM1 ou DM2. **(C e D)** Expressão da Grp78 e Grp94 em macrófagos incubados com albumina de indivíduos C e DM, sendo que neste grupo foram agrupados os efeitos das albuminas DM1 e DM2 (n=4 para cada tratamento).

A **figura 14A** evidencia aumento da expressão da PDI nos macrófagos tratados com albumina-DM1, mas não com albumina-DM2. O agrupamento das albuminas-DM1 e -DM2 evidenciou expressão estatisticamente superior da PDI em relação às incubações com albuminas-nãoDM (89 %, p=0,02) (**figura 14B**).

Figura 14. Expressão da PDI em macrófagos submetidos ao tratamento com albuminas isoladas de indivíduos controles (C), diabéticos tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados, em quadruplicata, com albuminas C, DM 1 ou DM 2, por 18 h. Quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo-se incubação com anticorpo anti-PDI (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL. Bandas representativas de 2 imunoblots **A)** Expressão de PDI/ β -actina em macrófagos tratados com albumina-C, DM 1 e DM 2 (n=4 para cada situação). Em **B**, os grupos DM 1 e 2 foram agrupados.

A expressão de ubiquitina não foi alterada em macrófagos tratados com albumina-DM1 ou DM2, em comparação à albumina-C, o que foi

atribuído ao elevado desvio padrão dos grupos (**figura 15A**). Entretanto, quando se agruparam os valores de DM1 e DM2, observou-se maior expressão de ubiquitina em comparação à incubação com albumina-C (**figura 15B**).

Figura 15. Expressão da ubiquitina em macrófagos submetidos ao tratamento com albuminas isoladas de indivíduos controles (C), diabéticos tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2). Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados, em sextuplicata, com albumina C, DM 1 ou DM 2, por 18 h. Quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida 12%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguida de incubação com anticorpo anti-ubiquitina (1:750) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL. **A)** Expressão de ubiquitina/β-actina em macrófagos tratados com albumina-C, DM 1 e DM 2 (n = 6 para cada situação). Figura representativa de 2 imunoblots independentes. Em **B**, os grupos DM 1 e 2 foram agrupados.

A expressão da calreticulina, chaperona residente do RE que participa de diversos processos celulares dependentes de Ca^{2+} foi maior em macrófagos tratados com albumina-DM1. Novamente, a ausência de efeito significativo no grupo DM2 pode ser atribuída ao elevado desvio padrão (**figura 16A**). Entretanto, quando as albuminas DM1 e DM2 foram agrupadas, observou-se aumento na expressão da calreticulina em comparação às incubações com albumina-C (**figura 16B**).

Figura 16. Expressão da calreticulina em macrófagos submetidos ao tratamento com albuminas isoladas de indivíduos controles, diabéticos tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) com controle glicêmico inadequado. Macrófagos de peritônio de camundongo foram incubados, em sextuplicata, com albumina C, DM 1 ou DM 2, por 18 h. Quantidades iguais de proteína foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10%, submetidas à eletroforese e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguida de incubação com anticorpo anti-calreticulina (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL. **A)** Expressão de calreticulina/ β -actina em macrófagos tratados com albumina-C, DM 1 e DM 2 (n = 6 para cada situação). Figura representativa de 2 imunoblots independentes. Em **B**, os grupos DM 1 e 2 foram agrupados.

5. DISCUSSÃO

Indivíduos portadores de DM apresentam risco cardiovascular aumentado em até quatro vezes quando comparados a indivíduos sem histórico da doença, o que eleva sua mortalidade em 70% (Haffner, 2006). Os mecanismos moleculares que relacionam a hiperglicemia à ativação de processos pró-aterogênicos não estão totalmente elucidados. No entanto, a modificação de proteínas plasmáticas e teciduais por glicação avançada está diretamente associada ao dano vascular no DM (Brownlee, 2001). O comprometimento do efluxo de colesterol, frente ao insulto glicoxidativo, contribui para o acúmulo de lípidos celulares (Xue et al., 2010), uma vez que a redução do conteúdo de ABCA-1 em macrófagos reduz a taxa de exportação do colesterol para aceptores plasmáticos, como as apo A-I, que medeiam o transporte reverso do colesterol.

No presente projeto, demonstrou-se que a exposição de macrófagos à albumina-AGE induziu a expressão da Grp78 e Grp94, de forma tempo-dependente. Estas chaperonas têm sua expressão aumentada em situações de estresse do RE, situação na qual atuam corrigindo o mau enovelamento das proteínas que chegam ao lúmen da organela. Sabendo-se, então, que o insulto glicoxidativo estimula o estresse do RE, avaliou-se a ativação das vias da UPR. O tratamento com albumina-AGE induziu a fosforilação da porção α da eIF2, o que sugere diminuição da fosforilação em suas demais subunidades, β e γ . Estas ativam o complexo eIF2, que reconhece e transfere Met-RNAt para a subunidade 40S dos ribossomas, iniciando a

tradução das proteínas. Desta forma, a albumina-AGE reduziu a taxa de tradução global de novas proteínas por meio da fosforilação do eIF2 α , proteína cuja sinalização inicia-se pela ativação da PERK. Embora a expressão deste fator pareça diminuir em incubações mais prolongadas (18 h), ela ainda foi bastante superior àquela observada na situação controle.

