Monique de Fatima Mello Santana

**Enriquecimento da HDL em apolipoproteína A-IV favorece sua
funcionalidade na doença renal diabética**

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Prof^a. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2020

Monique de Fatima Mello Santana

**Enriquecimento da HDL em apolipoproteína A-IV favorece sua
funcionalidade na doença renal diabética**

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Prof^a. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Monique| de Fatima Mello
Enriquecimento da HDL em apolipoproteína A-IV
favorece sua funcionalidade na doença renal
diabética / Monique de Fatima Mello Santana. -- São
Paulo, 2020.
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Lipoproteínas
HDL 3.Insuficiência renal crônica 4.Proteômica
5.Apolipoproteína 6.Produtos finais de glicação
avançada 7.Nefropatias diabéticas

USP/FM/DBD-118/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe, Cintia, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, que sempre sonhou os meus sonhos junto comigo, me incentivando a fazer o que eu gosto, sempre me apoiando.

Dedico também às minhas irmãs, Júlia e Heloiza, por serem meu porto seguro e minha motivação para ser uma pessoa melhor todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre abençoar meus caminhos e minhas escolhas e por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida.

À minha família, por sempre abraçar minhas escolhas e me incentivar a ir em buscas dos meus sonhos. Em especial, minha mãe Cintia, que nunca desistiu de mim e cuidou e cuida de mim com muita dedicação e zelo, por me proporcionar sempre o melhor. Às minhas irmãs, Júlia e Heloiza, por serem a minha motivação diária e meu porto seguro. Ao meu pai, Antonio Carlos (*in memoriam*), por sempre mostrar que o estudo me levaria longe, para nunca desistir de estudar. Ao meu Padrasto Juarez e aos meus avós, aos meus tios e tias, aos meus primos e primas que sempre perguntam como está a minha pesquisa, por me ouvirem com tanto carinho e atenção quando comento sobre o que eu faço, minhas alegrias e minhas angústias. Obrigada por todo apoio, carinho, e amor que cada um de vocês me transmite.

À minha orientadora, Dra. Marisa Passarelli, por toda dedicação, por todo aprendizado, por ter confiado em mim desde o primeiro instante, por ser essa pessoa e profissional maravilhosa, que eu tenho como inspiração. Obrigada por cada oportunidade dada, por todas as vezes que me fez repetir palavras que não conseguia pronunciar corretamente, por todas explicações e conhecimento que adquiri nesse tempo. Me inspiro em você, na sua garra, sua determinação, a forma em que você é humana. Não tenho, de verdade, palavras para te agradecer; o quanto você é especial em minha vida e o quanto eu gosto de você

(Quando crescer quero ser igual a você). Estendo esse espaço para agradecer a Melzinha Passarelli por ser uma menina tão doce, dona de um abraço tão caloroso e de um sorriso sincero, me divirto contigo todas as vezes em que vai ao laboratório.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, por abrir as portas do laboratório para mim, e ser uma pessoa admirável, que sempre está lá para as melhores conversas, conselhos, risadas e ensinamentos. Por sempre confiar em mim e sempre ter uma palavra amiga para me acalmar ou mostrar que estou indo pelo caminho certo.

À Dra. Márcia Queiroz, por ser minha co-orientadora, por todo auxilio e dedicação na escolha dos pacientes para o projeto.

Ao Aécio Lira, por dividir seus pacientes, seu conhecimento na área clínica, por todas as risadas e momentos de desesperos divididos nessa etapa de nossas vidas. Obrigada amigo por dividir comigo cada angústia e cada alegria conquistada.

Ao Dr. Raphael de Souza Pinto, como a Marisa falou antes mesmo de nos conhecermos “vocês irão fazer uma boa dupla”, e é assim que eu me sinto quando estamos trabalhando juntos. Obrigada Rapha, por toda paciência que teve comigo, por me ouvir repassar mil vezes o protocolo e minhas contas, só para ter certeza que estava de fato tudo certo. Obrigada por cada experimento, conversa, conselho, puxões de orelha; obrigada por me acolher de uma forma muito especial e por deixar eu te mostrar que sempre tem um lado positivo nas coisas.

À Dra. Graziella Ronsein e à Amanda Ribeiro Martins da Silva, por todo auxílio e paciência ao me ensinar sobre o processo da proteômica da HDL, pela ajuda constante e infinitas explicações, sempre me respondendo com prontidão, atenção e carinho.

À Dra. Edna Nakandakare, por ser a minha “princesinha da Disney”, por toda ajuda, conversas, risadas, pelo pavê e receitas trocadas. Obrigada por sempre me receber com sorriso, por assistir infinitas vezes as minhas aulas e ser uma pessoa sucinta na hora de me ajudar a reduzir uma apresentação. Não se esqueça que Claudia e eu ainda iremos morar com a senhora.

Ao Dr. Éder Quintão, por suas palavras sábias, por todas reflexões e observações, por ser um exemplo de sempre buscar a aprender cada dia mais e por sempre compartilhar conosco todo o seu conhecimento.

À Dra. Adriana Machado, por sempre ser prestativa a ajudar e a resolver qualquer dúvida de como se fazer uma albumina glicada, e sempre responder a qualquer questionamento com o máximo de atenção possível, por sempre se preocupar comigo e com minha família. Dri, obrigada por ser uma pessoa tão iluminada e carinhosa, por sempre pensar positivo mesmo que pareça que o mundo esteja caindo sobre nós, você sempre tem uma palavra de incentivo, admiro muito isso em você.

À Dra. Lígia Okuda, por toda ajuda desde os meus primeiros dias no laboratório, por me mostrar como se monta uma aula, sempre revisando e mostrando sempre o que poderia melhorar. Pude te conhecer melhor quando fomos ao meu primeiro

congresso e pude conhecer uma pessoa maravilhosa, inteligente e que sempre está disposta a sanar qualquer dúvida com total disposição.

Ao Dr. Rodrigo Iborra, por sempre estar disposto a ajudar tanto nas coisas experimentais, quanto para qualquer problema que surge no laboratório. Por cada explicação de protocolos que só você entende mesmo, quer seja por telefonema, sempre muito atencioso e prestativo. Pelas brincadeiras, pegadinhas, risadas no laboratório e nas horas do almoço na copa. Uma pessoa de um coração gigante, de total admiração.

Ao Me. Guilherme Ferreira, Gui obrigada pela amizade que construímos, quantos desabafos... Inúmeros, né mesmo? Obrigada por permitir que eu fizesse parte do teu mestrado, nunca irei esquecer da confiança que me depositou. Obrigada pelos conselhos, explicações, amizade por ter dado luz na estatística que eu já havia me dado por vencida; você com toda sua sabedoria me mostrou uma saída e foi o que trouxe os resultados que um dia tinha idealizado. Continue sendo essa pessoa que sempre busca por mais conhecimento e sempre passa ele a diante.

À Dra. Karolline Santana, Karolzinha obrigada pela oportunidade que me deu mesmo me conhecendo pouco, mesmo que de longe sempre pergunta como estão as coisas e se coloca de prontidão a ajudar em qualquer coisa.

À Me. Paula Ramos Pinto, a Paulinha, obrigada por fazer parte de um dos momentos mais mágicos da minha vida, por toda cumplicidade, conselhos, risadas, momentos únicos em que já vivemos juntas, por todas conversas sobre diversos assuntos dos mais polêmicos aos mais bobos. Obrigada por permitir

conhecer uma outra Paulinha além dos trabalhos e de uma pancada de experimentos, dona de um gosto musical maravilhoso. Que venham mais experiências mágicas ao teu lado, e prometo sair mais com vocês. Porque sempre irei lembrar “gorditas e cansaditas” e “juntas together”.

À Claudia Souza, minha segunda mãe, obrigada Clau por, literalmente, ter me adotado, por ser uma pessoa que sempre está disposta a me ouvir, aconselhar, ajudar e sempre a me dar aquele abraço especial de sempre. Obrigada Clau por sempre vibrar a cada vitória minha, desde as mais pequenas como quando um Lowry dá certo, e por sempre me motivar a cada estatística e experimento que não sai da forma em que eu havia idealizado. Te amo e eu sou muito grata por ter a oportunidade de um dia ter te conhecido e ter sua amizade em minha vida.

À Fabiana Ferreira, a Fabi, quanto amor e carinho vejo em você. Tão companheira e guerreira. Obrigada Fabi, por me passar todo o seu conhecimento com tanta atenção e carinho. Obrigada por ser uma amiga, que já aconselhou, já riu, já chorou, e enxugou minhas lágrimas. Uma pessoa com uma sensibilidade tamanha, que mesmo longe sabe quando estou em um dos meus momentos de questionamento, e sempre com uma doçura me ouvir e me ajudar a entender os questionamentos da minha cabeça. Obrigada por ser sempre muito fofa comigo, por todas as séries indicadas que rende muitas discussões a respeito. Sua garra e seu companheirismo são admiráveis.

A Katia Souza, a minha amiga como eu gosto de você, obrigada por cada carinho, abraço, conversa, risadas, fotos de comidas gostosas e promessas de ir come-las, obrigada por ser um amor de possa em todos os momentos.

As minhas amigas veterinárias. Leticia Gomes, entramos no mesmo dia, compartilhamos experiências, dúvidas, risadas, saídas, cumplicidades, obrigada Le, por fazer parte de tudo isso do seu jeitinho único “não gosto dessas brincadeiras”. Vanessa Del Bianco, uma pessoa que tive admiração antes mesmo de conhecer pessoalmente, pela admiração com que o Sérgio falava de você para mim, e quando pude conhecer vi que de verdade era tudo isso mesmo, uma profissional maravilhosa, uma amiga encatadora, obrigada por todas as conversas, por sempre estar de prontidão e me ajudar em diversos casos. Ana Paula Bochi, como dou risada com você, todas as manhãs na hora da coleta de sangue dos animais são memoráveis, conversas, risos, o dia até se torna mais leve. Nunca esquecerei que me ajudou a estudar minha apresentação em inglês para o congresso; com toda sua atenção tentou me ajudar a fazer a melhor pronuncia. Obrigada Ana por todo carinho.

Ao Carlos Minanni, por sempre ser tão prestativo e disposto a ajudar, nunca tem tempo ruim, sempre atencioso a todas dicas e explicações.

À Mariana Ribeiro, por ser sempre doce com palavras de ânimo, por entrar em um mundo diferente junto comigo, o mundo da doença renal diabética, dos momentos de risadas e descobertas novas que compartilhamos juntas.

Ao Guilherme André, que com pouco tempo de convivência, tomou um lugar especial no meu coração, obrigada por fazer os dias se tornarem mais leves, com nossas cantorias, risadas, fofocas, desabafos, me vejo muito em você uma pessoa bem determinada naquilo que você realmente quer, continue assim você vai longe tenho certeza disso.

À Sayonara Assis, minha irmã gêmea de outra família, a pessoa do sotaque mais maravilhoso que eu pude conhecer, determinada e esforçada, um tanto quanto desesperada, mas isso que te deixa divertida, amei te conhecer e desenvolver contigo uma amizade, que mesmo com toda a distancia se faz muito presente todos os dias.

Aos amigos e funcionários do laboratório, Kelly Gomes, Elda Dantas, Valéria Sutti, Patricia Cazita, Ana Elise por sempre estarem presentes em toda minha jornada, sempre ajudando em experimentos, em dúvidas, auxiliando em todos os momentos, pelos momentos de discussões, de risadas, de descontração, pelo carinho que sinto vindo de cada uma de vocês. Por todos abraços e sorrisos, jamais esquecerei de cada elogio, cada dica que cada uma de vocês me deram.

À Rosibel Sileide da Silva, por ser uma pessoa divertida, mesmo nos momentos de broncas, tem um coração giganteste, por cada momento de cócegas e cada conversa, a cada momento em que me deu conselhos e sempre disposta a me ajudar nas coisas do laboratório.

Ao Rubens Silva por ser uma pessoa de um abraço tão caloroso. É só estarmos por perto que eu tenho certeza que é risada garantida; te conheci em um momento muito especial na minha vida, e te levarei para sempre. Como é bom ter pessoas como você por perto. Ah, e não posso esquecer que, com você, sempre temos uma foto garantida, no melhor ângulo e com as legendas mais engraçadas.

À Maria Aparecida, a Cida, sempre muito disposta e de prontidão para nós ajudarmos, sempre torcendo para que de tudo certo e auxiliando com muito carinho e atenção.

À Maria Isabela Sawaba, a Isa, como eu gostei de te conhecer, tão amorosa, sempre bem-disposta a me explicar o mundo do câncer de mama e da estatística. Obrigada por cada explicação, por cada conversa contando como é sua profissão, amo nossas conversas enquanto fazemos etiquetas para nossos tubos de congelamento.

Ao Antonio e ao Valer, do biotério, que sempre auxiliaram e explicaram cada cuidado que deveríamos ter com cada animal; sempre muito atenciosos e dedicados.

Ao Casseiro Meira, por ser um amigo para vida toda e por toda paciência que teve comigo ao me explicar como era feito a análise de estatística no Rstudio, por toda explicação em cada erro que o programa dava, e não pensar duas vezes em me ajudar. Obrigada por sempre ser tão prestativo e atencioso, e desculpa te fazer perder algumas horas ou até mesmo dias para me ajudar, mas o melhor de tudo é que conseguimos desvendar todos os erros juntos.

Ao Thiago H.H. Magina, por todo apoio nesse tempo em que entrou na minha vida, por toda dedicação em sempre me ouvir com tanto carinho e atenção. Por não deixar eu desanimar nem mesmo desistir dos meus planos e objetivos. Obrigada por sempre sonhar os meus sonhos junto comigo, e por ser um anjo que tenho na minha vida.

Aos meus amigos, Luana Brito, Tatiane Alcantara, Geane Souza, Livia Maekawa, Tatiana Carolina Quiteria, Rafaela Aparecida dos S. Severino Zelita Queiroz, Marcelo Antunes Karina Pereira, Lucas Gomes, por sempre, desde o meu último ano de faculdade, terem me incentivado a ir em busca do que eu queria, e a cada momento que fraquejei estavam lá para me levantar e ajudar. Por cada palavra de ânimo, por cada vitória comemorada junto comigo, e cada lágrima enxugada por cada um de vocês. Obrigada por tudo que cada um de vocês representa em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos 2015/21072-5; 2018/18545-4) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade”.

Paulo Freire

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Doença Renal Diabética (DRD): conceito e epidemiologia</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Classificação da doença renal crônica</i>	<i>2</i>
1.3. <i>Doença renal diabética (DRD) e risco cardiovascular</i>	<i>4</i>
1.4. <i>Transporte reverso de colesterol na Doença Renal Crônica.....</i>	<i>8</i>
1.5. <i>HDL na Doença Renal Crônica</i>	<i>11</i>
1.6. <i>Proteômica de HDL</i>	<i>13</i>
1.7. <i>Produtos de glicação avançada na Doença Renal Crônica</i>	<i>14</i>
1.8. <i>Carbamoilação na Doença Renal Crônica</i>	<i>19</i>
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO	23
3. OBJETIVO.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. <i>Casuística</i>	<i>25</i>
4.3. <i>Obtenção de lipoproteínas</i>	<i>26</i>

4.4.	<i>Acetilação de LDL</i>	26
4.5.	<i>Cultura de Macrófagos derivados de células da medula óssea de camundongos</i>	27
4.6.	<i>Efluxo de colesterol celular mediado por HDL</i>	28
4.7.	<i>Efeito inibitório da HDL sobre a oxidação das LDL in vitro</i>	28
4.8.	<i>Atividade anti-inflamatória da HDL</i>	28
4.9.	<i>Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-alfa)</i>	29
4.10.	<i>Quantificação de carboximetil-lisina (CML) no plasma</i>	29
4.11.	<i>Determinação de pentosidina e AGE totais na HDL</i>	30
4.12.	<i>Quantificação de carbamoilação na HDL</i>	30
4.13.	<i>Dosagem de Homocitrulina</i>	30
4.14.	<i>Proteômica da HDL</i>	31
4.14.1.	<i>Digestão proteolítica da HDL</i>	31
4.14.2.	<i>Análise proteômica direcionada</i>	32
4.14.3.	<i>Seleção de peptídeos da HDL para quantificação direcionada</i>	32
4.14.	<i>Análise estatística</i>	33
5.	RESULTADOS	34
5.1.	<i>Dados antropométricos e bioquímicos</i>	34
5.2.	<i>Proteômica da HDL</i>	38
5.3.	<i>Correlação da proteômica com taxa de excreção urinária de albumina</i>	41
5.4.	<i>Composição da partícula de HDL</i>	44
5.5.	<i>Correlação entre a composição das partículas de HDL e a TFG</i>	47
5.6.	<i>Determinação de pentosidina e AGE total na HDL</i>	48
5.7.	<i>Correlação entre o conteúdo de AGE total e pentosidina na HDL com a taxa de excreção urinária de albumina (EUA)</i>	50
5.8.	<i>Quantificação da carbamoilação da HDL</i>	51
5.9.	<i>Determinação do efluxo de ¹⁴C-colesterol de macrófagos mediado por HDL</i>	51
5.10.	<i>Determinação da atividade antioxidante da HDL</i>	52
5.11.	<i>Atividade anti-inflamatória da HDL</i>	54
6.	DISCUSSÃO	56

7.	CONCLUSÃO	69
8.	ANEXOS.....	70
8.1.	<i>Termo de consentimento livre e esclarecido</i>	<i>70</i>
8.2.	<i>Plataforma Brasil</i>	<i>73</i>
8.3.	<i>Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)</i>	<i>79</i>
9.	REFERÊNCIAS	80

LISTA DE ABREVIATURAS

¹⁴C: carbono 14

3-DG: 3-desoxiglucosona

A1: normoalbuminúria

A1AT: alfa- 1- antitripsina

A2: microalbuminúria

A3: macroalbuminúria

ABCA-1 (*ATP binding cassette transporter A-1*): transportador A1 contendo cassete de ligação ao ATP