Em contrapartida, a ativação da eIF2 α induz a tradução seletiva de mRNA específicos. O ATF4 é um fator de transcrição seletivamente estimulado pela fosforilação da eIF2 α , exercendo papel fundamental no controle da transcrição, induzida pela ativação da PERK. A tradução do ATF4 tem como alvo genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e na defesa antioxidante, em primeira instância.

Embora o ATF4 esteja envolvido em vias de sobrevivência da UPR, sua ativação pode também suscitar vias pró-apoptóticas, promovidas pela ativação da CHOP. No entanto, a expressão da CHOP, ao longo do tempo de exposição dos macrófagos à albumina-AGE, não variou e, ensaios com anexina V, não evidenciaram apoptose de macrófagos tratados com albumina-AGE (dados não mostrados).

O perfil de expressão do ATF6 foi semelhante ao dos demais efetores da UPR. Seu efeito envolve a ativação de vias de recuperação celular, como a expressão das chaperonas Grp78 e Grp94, além de genes da ERAD (degradação proteica associada ao RE), responsáveis pelo clareamento de peptídeos mal formados, por meio de seu direcionamento ao sistema proteasomal. O mecanismo de ativação do ATF6 é semelhante ao da

SREBP, e a intersecção destas duas vias pode acarretar prejuízo no fino controle da concentração de colesterol intracelular. De fato, Werstuck et al. (2001) demonstraram que o estresse do RE, induzido pela homocisteína, ativa a SREBP-1 em hepatócitos, células endoteliais e musculares lisas, sendo este efeito independente da ação de caspases, as quais têm conhecido potencial de ativar o SREBP-1 em condições fisiológicas (Ye *et al.*, 2000).

O acúmulo de colesterol celular, o desbalanço redox e o insulto inflamatório, decorrentes da hiperglicemia, suscitam vias do estresse do RE em diversos modelos experimentais (Hotamisligil, 2006; Hosoi & Ozawa, 2009). Embora o efeito direto dos AGE sobre o estresse do RE ainda não tenha sido descrito em macrófagos, Chen et al. (2008) demonstraram, em podócitos de lesões nefróticas tardias, a indução do estresse do RE em células tratadas com albumina AGE, o que se associa à maior taxa de apoptose. Os autores ainda descrevem o efeito do ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA), um ácido biliar hidrofílico, que, à semelhança do PBA, aumenta a capacidade adaptativa do RE, prevenindo a apoptose de podócitos induzida pela albumina AGE e mediada pelo estresse do RE.

Chuang et al. (2007) descreveram, também em podócitos, a indução de apoptose, graças à interação de albuminas modificadas por AGE com seu receptor RAGE em estágios precoces da nefropatia diabética. Este efeito foi dose-dependente e vinculado ao desbalanço redox celular. A perda da massa de podócitos é descrita como um indicador de estágios avançados

de proteinúria e glomeruloesclerose, componentes centrais da progressão das doenças renais crônicas.

Zhou et al. (2005) observaram ativação de vias da UPR em macrófagos e células musculares lisas de diferentes estágios da lesão aterosclerótica de camundongos deficientes para apo E, como consequência da hipercolesterolemia severa vigente neste modelo experimental. Feng et al. (2003) demonstraram que o RE é, de fato, o sítio celular onde o colesterol exerce seu efeito citotóxico, já que bloqueando seletivamente o tráfego de lípidos para esta organela, preveniu-se a ativação do estresse do RE e, consequentemente, os eventos apoptóticos. Marcadores de estresse do RE - Grp78 e CHOP - foram evidenciados em cortes de artérias humanas, tipicamente em áreas de lesão aterosclerótica mais sensíveis à ruptura. Este achado correlacionou-se com o maior conteúdo de colesterol, em especial 7-cetocolesterol, em macrófagos, os quais parecem ser sinalizadores iniciais de apoptose (Myoishi et al., 2007; Palozza et al., 2009). Dados recentes do nosso grupo demonstraram que macrófagos tratados com glicolaldeído apresentaram acúmulo de esteróis totais e, particularmente, 7-cetocolesterol. Este evento ocorreu mesmo na presença de HDL e agonista sintético de LXR e foi consequência da redução do conteúdo celular de ABCA-1 e ABCG-1 (Iborra et al., 2011).