ABCG-1 (*ATP binding cassette transporter G-1*): transportador G1 contendo cassete de ligação ao ATP

ACAT-1: acilcolesterol aciltransferase 1

AGE: produtos de glicação avançada

AGER1: receptor tipo 1 para produto de glicação avançada

ALEs: produtos avançados de lipoxidação

ALT: alanina aminotransferase

AMBP: proteína AMBP

Anti-CBL: anti- carbamil- lisina

apo (a): apolipoproteína (a)

apoA-I: apolipoproteína A-I

apoA-II: apolipoproteína A-II

apoA-IV: apolipoproteína A-IV

apoB: apolipoproteína B

apoC-I: apolipoproteína C-I

apoC-II: apolipoproteína C-II

apoC-III: apolipoproteína C-III

apoC-IV: apolipoproteína C-IV

apoD: apolipoproteína D

apoE: apolipoproteína E

apoF: apolipoproteína F

apoH: apolipoproteína H

apoL-1: apolipoproteína L-1

AST: aspartato aminotransferase

CAPPesq: Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

CAT: catalase

CE: colesterol esterificado

CEL: carboxietil- lisina

CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CL: colesterol livre

CLUS: cluesterina

CML: carboximetil- lisina

CO3: complemento C3

CT: colesterol total

CV: cardiovascular

CYTC: cistatina C

DAC: doença arterial coronariana

DCV: doença cardiovascular

DM: diabetes mellitus

DM1: diabetes mellitus tipo 1

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DRC: doença renal crônica

DRD: doença renal diabética

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

EUA: excreção urinária de albumina

FEEL-1 (*fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1*): fasciclina EGF, tipo lamina e receptor scavenger contendo um domínio tipo 1

GO: glioxal

HbA1c: hemoglobina glicada

HCFMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Hcit: homocitrulina

HD: hemodiálise

HDL: lipoproteína de densidade alta

HDLc: HDL colesterol

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

HPTR: proteína relacionada à haptoglobina

IDL: lipoproteína de densidade intermediária

IL-1: interleucina 1

IL-18: interleucina 18

IL-6: interleucina 6

KDIGO: *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDL: lipoproteína de densidade baixa

Lp(a): lipoproteína (a)

LRP: proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de densidade baixa

MGO: metilglioxal

NFkB: fator nuclear KB

NKF: *National Kidney Foundation*

PBS: solução tampão fosfato

PLTP: proteína de transferência de fosfolípidos

PMSF: fluoreto de fenil metila sulfonila

PON1: paraoxonase sérica aralisterase 1

PON3: paraoxonase sérica lactonase 3

QM: quilomícron

RAGE: receptor de produtos de glicação avançada

RBP4: proteína 4 de ligação ao retinol

ROS: espécies reativas de oxigênio

SAA1: proteína amiloide sérica A - 1

SAA4: proteína amiloide sérica A - 4

SDS: solução dodecil sulfato de sódio

SOD: superóxido dismutase

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

TBARS: substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TFG: taxa de filtração glomerular

TG: triglicérides

TLF-1: fator lítico 1 do tripanossoma

TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa

TRC: transporte reverso de colesterol

TTHY: proteína transiterretina

VLDL: lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transporte reverso de colesterol.....	9
Figura 2. Produtos de glicação avançada.....	15
Figura 3. Reação de carbamoilação	19
Figura 4. Proteômica da HDL	38
Figura 5. Correlação entre proteômica da HDL e taxa de excreção urinária de albumina (EUA)	39
Figura 6. Composição das partículas de HDL	42
Figura 7. Correlação entre a composição das partículas de HDL e a TFG	44
Figura 8. Determinação do conteúdo de AGE total e pentosidina na HDL	46
Figura 9. Correlação entre conteúdo de AGE total e pentosidina na HDL com taxa de excreção urinária de albumina (EUA).....	48
Figura 10. Carbamoilação da HDL	49
Figura 11. Efluxo de ¹⁴ C-colesterol de macrófago mediado por HDL	50
Figura 12. Determinação da atividade antioxidante da HDL	51
Figura 13. Atividade anti-inflamatória da HDL	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento e classificação da DRC.....	3
Tabela 2. Dados clínicos e antropométricos	32
Tabela 3. Medicamentos utilizados pelos indivíduos com DRD estratificados de acordo com TFG e a taxa de EUA e controles	34
Tabela 4. Proteoma de HDL.....	36

RESUMO

Santana MFM. **Enriquecimento da HDL em apolipoproteína A-IV favorece sua funcionalidade na doença renal diabética** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A doença renal diabética (DRD) está associada a distúrbios lipídicos que pioram a função renal e aumentam o risco cardiovascular (CV). O manejo da dislipidemia, hipertensão e outros fatores de risco tradicionais não impede completamente as complicações CV, trazendo à tona a participação de fatores de risco não-tradicionais, como produtos de glicação avançada (AGE), de carbamoilação e alterações no proteoma e na funcionalidade da HDL. Avaliou-se, no presente estudo, a composição da HDL, seu proteoma, modificação química por glicação e carbamoilação e sua funcionalidade em indivíduos com DRD não-dialítica, categorizados de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) e a taxa de excreção urinária de albumina (EUA) em controles não-diabéticos. Os indivíduos com DRD foram divididos em TFG > 60 mL / min / 1,73 m² + A1 (< 30 mg/g de creatinina) e A2 (30 - 300 mg/g de creatinina) (n = 10) e TFG <60 + A3 (> 300 mg/g de creatinina) (n = 25) e pareados por idade com indivíduos controles com TFG > 60; (n = 8). As HDL foram isoladas do plasma por ultracentrifugação e as dosagens bioquímicas de lípides realizadas por métodos enzimáticos; carboximetil- lisina (CML) e carbamoilação por ELISA. AGE total e pentosidina foram determinados por análise fluorimétrica. As HDL foram utilizadas para medir a remoção de ¹⁴C-colesterol de macrófagos; para inibição da oxidação de LDL, induzida por solução de sulfato de cobre e para modular a secreção de citocinas inflamatórias em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeos. A HDL do grupo TFG <60 + A3 apresentou maior concentração de AGE total, pentosidina e carbamoilação (1,2; 1,1 e 4,2 vezes, respectivamente) em comparação ao controle. O conteúdo de fosfolípides e apolipoproteína A-I da HDL foi menor neste grupo em comparação ao controle. A análise de proteômica direcionada quantificou 29 proteínas associadas à HDL em todos os grupos, embora apenas 2 tenham sido mais expressas no grupo TFG <60 + A3 em comparação aos controles: apolipoproteína D (apoD) e apoA-IV. Em comparação aos controles, o efluxo de ¹⁴C-colesterol de macrófagos, mediado por HDL, foi reduzido em 33% no grupo TFG <60 + A3, embora a HDL desse grupo tenha apresentado maior capacidade anti- inflamatória, refletida pela inibição (95 %) da secreção de IL-6 e TNF-alfa, em comparação ao grupo controle. O papel antioxidante do HDL, determinado pelo tempo de retardo na oxidação da LDL, foi semelhante entre os grupos. O enriquecimento em apoA-IV, que apresenta muitas ações antiaterogênicas, contribui para manutenção da funcionalidade da HDL, a despeito de sua modificação química por glicação avançada e carbamoilação e incremento em apoD que ocorre na DRD em função do aumento da EUA e redução da TFG.

Palavra chave: Diabetes mellitus; Lipoproteínas HDL; Insuficiência renal crônica; Proteômica; Apolipoproteína; Produtos finais de glicação avançada; Nefropatias diabéticas.

ABSTRACT

Santana MFM. HDL enrichment in **apo A-IV favours its functionality in diabetic kidney disease** [dissertação]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Diabetes mellitus kidney disease (DKD) is associated with lipid derangements worsening kidney function and enhancing cardiovascular (CV) risk. The management of dyslipidemia, hypertension and other traditional risk factors does not completely prevent CV complications bringing up the participation of untraditional risk factors such as advanced glycation (AGE), carbamoylation and changes in HDL proteome and functionality. In the present investigation it was analyzed HDL composition, proteome, chemical modification by advanced glycation and carbamoylation and functionality in non-dialytic DKD subjects categorized according to glomerular filtration rate (GFR) and urinary albumin excretion rate (AER). DKD individuals were divided in GFR>60 mL/min/1.73 m² plus AER stages A1 (< 30 mg/g creatinine) and A2 (30 - 300 mg/g creatinine) (n=10) and GFR<60 plus A3 (> 300 mg/g creatinine) (n=25) and control subjects matched by age with (GFR>60; n=8). HDL was isolated from plasma by ultracentrifugation and biochemical analysis performed by enzymatic techniques; carboxymethyllysine and carbamoylation by ELISA. Total AGE and pentosidine were determined by fluorimetry. HDL was utilized to measure ¹⁴C-cholesterol removal from macrophages, the inhibition of LDL oxidation induced by copper sulfate and the modulation of cytokines secretion by LPS-challenged macrophages. HDL from GFR<60+A3 presented higher levels of total AGE, pentosidine and carbamoylation (1.2, 1.1 and 4.2 times, respectively) in comparison to controls. The amount of phospholipids and apoA-I was reduced in this group as compared to control. Targeted proteomic analyses quantified 29 proteins associated with HDL in all groups, although only 2 were more expressed in GFR<60+A3 group in comparison to controls: apolipoprotein D (apoD) and apoA-IV. As compared to controls, the HDL-mediated cholesterol efflux from macrophages was 33% reduced in GFR<60+A3 although HDL from this group inhibited 95% the secretion of IL-6 and TNF- α . The antioxidant role of HDL (lag time for LDL oxidation) was similar among groups. The increment in apoA-IV that presents many antiatherogenic actions seems to counteract the HDL chemical modification by advanced glycation and carbamoylation and its increment in apoD that occurs in well-established DKD according to the increase in AER and reduction in GFR.

key words: Diabetes mellitus; Lipoproteins, HDL; Renal insufficiency, chronic; Proteomics; Apolipoproteins; Glycation end products, advanced; Diabetic nephropathies.