Em suma, estudos que descrevem a ativação de estresse do RE em macrófagos comumente abordam seus efeitos apoptóticos, sendo estes relacionados à estabilidade da lesão aterosclerótica (Dickhout et al., 2009; Seimon & Tabas, 2009; Tabas, 2009; Hotamisligil, 2010; Tabas & Ron, 2011;

Scull & Tabas, 2011). No entanto, dados acerca da ativação do estresse do RE em macrófagos da lesão precoce, onde não há acúmulo de colesterol livre, são escassos, e tais informações seriam de grande valia para que a intervenção terapêutica ocorra ainda em etapas iniciais da aterosclerose. Neste contexto, a formação de AGE, pode ser considerado um estímulo à indução do estresse do RE em indivíduos diabéticos, o que poderia explicar o comprometimento na expressão do ABCA-1 sob condições glicoxidativas. De fato, a associação entre estresse do RE e redução de ABCA-1 foi fortalecida pelos achados com tunicamicina - indutor clássico de estresse de RE - que também diminuiu o conteúdo do transportador e seu efeito biológico.

A ativação de vias da UPR frente a estímulos metabólicos, como o acúmulo de glicosamina e a própria hiperglicemia, que antecede a sobrecarga celular de colesterol não-esterificado, tem sido demonstrada em modelos animais experimentais. Khan et al. (2009) evidenciaram que a hiperglicemia acelera o desenvolvimento de aterosclerose em camundongos hiperlipidêmicos, em associação ao aumento dos marcadores de estresse do RE (PERK e proteínas com sequência KDEL), o que precedeu a piora no perfil lipídico. Estes resultados reforçam o elo entre as altas concentrações de glicose e prejuízo na função do RE, independentemente de flutuações no conteúdo lipídico celular.

Estudo recente de nosso laboratório evidenciou maior geração de EROs em macrófagos incubados na presença da albumina-AGE, efeito resultante de vias mitocondriais e do sistema NADPH oxidase. Interessante

notar que a incubação com aminoguanidina, composto antioxidante e anti-AGE, foi capaz de reduzir a geração de EROs e prevenir a queda no conteúdo de ABCA-1 (De Souza et al., 2012). Dados preliminares do presente estudo evidenciaram que a incubação na presença de aminoguanidina e N-acetilcisteína, reduz a expressão de Grp78 em macrófagos expostos à albumina-AGE. Sendo assim, o estresse do RE é, provavelmente, o fenômeno que une o desbalanço redox à redução do conteúdo proteico de ABCA-1 em macrófagos sob o estresse glicoxidativo, especialmente em função do importante papel do RE na síntese/estabilidade de proteínas recém-formadas.

Embora Janiszewski et al. (2005) tenham descrito o papel da PDI na regulação redox da NADPH oxidase em células musculares lisas, não observou-se, no presente estudo, alteração na expressão da PDI, em nenhum dos tempos de exposição dos macrófagos à albumina-AGE. A aferição de sistemas antioxidantes celulares seria de grande valia para determinar se o estresse oxidativo, suscitado na presença da albumina-AGE, estaria sendo contrabalanceado pela maior ação de agentes redutores, o que poderia ser responsável pela manutenção das concentrações basais da PDI.

A ERAD conta com a participação de chaperonas citosólicas, como a Hsp70 (proteína de choque térmico 70) e a Hsp90 (proteína de choque térmico 90), as quais se ligam à cadeia polipeptídica facilitando sua ubiquitinação e direcionamento ao proteasoma (Kario et al., 2011). Este é

um importante mecanismo de controle de qualidade da síntese proteica (Hrizo et al., 2007).

No presente projeto, macrófagos expostos à albumina-AGE e albumina-DM apresentaram aumento da expressão de ubiquitina, o que sugere inibição do sistema proteasomal. De fato, a inibição da degradação proteasomal, pelo MG132, não foi capaz de recuperar a expressão do ABCA-1 em macrófagos submetidos à glicoxidação. Neste sentido, Moheimani et al. (2010) demonstraram redução da atividade de enzimas proteasomais em macrófagos tratados com albumina-AGE (albumina modificada com glicolaldeído, à semelhança da utilizada no presente estudo), evidenciando efeito deletério dos AGE sobre o acúmulo intracelular de proteínas mal enoveladas, o que, segundo os autores é um potencial elo entre DM e aterosclerose. No entanto, a concentração de albumina utilizada por aqueles autores foi bastante superior à utilizada no presente estudo.

Finalmente, a albumina-AGE aumenta a geração de EROs também devido ao prejuízo na função mitocondrial (de Souza Pinto et al, 2012) o que igualmente pode contribuir para disfunção do sistema proteasoma-ubiquitina, considerando-se a alta demanda energética necessária para seu funcionamento. Juntamente com a observação de que o MG132 não recuperou o conteúdo de ABCA-1, assume-se que a albumina-AGE tenha alterado previamente a função proteasomal, o que nos leva a excluir o papel da ERAD na redução do ABCA-1 em macrófagos.

Zelcer et al. (2009), analisando o mecanismo de degradação do receptor de LDL (receptor B-E), induzido por LXR, evidenciaram que a

ativação de LXR induz a síntese da proteína Idol (*Inducible degrader of LDL receptor*). Esta proteína aumenta a degradação intracelular do receptor B-E. A inativação do sistema proteasomal, por meio da utilização de MG132, não foi capaz de prevenir a diminuição no conteúdo do receptor B-E, descartando, à semelhança de nossos achados, a ação do proteasoma. De modo análogo ao receptor B-E, o ABCA-1, após ser sintetizado, sofre suas modificações co- e pós-traducionais e é exportado para a membrana plasmática dentro de vesículas, o que talvez impeça sua exposição ao proteasoma (Boadu & Francis, 2006; Neufeld et al., 2001). No mesmo trabalho, que aborda a degradação do receptor B-E, a inibição da atividade lisossomal, com cloreto de amônia, impediu a degradação do receptor B-E, induzida por agonistas de LXR. Neste aspecto, investigações posteriores acerca do controle do conteúdo final de ABCA-1 por autofagia seriam interessantes. Além do mais, o conteúdo de ABCA-1 é finamente regulado por calpaínas de superfície, o que também não foi avaliado no presente estudo, mas pode também ser modulado pela albumina-AGE.

A administração de chaperonas exógenas promove a modulação da função biológica do RE. O PBA, em especial, é um ácido graxo de cadeia curta e baixo peso molecular, que atua como uma chaperona química, apresentando ações na assistência e estabilização não seletivas dos peptídios nativos (Engin & Hotamisligil, 2010). Estudos em modelos animais de obesidade e DM revelam que ao atenuar o estresse do RE, o uso do PBA normalizou a glicemia, restaurou a sensibilidade à insulina sistêmica, reverteu o quadro de esteatose hepática e aumentou a ação da insulina no

fígado, músculo e tecido adiposo (Ozcan et al., 2006). No contexto da aterosclerose, comundongos *knockout* para apo E, caracteristicamente hipercolesterolêmicos, ao receberem administrações de PBA, apresentaram uma redução dose-dependente na lesão aterosclerótica, em função da atenuação do estresse do RE em macrófagos arteriais (Erbay et al., 2009). É possível que a incubação com PBA, por promover o enovelamento adequado de proteínas e melhorar a organização estrutural do RE, permita que o ABCA-1 - prejudicado na presença da albumina-AGE - seja corretamente sintetizado e transportado para a membrana plasmática, onde promove a adequada exportação do excesso do colesterol.

O uso clínico do PBA é aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão americano que aprova novos fármacos para uso em humanos. No entanto, o uso do PBA é liberado principalmente para uso em disfunções no ciclo da ureia, já que esta chaperona é capaz de impedir a agregação de polipeptídios e a excreção de nitrogênio (Kubota et al., 2006). O uso do PBA ainda é potencialmente considerado em outros contextos; sua administração parece beneficiar doenças como talassemia, câncer, fibrose cística, até doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, uma vez que este composto atravessa a barreira hemato-encefálica (Engin & Hotamsligil, 2010). No entanto, é importante salientar que quando se trata de moléculas de amplo espectro de ação como o PBA, é necessária certa cautela, já que estas podem promover efeitos pleiotrópicos indesejáveis.

A redução da expressão da Grp78 frente ao tratamento com PBA confirma o efeito inibitório deste composto sobre o estresse do RE e permite

reiterar a associação entre o estresse da organela e o conteúdo de ABCA-1, o qual foi restaurado pelo PBA. Além disso, este efeito é, de fato, confirmado pelo ensaio funcional do ABCA-1, o efluxo de colesterol. A incubação com albumina-AGE reduz a taxa de remoção de colesterol mediada pela apo A-I, e quando PBA é adicionado à cultura este efeito é revertido.

As alterações no fluxo de lípidos em macrófagos tratados com albumina glicada *in vitro*, assemelham-se àquelas obtidas com o uso de albumina isolada de portadores de DM com controle glicêmico inadequado (Machado-Lima, 2009). No entanto, é possível que os mecanismos intracelulares elicitados sejam de magnitude diferente, frente ao intenso grau de modificação que é obtido pela glicação *in vitro* da albumina.

Ambas as albuminas AGE, produzidas *in vitro*, ou isoladas de diabéticos, convergiram para a expressão de proteínas relacionadas ao estresse do RE e desbalanço redox, embora sem estreito paralelismo. As albumina-DM1 e DM2 afetaram minimamente a expressão de marcadores clássicos do estresse do RE. Não obstante, o tratamento com as albuminas glicadas *in vivo* elevou a expressão da PDI e calreticulina, proteínas residentes do RE com ações de chaperona. Estes achados evidenciam que a albumina-AGE, preparada *in vitro*, é uma ótima ferramenta para o estudo da fisiopatologia das complicações do diabetes melito.