1. Introdução

1.1. Doença Renal Diabética (DRD): conceito e epidemiologia

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, ação deste hormônio, ou ambos. Constitui um grande problema de saúde pública com uma prevalência de 8,3% na população mundial. Para o ano de 2035, estima-se que cerca de 590 milhões de pessoas sejam afetadas por esta doença (IDF, 2019).

A hiperglicemia crônica é o principal fator contribuinte para as complicações em longo prazo do DM, incluindo as disfunções micro e macrovasculares (*American diabetes association*, 2010). Em particular, a perda da função renal que acompanha o DM é a principal responsável pelo número de indivíduos em terapia renal substitutiva e transplante renal e contribui para a morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) (Thomas *et al.*, 2016).

Uma análise realizada no *Global Burden of Disease Study* (2010) demonstrou que a mortalidade associada à doença renal crônica (DRC) dobrou entre 1990 e 2010 e mais de três milhões de pessoas foram submetidas à terapia renal substitutiva, cerca de dois milhões e meio em hemodiálise ou diálise peritoneal e quase 700.000 tinham sido submetidos a transplante renal (Siemens *et al.*, 2018; Lozano *et al.*, 2012). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Nefrologia demonstrou um aumento médio de 6,3% ao ano, entre 2011 e 2016, no número de indivíduos em terapia dialítica (Sesso *et al.*, 2017).

A doença renal diabética (DRD) foi a terminologia adotada pela *National Kidney foundation* (NKF), desde 2007, para substituir o termo nefropatia diabética

(Molitch *et al.*, 2015). Sua incidência é maior em pessoas acima de 65 anos de idade (38%), quando comparada com pessoas com 45 a 64 anos (13%) ou 18 a 44 anos (7%). No entanto é mais prevalente em mulheres (15%) do que em homens (12%) e em negros não-hispânicos (16%) (Lozano *et al.*, 2012).

A perda gradual da função renal associa-se ao aumento do risco de morbimortalidade por DCV, em particular, infarto agudo do miocárdio (Thomas *et al.*, 2016). A taxa de mortalidade cardiovascular (CV) nesses pacientes é de 10 a 20 vezes maior em comparação a população geral, e na doença renal em fase dialítica é de 20 a 30 vezes maior (Subbiah *et al.*, 2016; Sharabas *et al.*, 2016).

O controle da pressão arterial e a adequação dos lípides séricos com terapia medicamentosa, não são capazes de prevenir por completo a incidência de complicações macrovasculares. Considera-se, então, a ação de fatores de risco não tradicionais que incluem: estresse oxidativo, formação de produtos de glicação avançada (AGE) e acúmulo de toxinas urêmicas, os quais exacerbam o risco cardiovascular primário, aumentando 30 vezes em pacientes com doença renal, em comparação à população geral (Apostolov *et al.*, 2010; Moradi *et al.*, 2009; Hörl *et al.*, 2004; Sarnak *et al.*, 2019).

1.2. Classificação da doença renal crônica

A DRC é definida como a presença de disfunções nos rins por um período de, pelo menos, 3 meses ou taxa de filtração glomerular inferior a 60 mL/min/1,73m² (Inker *et al.*, 2014). Os marcadores de dano renal podem incluir taxa de excreção urinária de albumina (EUA) (razão albumina: creatinina $\geq 30\text{mg/g}$), que também é utilizada para a identificação e classificação da DRC, anormalidade de sedimento urinário e eletrólitos decorrente de distúrbio tubular; alteração histológica ou

estrutural detectada por exame de imagem e história de transplante renal (Webster *et al.*, 2017). Conforme evidenciado na **tabela 1**, a DRC é classificada em 5 estágios de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) e em três estágios conforme a taxa de EUA.

Tabela 1. Estadiamento e classificação da DRD

Estágio	Filtração Glomerular (mL/min/1,73m²)	Classificação
1	≥ 90	Função renal normal ou aumentada
2	60 - 89	Levemente reduzida *
3^a	45 - 59	Leve a moderadamente reduzida
3^b	30 - 44	Moderada a gravemente reduzida
4	15 - 29	Gravemente reduzida
5	<15	Falência renal
Estágio	Excreção urinária de albumina (mg/g de creatinina)	Classificação
A1	< 30	Normal a levemente aumentada
A2	30 - 300	Moderadamente aumentada
A3	> 300	Acentuadamente aumentada

* Relativo a adulto jovem; na ausência de evidências de lesão renal, a categoria do estágio 2 não preenchem critérios para DRC. Fonte: adaptado do Lesley (Inker *et al.*, 2014).

1.3. Doença renal diabética (DRD) e risco cardiovascular

No Brasil, cerca de 37% dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Scheffel *et al.*, 2004) e 34% dos pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) (Rodrigues *et al.*, 2010), apresentam aumento da EUA, o que se correlaciona com a progressão da DRD e ao risco de eventos coronarianos (Groop *et al.*, 2009; Perkovic *et al.*, 2008).

O estudo PREVEND demonstrou, pelo uso do escore de Framingham para cálculo do risco CV, que a taxa de EUA, mas não a TFG, foi associada a uma melhor predição de risco (Smink *et al.*, 2012). Por outro lado, o estudo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Prognosis Consortium* evidenciou que a redução da TFG, conjuntamente com a taxa de EUA discrimina melhor o risco CV, em comparação a estes parâmetros isoladamente (Gansevoort *et al.*, 2011).

A DRC, especialmente no DM, não é invariavelmente acompanhada por perda urinária de albumina elevada, podendo ocorrer em A2, A3, ou ao mesmo tempo, em indivíduos nos quais a EUA reverte ao normal (Macisaac *et al.*, 2011; Halimi *et al.*, 2012; Molitch *et al.*, 2010). Tsalamandris *et al.* (2010) demonstraram que cerca de 25% dos portadores de DM, incluindo tipo 1 e 2, apresentaram redução da TFG com faixa normal de EUA (Tsalamandris *et al.*, 1994).

Em uma análise retrospectiva de 10.290 indivíduos com DM e hipertensão, observou-se que dos 3.187 casos de EUA estágio A2 (microalbuminúria), 668 regrediram para A1 (normoalbuminúria), 630 progrediram para A3 (macroalbuminúria) e, destes 10 evoluíram para terapia substitutiva dialítica. O estágio A1 foi, originalmente, diagnosticado em 5.908 indivíduos, dos quais 2.839 evoluíram para A2, 370 para A3 e 5, deste último grupo, para terapia dialítica (Vupputuri *et al.*, 2011).

Embora, conforme destacado, muitos portadores de DM progridam para falência renal na ausência de perda urinária de albumina, a evolução da doença renal pode ser mais lenta nestes indivíduos.

Apesar de os mecanismos envolvidos na evolução da DRD não serem completamente conhecidos, considera-se o papel da doença vascular renal e do índice de resistência intrarrenal (MacIsaac *et al.*, 2006). Além disso, observa-se que indivíduos com DRC com A1 ou A2 são, em geral, mais velhos, com maior tempo de DM e histórico de DCV (Penno *et al.*, 2011). Em indivíduos com DRC e estágio A1, o aumento da faixa etária, hipertensão e arteriosclerose é mais prevalente e anormalidades estruturais renais típicas, menos frequente (Ekinci *et al.*, 2013).

A EUA e sua evolução parecem ser os principais contribuintes para a perda da função renal no DM, sendo o risco de evolução para tratamento dialítico e morte maior em indivíduos com A3, em comparação aqueles com A2 ou A1 (Molitch *et al.*, 2010; Perkins *et al.*, 2007; Rigalleau *et al.*, 2007). Neste sentido, a A2 é considerada como elemento preditivo para complicações renais e CV em pacientes com progressão não usual da doença renal, como aqueles portadores de DM (Newman *et al.*, 2005).

O aumento da EUA relaciona-se, do ponto de vista fisiopatológico, com aumento da produção hepática de lipoproteínas que contêm apolipoproteína B (apoB), como as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). O cenário pró-aterogênico se agrava com estabelecimento de resistência insulínica e com condições típicas do DM, como estresse hiperglicêmico, componentes de síndrome metabólica, inflamação e autoimunidade.

Alterações no perfil de lípidos e lipoproteínas são prevalentes na DRC e se estabelecem de acordo com o estadiamento da doença renal e evolução da EUA, uso de agentes imunossupressores, presença de resistência insulínica e DM ou outras comorbidades, modalidade da terapia renal substitutiva e estado nutricional (Kasiske *et al.*, 2013; Kwan *et al.*, 2007). O aumento da proteinúria favorece a maior produção de apoB, com elevação de VLDL e lipoproteína de densidade baixa (LDL). Frequentemente o quadro assemelha-se ao da dislipidemia diabética, com elevação na concentração plasmática de triglicérides (TG), resultante da maior produção hepática de VLDL e menor catabolismo destas lipoproteínas. Isto decorre da diminuição da atividade da enzima lipoproteína lipase, o que compromete o catabolismo das VLDL (Attman *et al.*, 2003; Vaziri 2006; Vaziri *et al.*, 2011). Além disso, a expressão da lipase hepática é reduzida na DRC (Klin *et al.*, 1996) levando ao acúmulo de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), enriquecimento de TG nas LDL e redução da lipoproteína de densidade alta (HDL) (Vaziri *et al.*, 1997).

LDL pequenas e densas prevalecem frente à hipertrigliceridemia, graças à maior transferência de TG das VLDL e seus remanescentes para as LDL, por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). As LDL mais enriquecidas em TG tornam-se melhor substrato para a lipase hepática, de tal forma, que no final do processo de hidrólise, estas partículas tornam-se menores e mais densas. As LDL pequenas e densas atravessam a camada endotelial e são mais sujeitas à oxidação na íntima arterial, o que favorece sua captação por macrófagos (Ivanova *et al.*, 2017).

Foi demonstrado em diversos estudos que, mesmo com a redução das concentrações de colesterol na partícula de LDL (LDL colesterol), após o tratamento com atorvastatina e rosuvastatina, não houve redução do risco cardiovascular na

população com DRC e em indivíduos submetidos à hemodiálise (Wanner *et al.*, 2005; Fellström *et al.*, 2009). Isto fala a favor da modificação do tamanho das LDL e alterações químicas em sua estrutura como determinantes ao risco de aterosclerose na doença renal.

Redução de colesterol na partícula de HDL (HDL colesterol ou HDLc) e apolipoproteína A-I (apoA-I) também são observados na DRD, em decorrência da alteração na função de proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo das HDL, como a lecitina colesterol aciltransferase (LCAT) e a CETP (Scarpioni *et al.*, 2012). Isto compromete o efluxo de colesterol dos tecidos periféricos ao fígado, por meio do transporte reverso de colesterol (TRC) (Moradi *et al.*, 2009; Vaziri *et al.*, 2011).

Em ratos normoalbuminúricos, com DM induzido por estreptozotocina, observou-se aumento da expressão de megalina nos túbulos proximais, o que foi vinculado ao estresse oxidativo (Kurosaki *et al.*, 2018). O complexo megalina/cubilina promove a captação e a degradação da apoA-I, principal constituinte das HDL, o que pode contribuir para exacerbar a redução de HDL na DRC (Macisaac *et al.*, 2011).

Hassan *et al* (2016) demonstraram que indivíduos com concentrações altas de HDL não estão totalmente protegidas contra DCV e o aumento da concentração de HDL, mesmo com intervenção medicamentosa, não reduz o risco de eventos CV. Neste aspecto, vale considerar que na DRC, a distribuição das subfrações de HDL é alterada, com aumento das concentrações de pequenas partículas de HDL que se associam à maior prevalência de complicações CV, em estudos de prevenção primária e secundária (Maeda *et al.*, 2012; Bermúdez *et al.*, 2017). Em pacientes com DRC entre os estágios 3a a 4, a concentração de pré-beta HDL está aumentada e se correlaciona positivamente ao risco CV (Kuchta *et al.*, 2019).

A apo (a) é a principal constituinte da lipoproteína (a) ou Lp(a), cuja concentração no plasma é um fator de risco CV, por suas ações pró-inflamatórias e pró-trombóticas (Wu *et al.*, 2019). A concentração de Lp(a) encontra-se elevada na DRC, sendo utilizada como marcador de progressão da doença. A apo (a) é uma proteína bastante polimórfica e apresenta estrutura homóloga ao plasminogênio, o que a torna responsável por eventos trombogênicos que podem agravar o desenvolvimento da DCV (Gencer *et al.*, 2017).

1.4. Transporte reverso de colesterol na Doença Renal Crônica

O TRC (**figura 1**) é o processo pelo qual o excesso de colesterol livre (CL) removido das células periféricas como, por exemplo, macrófagos da íntima arterial é transportado ao fígado ou aos tecidos esteroideogênicos. Isto garante sua eliminação na bile e excreção nas fezes ou utilização como precursor da síntese de hormônios esteroídicos (Cuchel *et al.*, 2006; Sviridov *et al.*, 2002).

A primeira etapa do TRC consiste no efluxo de lípidos, caracterizado pela retirada de colesterol celular pela apoA-I e pré-beta HDL, que interagem com o receptor ABCA-1 (*ATP binding cassette transporter A-1*; proteína cassete A1 de ligação ao ATP). Após esterificação, pela LCAT, o colesterol esterificado é incorporado ao núcleo hidrofóbico da HDL, a qual se torna esférica e, gradativamente, aumenta seu tamanho, sendo designada de HDL₃ e HDL₂. As HDL₂ interagem com o receptor ABCG-1 (*ATP binding cassette transporter G1*; proteína cassete G1 de ligação ao ATP) que remove CL e óxidos de colesterol (Forte *et al.*, 1995; Wróblewska *et al.*, 2011).

O CE pode ser, seletivamente, removido das grandes partículas de HDL graças ao receptor SR-BI (receptor *scavenger* classe B tipo 1) expresso no fígado e órgãos esteroidogênicos. Pela ação das enzimas 7-alfa e 27-alfa hidroxilase, o colesterol é convertido em ácido cólico e deoxicólico, respectivamente, sendo eliminado na forma destes ácidos biliares ou em sua forma livre na bile. A apoA-I restante, com pequeno conteúdo de lípides, retorna ao interstício, onde reinicia o TRC ou pode ser catabolizada no rim (Ramasamy *et al.*, 2014; Lusis 2000; Levinson *et al.*, 2015).

A HDL, ainda, troca parte do seu conteúdo de CE por TG, com as lipoproteínas que contêm apoB [quilomícrons (QM), VLDL e LDL], por intermédio da CETP. Sendo assim, QM, VLDL e LDL podem ser captados pelos receptores hepáticos do tipo B-E e pela proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP).

Figura 1. Transporte Reverso de Colesterol. Apolipoproteínas A-I (apoA-I) e partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) removem o excesso de colesterol de macrófagos 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). As partículas de HDL maduras também são capazes de remover o excesso de colesterol celular via receptor ABCG-1. O colesterol esterificado (CE) pode ser diretamente removido das HDL pelo receptor SR-BI no fígado, podendo ser convertido em ácidos biliares e eliminado na forma livre na bile. Por intermédio da CETP, o CE é transferido para os QM, VLDL e LDL, as quais podem ser removidas pelos receptores B-E ou proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de densidade baixa (LRP) no fígado. A etapa final do TRC é caracterizada pela eliminação de colesterol na bile e excreção fecal.

Na DRC diversas etapas do TRC encontram-se alteradas o que se condiciona, em grande parte, às alterações quantitativas dos lípides séricos e perfil de lipoproteínas (Vaziri 2010; Glodny *et al.*, 2011). A redução da concentração de HDL e apoA-I reflete-se na menor quantidade de aceptores de colesterol celular (Machado-Lima *et al.*, 2013). A metabolização plasmática das HDL se encontra prejudicada na DRC, em função da menor transcrição gênica e atividade da LCAT (Liang *et al.*, 2005). Por outro lado, o aumento da trigliceridemia favorece a atividade da CETP, com enriquecimento de lipoproteínas potencialmente aterogênicas em CE (Attman *et al.*, 1993; Shoji *et al.*, 1997; de Sain-Van *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2005; Vaziri 2010; Glodny *et al.*, 2011), as quais podem ser fagocitadas por macrófagos de parede arterial.

Além disso, modificações qualitativas das lipoproteínas, em componentes lipídicos e proteicos, comprometem sua função ao longo do TRC. A glicação e a carbamoilação de LDL favorecem sua captação por macrófagos arteriais em detrimento da remoção de lípidos pelas HDL (Drüeke *et al.*, 2001; Mathur *et al.*, 2002).