O aumento na expressão da PDI, observada na presença da albumina-DM1, sugere desequilíbrio redox, embora dados sobre a geração de EROs nestas condições ainda não sejam conclusivos. Já o aumento da

expressão da calreticulina pode ser atribuído a um desequilíbrio nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , o que sabidamente interfere com a homeostase da maquinaria secretora do RE, considerando que a biodisponibilidade de Ca^{2+} citoplasmática atua na sinalização de diversos processos celulares, tais como exocitose, contração, transcrição e proliferação (Coe & Michala, 2009).

Até o momento constatamos que a disfunção do RE, em macrófagos tratados com albumina-AGE, relaciona-se ao prejuízo na exportação de colesterol para as apo A-I, efeito também evidenciado com incubações com albuminas-DM. Estes dados sugerem que o estresse do RE pode ser um dos eventos iniciais da aterogênese suscitado pelos AGE. Neste sentido, extrapolando nossos dados, podemos sugerir que indivíduos com hiperglicemia vigente (sem diabetes ou dislipidemia estabelecidas), já sofrem consequências da formação de AGE, sendo uma delas a perda da expressão do ABCA-1, mediada por perturbações na homeostase do RE. Além disso, os resultados obtidos com albuminas-DM, isoladas de portadores de diabetes melito, fortalecem a ideia de que a modificação *in vivo* da albumina é, de fato, capaz de prejudicar a homeostase de lípidos em macrófagos, independentemente de alteração na composição e concentração de HDL.

Este estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito da albumina-AGE sobre a indução do estresse do RE, o qual está associado à redução do conteúdo de ABCA-1 no diabetes melito. Vale ressaltar que é possível que o estresse do RE suscitado pela glicação avançada seja consequência de uma

série de desarranjos intracelulares, envolvendo desbalanço redox, acúmulo de colesterol e óxidos de colesterol, disfunção mitocondrial, com alteração no estado energético celular e inflamação. A íntima conexão entre todos os eventos no processo de aterosclerose torna difícil a extrapolação da importância isolada de cada um deles na gênese do estresse do RE e modelos experimentais específicos em cultura celular ajudarão no melhor detalhamento.

6. CONCLUSÃO

Albumina modificada, *in vivo* e *in vitro*, por glicação avançada induz o estresse do retículo endoplasmático, o que se relaciona à redução do conteúdo de ABCA-1 e ao prejuízo no transporte reverso de colesterol. Este fenômeno endossa o efeito adverso do estresse do RE na aterosclerose. Neste sentido, chaperonas químicas, que aliviam o estresse do RE, podem ser ferramentas úteis na prevenção e tratamento da aterosclerose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed KA., Muniandy S, Ismail IS. N-(carboximethyl)lysine and coronary atherosclerosis-associated low density lipoprotein abnormalities in type 2 diabetes: current status. *J Clin Biochem Nutr.* 2009; 44(1):14-27.

Ahmed N, Thornalley, PJ. Advanced glycation endproduct: what is their relevance to diabetic complications. *Diabetes Obes & Metab.* 2007; 9(3):233-245.

Appenzeller-Herzog C, ELLGAARD L. Human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(4):535-548.

Arakawa R, Yokoyama S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem.* 2002; 277(25):22426-22429.

Arakawa R, Tsujita M, Iwamoto N, Ito-ohsumi C, Lu R, Wu, CA, Shimizu, K, Aotsuka, T, Abe-dohmae, S, Yokoyama, S. Pharmacological inhibition of ABCA1 degradation increases HDL biogenesis and exhibits antiatherogenesis. *J Lipid Res.* 2009; 50(11):2299-305.

Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Rad Biol & Med.* 2000; 28:1708-1716.

Beers MF, Hawkins A, Shuman H, Maguire JA, Ding W, Mulugeta, S. A novel conserved targeting motif found in ABCA transporters mediates trafficking to early post-Golgi compartments. *J Lipid Res.* 2011; 52(8):1471-1482.

Bisoendial RJ, Hovingh GK, Levels JH, Lerch PG, Andresen I, Hayden MR, Kastelein JJ, Stroes ES. Restoration of endothelial function by increasing high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation*. 2003; 107(23):2944-2948.

Boadu E, Francis, GA. The role of vesicular transport in ABCA-1-dependent efflux and its connection with NPC pathways. *J Mol Med*. 2006; 84:266-275.

Boadu E, Nelson RC, Francis GA. ABCA-1-dependent mobilization of lysosomal cholesterol requires functional Niemann-Pick C2 but not Niemann-Pick C1 protein. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821(3):396-404.

Bornfeldt KE, Tabas I. Insulin Resistance, hyperglycemia and atherosclerosis. *Cell Metabol*. 2011; 14(5):575-585.

Brown BE, Rashid I, Van Revk 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. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res*. 2009; 50(Suppl): S15–S27.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature*. 2001; 414:813-820.

Chade AR, Xiangyang Z, Krier JD, Lerman A. Effects of proteasome inhibition on the kidney in experimental hypercholesterolemia. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:1005-1012.