Em estudos com ratos *Sprague-Dawley* urêmicos observou-se aumento na atividade da enzima acilcolesterol aciltransferase 1 (ACAT-1), limitando a disponibilidade de colesterol livre para exportação a aceptores extracelulares (Liang *et al.*, 2005).

Em modelo animal de DRC, induzida por nefrectomia 5/6, observou-se maior concentração plasmática de AGE e produtos de peroxidação lipídica. A albumina, isolada do soro destes animais com DRC induziu, em macrófagos, estresse de retículo endoplasmático o que se vinculou ao prejuízo de colesterol destas células pelas HDL (Machado *et al.*, 2014).

1.5. HDL na Doença Renal Crônica

Além de mediar o TRC, as HDL exercem outras importantes ações antiaterogênicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, vasodilatadora e antiagregante (Zhou *et al.*, 2015). Para todos os casos, a mensuração do HDLc, parece não representar o potencial funcional desta lipoproteína. Neste sentido, há a busca constante de novas métricas que permitam inferir o potencial antiaterogênico das HDL. Isto é reforçado pelo fato de que as estratégias para elevação do HDLc não são, inequivocamente, acompanhadas por melhoras em desfechos CV (Fellström *et al.*, 2009; Baigent *et al.*, 2011).

A HDL possui um núcleo lipídico hidrofóbico contendo 20% de CL e de CE, 15% de fosfolípidos e 5% de TG (Nofer *et al.*, 2004). Sua superfície hidrofílica é composta de 50% de apolipoproteínas (apoA-I em maior quantidade, seguida pelas A-II, IV, V, CI, CII, CIII, E e D). Por técnica de ultracentrifugação isolam-se várias subfrações de HDL, na faixa de densidade de 1,063 a 1,21 g/mL, cujo tamanho varia conforme segue: HDL_{2b} (10,6 nm), HDL_{2a} (9,2 nm), HDL_{3a} (8,4 nm), HDL_{3b} (8 nm) e

HDL_{3c} (7,6 nm) (Lund-Kats *et al.*, 2003). As HDL₃ (D = 1,125 a 1,21 g/mL) são formadas pelo enriquecimento das pré-beta HDL em colesterol advindo das células e mediante ocupação de seu núcleo por CE. As HDL₂ (D = 1,063 a 1,125 g/mL) são geradas mediante atividade da CETP que, pela transferência de TG, aumenta gradativamente o tamanho das HDL (Laggner *et al.*, 1977; Nambi *et al.*, 2005).

As HDL exercem funções antioxidantes e anti-inflamatórias, que protegem a LDL do dano oxidativo e do acúmulo de produtos de peroxidação primária e secundária que favorecem sua captação por receptores *scavenger* de macrófagos (Barter *et al.*, 2004).

As HDL limitam a oxidação da LDL por diversos mecanismos, sendo os mais relevantes, aqueles promovidos pela ação de proteínas associadas à sua estrutura, como paroxonase 1 (PON1), fosfolipase A-2, glutathione peroxidase, LCAT, apoA-I e apoA-II (Stein *et al.*, 1999).

A PON1 promove a hidrólise de peróxidos lipídicos nas LDL (Chistiakov *et al.*, 2017; Garner *et al.*, 1998; Panzenböck *et al.*, 2005), e sua atividade é favorecida pela apoA-I que também é cofactor para a atividade LCAT. Parte da atividade antioxidante da HDL₃ envolve a captação de hidroperóxidos de fosfolípidos da LDL oxidada por intermédio da CETP (Christison *et al.*, 1995; Girotti 2008). A HDL ainda inibe a migração leucocitária, o que reduz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação do fator nuclear KB (NFkB) (Lowenstein *et al.*, 2010; Stein *et al.*, 1999).

1.6. Proteômica de HDL

Além de proteínas intimamente relacionadas ao metabolismo de lípidos, as HDL carregam vinte e três das quarenta e oito proteínas de resposta de fase aguda, cujas concentrações estão aumentadas por infecção aguda e inflamação crônica, seis proteínas correspondem ao sistema complemento, proteínas relacionadas à modulação da resposta inflamatória e inibidores de proteinases. Desta forma, suas funções vão além do TRC e não podem ser determinadas pela simples mensuração do HDLc e apoA-I (Vaisar 2012).

A caracterização da proteômica da HDL de camundongos C57BL/6J evidenciou 75 proteínas associadas a ela, em comparação a 82 em seres humanos. Embora as HDL de ambos os modelos contenham, as mesmas categorias funcionais de proteínas, do total, 17 foram específicas a humanos, enquanto 8 apenas detectadas apenas em camundongos (Vaisar *et al.*, 2015).

Estudo com indivíduos controles e indivíduos com doença arterial coronariana (DAC), evidenciou que 22 das 48 proteínas associadas à HDL foram relacionadas ao metabolismo de colesterol e lipoproteínas. Vinte eram proteínas de resposta de fase aguda, 6 reguladoras de ativação de complemento e 8 associadas à inibição da endopeptidase (Vaisar *et al.*, 2007).

Em indivíduos com DRC e em hemodiálise observam-se baixas concentrações de HDL, correlacionando-se com um risco aumentado de doença aterosclerótica (Vaziri 2010). Nesses indivíduos, encontram-se partículas de HDL disfuncionais, com redução significativa dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em indivíduos em hemodiálise (Jurek *et al.*, 2008; Vaziri 2009). A redução da TFG está associada ao aumento das concentrações de apolipoproteína C-III (apoC-III) e

proteína de ligação a retinol 4 (RBP4), e com concentrações mais baixas de CETP, vitronectina e apolipoproteína L1 (apoL-1) (Rubinow *et al.*, 2017).

Holzer *et al.* demonstraram que indivíduos em hemodíalise apresentam menores concentrações de apoA-I e apoA-II e maiores concentrações de proteína amiloide sérica A-I (SAA1), albumina e apoC-III. A hemodíalise crônica aumenta as concentrações de apoC-II (Holzer *et al.*, 2015; Weichhart *et al.*, 2012), fosfolipase A2 (Holzer *et al.*, 2012), proteína surfactante B (Weichhart *et al.*, 2012), precursor alfa1-microglobulina (Weichhart *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2015) e apoA-IV (Shao *et al.*, 2015).

Estudos recentes demonstram que, após o início da HD, as HDL se tornam mais enriquecidas em proteína amiloide sérica A-2 (SAA2), hemoglobina-beta, SAA1, proteína relacionada à haptoglobina (HPR), CETP, proteína de transferência de fosfolípidos (PLTP) e apoE (Wang *et al.*, 2018).

1.7. Produtos de glicação avançada na Doença Renal Crônica

Os AGEs são compostos pró-inflamatórios e pró-oxidantes que desempenham importante papel na alta prevalência de disfunção endotelial e DCV em pacientes com DRC (Linden *et al.*, 2008).

Os AGEs originam-se da reação covalente não-enzimática entre a glicose ou outros monossacarídeos com resíduos de lisina e arginina das proteínas, porção amino-terminal da cadeia polipeptídica e certos fosfolípidos e ácidos nucleicos. Inicialmente, é produzida uma base de Schiff instável que progride para um produto Amadori mais estável. Rearranjos inter e intramoleculares desses compostos favorecem a geração de oxaldeídos altamente reativos, como metilglioxal (MGO), glioxal (GO) e 3-desoxiglucosona (3-DG) (**Figura 2**). Esses compostos reagem de

forma rápida e irreversível com macromoléculas levando à formação dos AGEs, os quais alteram a estrutura primária das proteínas e sua funcionalidade (Dyer *et al.*, 1991; Arsov *et al.*, 2014). Em condições inflamatórias observa-se maior geração de oxoaldeídos, em particular, glicolaldeído, pela ação da mieloperoxidase (Andrades *et al.*, 2009). Fontes exógenas de AGEs incluem o tabaco e alimentos ricos em gorduras e proteínas cozidas em altas temperaturas por tempo prolongado (Cerami *et al.*, 1997; Uribarri *et al.*, 2010).

Os principais AGEs formados incluem carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), pirralina, pentosidina, argipirimidina, dímeros de glioxal e metilglioxal, glioxal imidazolone, metilglioxal imidazolone (Miyata *et al.*, 1998; Jono *et al.*, 2002; Thornalley *et al.*, 2005). São compostos heterogêneos de difícil mensuração no compartimento plasmático e tecidual. Alguns AGEs emitem fluorescência como também promovem ligações cruzadas entre macromoléculas (Pageon *et al.*, 2007).

Figura 2. Produtos de glicação avançada. Os produtos de glicação avançada (AGE) são formados pela reação não enzimática entre a porção amino-terminal de proteínas, resíduos de lisina e arginina e ácidos nucleicos com a glicose, levando a formação de um composto instável, chamado base de Schiff que progride para produto Amadori que é mais estável. Rearranjos moleculares dos intermediários dessa reação ou a auto-oxidação da glicose levam à formação de oxaldeídos, como o glicolaldeído, glioxal e metilglioxal que são altamente reativos e propagam a reação em sentido irreversível. Formam-se os AGEs, compostos heterogêneos como a carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), glioxal imidazolone, pirralina e argipirimidina.

Independentemente da hiperglicemia, na DRC prevalece o estresse carbonila em consequência da menor depuração renal de intermediários da reação de glicação e por meio da diminuição do catabolismo de compostos carbonila como, 3-DG, por deficiência de sistemas de destoxificação (Meerwaldt *et al.*, 2009). Além disso, na DRC há aumento do insulto oxidativo e diminuição de defesas antioxidantes, agravando as reações de glicoxidação que originam os AGEs. Sendo assim, o

acúmulo dos AGEs em pacientes com DRC é demonstrado como resultado de inflamação e estresse oxidativo aliado ao estresse carbonila (Park *et al.*, 1998; Vlassara *et al.*, 1992).

Metilglioxal, glioxal e 3-DG, encontram-se elevados na circulação de indivíduos urêmicos não-diabéticos (Henle *et al.*, 2003), acarretando a geração de AGE e produtos avançados de lipoxidação (ALEs) (Kalousová *et al.*, 2005; Miyata *et al.*, 1999).

A concentração sanguínea de MGO e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativa de peroxidação lipídica é, respectivamente, 3,8 e 2 vezes maior em portadores de DRC em comparação a controles saudáveis (Miyata *et al.*, 1999). CML e pentosidina são os AGEs mais comumente encontrados na DRC e em associação à área de lesão aterosclerótica, onde prejudicam o metabolismo de lípidos e exacerbam a resposta inflamatória (Koyama *et al.*, 2010).

As concentrações circulantes de CML e MGO-hidroximidazolone predizem a perda da função renal em índios Pima americanos com DM e DRD em estágio inicial. Tais compostos encontram-se elevados paralelamente os marcadores de estresse oxidativo, como sulfóxido de metionina e ácido 2-aminoadípico. Juntamente com a concentração de CEL, estes AGEs também predizem as alterações morfológicas associadas ao dano renal (Saulnier *et al.*, 2016).

Proteínas modificadas por AGEs são descritas como moléculas mais resistentes à degradação enzimática e, constantemente, resultam na formação de produtos de glicação de baixo peso molecular, os quais são facilmente filtrados pela

barreira glomerular e reabsorvidos pelas células tubulares (Miyata *et al.*, 1996; Winnie *et al.*, 2001).

Os AGEs são filtrados nos glomérulos e reabsorvidos nos túbulos proximais; entretanto sua taxa de reabsorção e depuração são variáveis. O acúmulo de AGEs nos glomérulos aumenta a expressão de colágeno IV e laminina na matriz extracelular, com alteração estrutural local por ligações cruzadas e indução de senescência celular (Ayo *et al.*, 1991).

O processo dialítico é ineficaz na remoção de precursores que propagam a formação dos AGEs (Mera *et al.*, 2005). Além disso, geração dos AGEs pode ser exacerbada na terapia de diálise peritoneal, em decorrência da composição e temperatura do dialisato (Jiang *et al.*, 2012).

O receptor para AGE (RAGE) reconhece diversos AGEs, notadamente a CML, promovendo uma via de transdução de sinal que culmina na ativação de NFκB e na transativação de genes inflamatórios, como TGF-beta, interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (Bucciarelli *et al.*, 2002; Sebeková *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2012). Do ponto de vista renal, esses eventos contribuem para a hipertrofia glomerular e tubular, com perda gradativa da função renal (Yasuda *et al.*, 2017). Evidências recentes apontam para a presença de RAGE no meio intracelular, mediando resposta biológica desencadeada por AGE gerados localmente (Sotokawauchi *et al.*, 2019).

Formas solúveis de RAGE podem se ligar aos AGEs mas, por serem desprovidas de domínio intracelular, não promovem transdução de sinal, opondo-se

às ações deletérias do AGE. Concentrações aumentadas de RAGE solúvel são consideradas protetoras contra o desenvolvimento da DRD (He *et al.*, 2001).

Outros receptores também são capazes de se ligar aos AGEs, embora sua via de sinalização não esteja completamente elucidada. Incluem-se neles os receptores scavenger classe A e B, fasciclina EGF, tipo lamina e receptor scavenger contendo um domínio tipo 1 (FEEL 1) (Adachi *et al.*, 2002), e os receptores da família das oligossacariltransferases, AGER1, R2 e R3. Os receptores AGER1 se opõem à via dos RAGE, por induzirem a expressão de enzimas antioxidantes (Vlassara *et al.*, 2009) e seu grau de expressão correlaciona-se negativamente com o desenvolvimento de complicações do DM (Daffu *et al.*, 2015).

Lipoproteínas modificadas por AGEs apresentam alteração em sua metabolização. QM e VLDL glicadas são menos metabolizados pela lipoproteína lipase; LDL e VLDL glicadas não são reconhecidas pelos receptores B-E, com maior tempo de permanência na circulação (Rabbani *et al.*, 2010). Por outro lado, HDL glicadas são mais rapidamente removidas (Witztum *et al.*, 1982) e perdem sua habilidade em mediar o TRC (Daffu *et al.*, 2015; Kashyap *et al.*, 2018).

Em macrófagos, a incubação com albumina modificada por glicação avançada, principal proteína modificada na circulação por glicação, condiciona prejuízo ao TRC, por aumentar a degradação de ABCA-1 nos sistemas proteasomal e lisossomal, com redução no efluxo de colesterol e acúmulo intracelular de lípidos (Machado-Lima *et al.*, 2015; Machado-Lima *et al.*, 2013; Iborra *et al.*, 2018).

1.8. Carbamoilação na Doença Renal Crônica

A ureia é gerada no fígado durante o catabolismo de aminoácidos e compostos nitrogenados, sendo eliminada na urina. Na DRC, o acúmulo de ureia é

amenizado por terapias dialíticas, embora elas sejam capazes de compensar apenas cerca de 10 % da função renal. Neste sentido, os pacientes permanecem com sobrecarga crônica de ureia (uremia) (Berg *et al.*, 2013).

A carbamoilação é uma modificação pós-traducional não-enzimática de proteínas, promovida pelo aumento da concentração circulante de ureia na DRC (Jaisson *et al.*, 2010). A ureia dissocia-se em amônia e cianeto, o qual se isomeriza para ácido isociânico (Dirnhuber *et al.*, 1948). O ácido isociânico é um eletrófilo altamente reativo que reage rapidamente com grupos nucleofílicos e modifica o grupo alfa-amino de aminos primárias e o grupo epsilon-amino de resíduos de lisina. O produto final da carbamoilação é a homocitrulina (HCit) (**Figura 3**) (Stark 1964; Stark 1965).

Figura 3. Reação de carbamoilação. O aumento da concentração circulante de ureia na DRC favorece sua dissociação em cianato o qual se isomeriza para ácido isociânico. Este reage com resíduos de lisina e cisteína das proteínas, sendo a homocitrulina o principal composto formado. Fontes exógenas de tiocianato, como tabaco, inflamação e componentes da dieta, também promovem por ação da mieloperoxidase, a formação de ácido isociânico.

A HCit é considerada um valioso biomarcador, predizendo o risco de morbidade e mortalidade em pacientes com DRC (Jaisson *et al.*, 2016). Estudos tem demonstrado que a HCit é, também, um biomarcador em contextos não-urêmicos, como na doença arterial coronariana (DAC) ou doença arterial periférica (Wang *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016). Indivíduos com DAC apresentam concentração sérica marcadamente elevada de HCit em comparação a indivíduos sem DAC (Jaisson *et al.*, 2015; Kalim *et al.*, 2014).

A carbamoilação também ocorre em aminoácidos livres, com competição entre vários resíduos, o que pode exacerbar a reação em situações de deficiência proteica. Neste sentido, a suplementação com aminoácidos é evidenciada como modulador negativo da reação de carbamoilação (Kalim *et al.*, 2014).

Nicolas *et al* (2018), demonstraram que a reação de carbamoilação compete *in vivo* com a de glicação, indicando uma inter-relação complexa no desenvolvimento de complicações em longo prazo do DM e DRC (Nicolas *et al.*, 2018). Este achado também reitera a atenção quanto à utilização de parâmetros de controle glicêmico no DM, como hemoglobina glicada e frutossamina, quando da coexistência de complicações renais.

LDL carbamoiladas são encontradas em área de lesão aterosclerótica e medeiam o aumento da resposta inflamatória local. Além disso, induzem apoptose de células endoteliais e estimula a proliferação de células musculares lisas, o que favorece e agrava a aterosclerose (Apostolov *et al.*, 2009; Apostolov *et al.*, 2007).

Existem poucos estudos acerca da modificação de HDL por carbamoilação. Holzer *et al* evidenciaram que a modificação de HDL por carbamoilação induz acúmulo de colesterol e formação de gotículas lipídicas em macrófagos, por intermédio do receptor SR-BI (Holzer *et al.*, 2011).

A albumina é a principal proteína sérica modificada por carbamoilação. Berg *et al* (2013) demonstraram que a proporção de albumina carbamoilada correlaciona-se com a concentração de ureia plasmática e é duas vezes superior em indivíduos com doença renal em estágio avançado em comparação a controles. Além disso, a carbamoilação da albumina associou-se com a menor sobrevida destes pacientes em duas coortes independentes (Berg *et al.*, 2013; Wanner *et al.*, 2005; Brunelli *et al.*, 2008).

Em outro estudo, a carbamoilação da albumina associou-se ao maior índice de resistência à eritropoietina, e também foi apontado como preditor de mortalidade (Kalim *et al.*, 2014).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO ESTUDO

Diversos estudos populacionais apontam as concentrações de colesterol ou apoA-I na HDL como métricas para quantificação da proteção CV conferida por esta lipoproteína. Entretanto, modificações químicas em componentes proteicos ou lipídicos das HDL e alteração em proteínas carregadas pela partícula podem conferir, independentemente, da apoA-I e HDLc, prejuízo em sua função antiaterogênica e podem servir como parâmetro da ação de medicamentos e alteração em estilo de vida. Em modelo animal de DRC não se observou alteração na capacidade das HDL em remover colesterol de macrófagos. Entretanto em humanos, entretanto, os achados são controversos e parecem depender do tipo celular utilizado e do acceptor final de colesterol celular, seja soro, plasma ou HDL isoladas. Na DRD, prevalecem o insulto glicoxidativo e de carbamoilação que pode conferir modificação nas HDL e redução em suas propriedades antiaterogências, em particular, capacidade de remover colesterol celular, minimizar a oxidação de LDL e a secreção de citocinas inflamatórias por macrófagos. Nossa hipótese é que o grau de comprometimento da função renal se refleta no proteoma da HDL e na modulação de suas funções antiaterogênicas e, em última instância, no risco CV.

3. OBJETIVO

Avaliar a HDL - isolada de indivíduos portadores de DRD, em diferentes estágios da perda de função renal, e de indivíduos controles - quanto à sua composição em lípides e proteínas, modificação química por glicação avançada e carbamoilação, proteômica e funcionalidade (remoção de colesterol celular, inibição da oxidação de LDL e da resposta inflamatória em macrófagos).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Indivíduos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), de ambos os sexos, foram selecionados no Ambulatório de Diabetes e no Ambulatório Multidisciplinar de Doença Renal Diabética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Os critérios de inclusão foram: DM2, diagnosticado há, pelo menos, 10 anos, idade superior a 45 anos, ambos os sexos, DRC em estágio 1 a 5. Todos os participantes receberam as informações sobre o estudo e seus aspectos éticos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq # 15024).

Os critérios de não-inclusão foram: rápida perda na taxa de filtração glomerular (>3 mL/min/ano), terapia renal substitutiva de qualquer natureza, síndrome nefrótica, hipertensão arterial refratária ao tratamento ou suspeita de nefroesclerose hipertensiva, presença de sedimento urinário ativo no exame de urina tipo I, doença oncológica ativa, redução da TFG superior a 30% dentro de 2 a 3 meses do início de inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores do receptor de angiotensina; sorologia positiva para HIV, indivíduos com doença renal e índice de massa corpórea $< 18,5$ Kg/m².

4.2. Dosagens bioquímicas

Sangue venoso foi coletado, após jejum de 12 h, para dosagens laboratoriais de hemoglobina glicada (HbA1c) (HPLC - cromatografia líquida de alta performance) e hemograma. O plasma foi imediatamente obtido, após centrifugação a 3000 rpm, 4°C e utilizado para as medidas de frutossamina, ureia, creatinina, aspartato

aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), colesterol total (CT), TG e isolamento de lipoproteínas. Amostra de urina de 24 h foi obtida para avaliar a depuração de creatinina e EUA. Os lípides da HDL (CT, TG e fosfolípides) foram determinados por kits enzimáticos (Roche Diagnostics, IN, USA) e apoA-I por imunoturbidimetria (Randox Laboratories Ltd, United Kingdom).

4.3. Obtenção de lipoproteínas

Ao plasma foram adicionados os seguintes conservantes ($\mu\text{L/mL}$ de plasma): 20 μL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%) (Merck, Darmstadt, Alemanha); 5 μL de benzamidina (2 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 5 μL de aprotinina (0,5%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 0,5 μL de PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonila) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), seguindo-se o ajuste de densidade com brometo de potássio. A fração de HDL ($d = 1,063 - 1,21 \text{ g/mL}$) dos indivíduos controles e com DRD foi isolada por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade (Havel *et al.*, 1955). A LDL ($d = 1,019 - 1,063 \text{ g/mL}$) foi obtida a partir de plasma de doador voluntário saudável, isolada por ultracentrifugação sequencial ($100\,000 \times g$, 24 h, 4°C , rotor Sw40; Beckman ultracentrifuge) (Havel *et al.*, 1955.) e purificada por gradiente descontínuo de densidade.

4.4. Acetilação de LDL

A LDL, isolada de doador saudável, foi acetilada segundo protocolo descrito por Basu *et al.* (1976). Para cada 16 mg de proteína de LDL, foi adicionado 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de cloreto de sódio ($\text{NaCl } 0,15 \text{ M}$), sob constante agitação e banho de gelo. Anidrido acético em pequenas e múltiplas quantidades foi adicionado por um período de 1 h, seguido de 30 min de agitação

em banho de gelo. O volume de anidrido acético utilizado foi de 1,5 vezes a massa de proteína de LDL. A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra tampão fosfato (PBS) com EDTA (pH = 7,4) por 24 h a 4°C e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

4.5. Cultura de Macrófagos derivados de células da medula óssea de camundongos

O protocolo para utilização de animais de laboratório foi estritamente de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA (CEUA#1015/2018). Após eutanásia de camundongos da linhagem C57BL6 macrófagos foram diferenciados a partir de células obtidas da medula óssea, por meio da dissecação do membro posterior para exposição dos ossos (fêmur e tíbia). A extremidade de cada osso foi cortada e a medula óssea lavada com meio DMEM contendo antibióticos, soro fetal bovino e meio condicionado advindo de células L929. A medula foi gentilmente aspirada com dissolução dos agregados celulares. As células foram centrifugadas a 1000 rpm, durante 6 min, temperatura ambiente, a seguir sendo semeadas em placas de cultura com incubação por 5 dias, em atmosfera de CO₂ 5% e temperatura de 37°C. No quinto dia, o meio de cultura foi trocado por novo meio condicionado de células L929, que auxilia no crescimento e na diferenciação de células da medula óssea em macrófagos. No sexto dia, as células foram incubadas com meio DMEM com baixa concentração de glicose, contendo 10% de FCS.

4.6. Efluxo de colesterol celular mediado por HDL

Macrófagos foram incubados com sobrecarga de LDL acetilada (50 µg/mL) e ^{14}C -colesterol (0,3 µCi/mL) por 24 h e a seguir, mantidos, por mais 24 h, em meio DMEM contendo albumina isenta em ácidos graxos (1 mg/mL; meio de equilíbrio). A porcentagem de efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinada após incubação com HDL dos pacientes e controles (50 µg/mL), durante 6 h, como: (^{14}C -colesterol no meio/ ^{14}C -colesterol na célula + ^{14}C -colesterol no meio) x 100 (Machado *et al.*, 2006).

4.7. Efeito inibitório da HDL sobre a oxidação das LDL *in vitro*

As LDL isoladas do plasma, foram dialisadas com PBS sem EDTA, e colocadas em uma concentração de 30 µg de proteína de LDL. Em seguida, adicionou-se 60 µg de proteína de HDL total e 100 µg de solução de CuSO_4 , com uma concentração final de 10 µmol/L, a 37° C. A amostra foi incubada em microplaca de quartzo de 96 wells com capacidade de 300 µL cada well (*Hellma Analytics*), e o branco foi incubado apenas a LDL e solução de cobre. A formação de dienos conjugados foi determinada pela variação na absorbância, monitorada continuamente em 234 nm, durante 4 h, em intervalos de 3 min. Calculou-se o tempo (min) de resistência das LDL à oxidação denominada de *lag time*, entre o início da reação e a intersecção do tempo com a reta extrapolada da fase de propagação. A razão máxima de formação de dienos conjugados, é determinada pela absorbância máxima / min (Esterbauer *et al.*, 1989).

4.8. Atividade anti-inflamatória da HDL

Os macrófagos derivados das células da medula óssea de camundongos foram incubados com sobrecarga de LDL acetilada (50 µg/mL) durante 24 h, lavados, e incubados com HDL dos controles e com DRD (50 µg/mL), durante 6 h. Após

lavagem, as células foram tratadas com lipopolissacarídeos (LPS serotipo E.Coli, 1 µg/mL de meio - Sigma), durante 24 h. O meio de cultura foi recolhido para dosagem das citocinas inflamatórias (Okuda et al., 2012).

4.9. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-alfa)

A mensuração no meio de cultura das citocinas, interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), no meio de cultura foi realizada pelo método de ELISA e as amostras, processadas de acordo com a instruções do fabricante (*R&D Systems e Cell Sciences