Chambenoit O, Hamon Y, Marguet D, Rigneault H, Rosseneu M, Chimini G. Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem*. 2001; 276(13):9955-9960.

Chen Y, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Lu YB, Fang L, Yang JW, Liu C. Effect of taurine-conjugated ursodeoxycholic acid on endoplasmic reticulum stress and apoptosis induced by advanced glycation end products in cultured mouse podocytes. *Am J Nephrol*. 2008; 28(6):1014-1022.

Chuang PY, Yu Q, Fang W, Uribarri J, He JC. Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor. *Kidney Int*. 2007; 72(8):965-976.

Coe H, Michalak M. Calcium binding chaperones of endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophys*. 2009; 28:F96-F103.

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

Demasi M, Laurindo FR. Physiological and pathological role of the ubiquitin-proteasome system in the vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res*. 2012. [Epub ahead of print].

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

Devries-seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, Flavell R, Tabas I. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol*. 2006; 171(1):61-73.

Dickhout JG, Colgan SM, Lhotak S, Austin RC. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome: a balancing act between plaque stability and rupture. *Circulation*. 2007; 116:1214-1216.

Engin F, Hotamisligil GS. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: an emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12(2):108-115.

Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski LM, Charles, KN, Snotow ME, Fazio S, Wiest MM, Watkins SM, Linton MF, Hotamisligil, GS. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med*. 2009; 15(12):1393-1391.

Feng B, Tabas I. ABCA1-mediated cholesterol efflux in free cholesterol-loaded macrophages. Mechanism involves enhanced ABCA1 degradation in a process requiring full NPC1 activity. *J Biol Chem*. 2002; 277(45):43271-43280.

Feng B, Yao PM, Devlin, CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, TABAS I. The endoplasmatic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature Cell Biol.* 2003; 5(9):781-792.

Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI, Freeman MW. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004; 45(2):287-294.

Goldstein, J. L., Brown, M. S. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(4):431-438.

Zhao GJ, Yin K, Tang CK. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol Med.* 2012; 18(1):149-158.

Haffner, SM. The metabolic syndrome: inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006; 97(2A):3A-11A.

Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem.* 1997; 272(34):21654-21659.

Harding, HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, LU PD, Calfon M, SADRI N, Yun, C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, LEIDEN JM, Ron D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell.* 2003; 11(3):619-633.

Harja E, Bu DX, Hudson, BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu, Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(1):183-194.

Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, Thomas MC, Forbes JM, O'Brien R, Cooper ME, Chin-dunting JP, Sviridov D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia*. 2007; 50(8):1170-1179.

Hong M, Li M, Mao C, Lee AS. Endoplasmatic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. *J Cell Biochem*. 2004; 92:723-732.

Hosoi T, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 28;118(1):19-29.

Hotamisligil, GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006; 444(14):860-867.

Hotamisligil, GS Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*. 2010; 16(4):396-399.

Hozoji M, Munehira Y, Ikeda Y, Makishima M, Matsuo M, Kioda N, Uedakazumitsu. Direct Interaction on nuclear liver X receptor β with ABCA-1 modulates cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2008; 283(44):30058-30063.

Hrizo SL, Gusarova V, Habiels DM, Goeckeler JL, Fisher EA, Brodsky JL. The Hsp110 molecular chaperone stabilizes apolipoprotein B from endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). *J Biol Chem.* 2007; 282(45):32665-36275.

Iborra RTI, Machado-Lima A, Castilho G, Nunes VS, Abdalla DS, Nakandakare ER, Passarelli M. Advanced glycation in macrophages induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol and total sterols by decreasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1. *Lipids Health Dis.* 2011; 10:172.

Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(2):125-138.

Isoda K, Folco, EJ, Shimizu K, Libby P. AGE-BSA decreases ABCG-1 expression and reduces macrophage cholesterol efflux to HDL. *Atherosclerosis.* 2007; 192(2):298-304.

Ito, J., Nakayasu, Y., Yokoyama, S. Cholesterol apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2000; 41(6):894-904.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, Laurindo FR. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005; 280(49):40813-40819.

Kario E, Amar N, Elazar Z, Navon A. A new autophagy-related checkpoint in the degradation of an ERAD-M target. *J Biol Chem.* 2011; 286(13):11479-11491.

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):709-715.

Khan MI, Pichna BA, Shi Y, Bowes AJ, Werstuck GH. Evidence supporting a role for endoplasmic reticulum stress in the development of atherosclerosis in a hyperglycaemic mouse model. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(9):2289-2298.

Kim I, Xu W, Reed JC. Cells death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutics opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7:1013-1030.

Kincaid MM, Cooper AA. ERADicate ER stress or die trying. *Antioxid Redox Signal.* 2007; 9(12):2373-2387.

Klein RL, Lamins M, Lopes-virella MF. Isolation, characterization, and metabolism of the glycosylated and nonglycosylated subfractions of low-density lipoproteins isolated from type I diabetic patients and nondiabetic subjects. *Diabetes.* 1995; 44(9):1093-1098.

Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, Uehara T, Hosoi T, Nomura Y. Suppressive effect of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem.* 2006; 97(5):1259-1268.

Kumeda Y, Inaba M, Shoji S, Ishimura E, Inariba H, Yabe S, Okamura M, Nishizawa Y. Significant correlation of glycosylated albumin, but not glycosylated

haemoglobin, with arterial stiffening in haemodialysis patients with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69(4):556-61.

Laurindo FR, Pescatore LA, De Castro Fernandes D. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(9):1954-1969.

Lee AH, Glimcher LH. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(17):2835-2850.

Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*. 2002; 16(4):452-466.

Li Y, Schwabe RF, Devires-seimon T, Yao PM, Gerbod-giannone MC, Tall AR, Davis RJ, Flavell R, Brenner DA, Tabas I. Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor- α and interleukin-6. *J Biol Chem*. 2005; 280(23):21763-21772.

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 lípidos em macrófagos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.

Lionetti L, Mollica MP, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009; 19(2):146-152.

Lorkowski, S. The in and outs of lipid efflux. *J Mol Med.* 2008; 86(2):129-134.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-275.

Lu C, He JC, Cai W, Zhu L, Vlassara, H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101(32):11767-11772.

Lu R, Arakawa R, Ito-osumi C, Iwamoto N, Yokoyama S. ApoA-I facilitates ABCA1 recycle/accumulation and increases HDL generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(10):1820-1824.

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

Machado-lima A, Pinto RS, Holanda C, Iborra R, Nakandakare ER, Corrêa-Giannella M, Passarelli M. In vivo glycated albumin impairs the removal of cholesterol inducing lipid accumulation in macrophages. *Atherosclerosis Supplement.* 2009; 10(2):P1133.

Martinez LO, Agerholm-larsen B, Wang N, Chen W, Tall AR. Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. *J Biol Chem.* 2003; 278(39):37368-37374.

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.

Matsuki K, Tamasawa N, Yamashita M, Tanabe J, Murakami H, Matsui J, Imaizumi T, Satoh K, Suda T. Meformin restores impaired HDL-mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis*. 2009; 206(2):434-438.

Mentink CJ, Kilhovd BK, Rondas-Colbers GJ, Torjensen, P.A., Wolffenbuttel B.H. Time course of specific AGEs during optimized glycaemic control in type 2 diabetes. *Neth J Med*. 2006; 64(1):10-16.

Moheimani F, Morgan PE, Van Reyk DM, Davies MJ. Deleterious effects of reactive aldehydes and glycated proteins on macrophage proteasomal function: possible links between diabetes and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802(6):561-71.

Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Paillat M, Machizuki N, Kitazake M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circ Res*. 2007; 116:1226-1233.

Namba T, Tomoaki I, Ken-ichiro T, Tatsuya H, Mizushima T. Transcriptional activation of ATF6 by endoplasmic reticulum stressors. *Biochem Biophys Res Comm*. 2007; 355:543-548.

Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K. Role of disulfide bridges formed in the luminal domains of ATF6 in sensing endoplasmatic reticulum stress. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(3):1027-1043.

Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Comly Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamaria-Fojo S, Brewer HB. Cellular localization and trafficking of the human ABCA-1 transpoter. *J Biol Chem*. 2001; 276(29):27584-27590.

Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM*. 2005; 98(12):845-856.

Ohkawara E, Nohara Y, Kanno Y, Suzuki H, Matsumoto G, Kinoshita T, Watanabe. Fructosamine assay using albumin extracted from serum. *Biol Pharm Bull*. 2002; 25(9):1121-1124.

Oram JF. Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol Med*. 2002; 8(4):168-173.

Oram JF, Vaughan AM, ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2006; 99:1031-1043.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004; 306(5695):457-461.

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006; 311(5790):1137-1140.

Palozza P, Simone R, Catalano A, Boninsegna A, Böhm V, Fröhlich K, Mele MC, Monego G, Ranelletti FO. Lycopene prevents 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis in human macrophages. *J Nutr Biochem*. 2009; 21(1):34-46.

Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproduct. *Nat Med*. 1998; 4(9):1025-1031.

Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Morton RE, Shimabukuro AF, Quintão 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 AF, Catanozi S, Nakandakare ER, Rocha JC, Carrilho AJ, Quintão EC. Diminished rate of peritoneal macrophage cholesterol efflux is not related to the degree of HDL glycation in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta*. 2000; 301(1-2):119-134.

Passarelli M, Tang C, McDonald T, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA-1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes*. 2005; 54, 2198-2205.

Pinto RS, Paim BA, Machado AP, Inada N, Nakandakare ER, Vercesi A, Passarelli M. Reduced ABCA-1 expression in macrophages submitted to glycooxidation 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.

Rachiduni 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; 48:139-143.

Ramasamy R, Vanucci 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.

Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM, Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Ann NY Acad Sci*. 2011; 1243:88-102.

Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequence and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1996; 21:267-271.

Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science*. 2009; 324(5932):1284-1287.

Ron D, Hampton RY. Membrane biogenesis and the unfolded protein response. *J Cell Biol*. 2004; 167(1):23-25.

Ron, D., Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(7):519-529.

Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH,

Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012; 125(15):1905-1919.

Scull CM, Tabas I. Mechanisms of ER stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31(12):2792-2797.

Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009; 50:S382-387.

Sekiya M, Osuga J, Igarashi M, Okasaki H, Ishibashi S. The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophages foam cells. *J Atheroscler Thromb*. 2011; 18(5):359-364.

Shao B, Fu X, McDonald TO, Green PS, Uchida K, O'Brien KD, Oram JF, Heinecke JW. Acrolein impairs ATP binding transporter A1-dependent cholesterol export from cells through site-specific modification of apolipoprotein A-I. *J Biol Chem*. 2005; 280(43):36386-36396.

Singaraja RR, Visscher H, James ER, Chroni A, Coutinho JM, Brunham LR, Kang MH, Zannis VI, Chimini G, Hayden MR. Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. *Circ Res*. 2006; 99(4):389-397.

Soumian S, Albrecht C, Davies AH, Gibbs RGJ. ABCA1 and atherosclerosis. *Vasc Med*. 2005; 10:109-119.

Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(16):6519-6526.

Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25(11):2255-64.

Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and on the role of endoplasmic reticulum stress. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(9):2333-2339.

Tabas I, Ron D. Intergrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(3):184-190.

Tang C, Vaughan AM, Anantharamaiah GM, Oram JF. Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA-1. *J Lipid Res*. 2006; 47(1):104-114.

Tang C, Oram JF. The cholesterol exporter ABCA-1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1791(7):563-572.

Teasdale RD, Jackson MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996, 12:27-54.

Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophage: An elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev.* 2007; 28(4):483-544.

Uribarri J, Peppas M, Cai W, Goldberg T, Lu M, He C, Vlassara H. Restriction of dietary glycotoxins reduces excessive advanced glycation end products in renal failure patients. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(3):728-731.

Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuletich S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp RH, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao XQ, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram JF, Heinecke JW. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in anti-inflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007; 117(3):746-756.

Van der kallen CJ, Van greevenbroek MM, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver. *Apoptosis.* 2009; 14(12):1424-1434.

Vattem KM, Wek RC. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(31):11269-11274.

Xue JH, Yuan Z, Wu Y, Liu Y, Zhao Y, Zhang WP, Tian YL, Liu WM, Liu Y, Kishimoto C. High glucose promotes intracellular lipid accumulation in vascular smooth muscle cells by impairing cholesterol influx and efflux balance. *Cardiovasc Res.* 2010; 86(1):141-150.

Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The receptor for advanced glycation endproduct (RAGE) and cardiovascular disease. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 12;11:e9.

Yancey PG, Jerome WG, Yu H, Griffin EE, Cox BE, Babaev VR, Fazio S, Linton MF. Severely altered cholesterol homeostasis in macrophages lacking apoE and SR-BI. *J Lipid Res*. 2007; 48(5):1140-1149.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. 2000; 6(6):1355-1364.

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.

Wellington, CL. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest*. 2002; 82:273-283.

Wendt T, Harja E, Bucciarelli L, Qu W, Lu Y, Rong LL, Jenkins DG, Stein G, Schmidt AM, Yan SF. RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model off type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2006; 185(1):70-77.

Werstuck GH, Lentz SR, Daval S, Hossain GS, Sood SK, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest*. 2001; 107(10):1263-1273.

Werstuck GH, Khan MI, Femia G, Kim AJ, Tedesco V, Trigatti B, SHI Y. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum dysfunction is associated with accelerated atherosclerosis in a hyperglycemic mouse model. *Diabetes*. 2006; 55(1):93-101.

Zelcer K, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science*. 2009; 325(5936):100-104.

Zhang K, Kaufman RJ. Unfolding the toxicity of cholesterol. *Nature Cell Biol*. 2003; 5(9):769-770.

Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008; 454(7203):455-62.

Zhou J, Lhoták S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2005; 111:1814-1821.

Zimmerman R, Panzeböck U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, Fritz G, Kostner GM, Zechner R. Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. *Diabetes*. 2001; 50(7):1643-53.

ANEXOS

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 25/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0424/08**, intitulado: **"GLICOXIDAÇÃO INTRACELULAR E ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO: EFEITOS POTENCIAIS SOBRE OS TRANSPORTADORES ABCA-1 E SOBRE O FLUXO DE LÍPIDES EM MACRÓFAGOS"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisadores Responsáveis : **Eder Carlos da Rocha Quintão / Marisa Passarelli**
Pesquisador (a) Executante: **Gabriela Castilho**

CAPPesq, 01 de Julho de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa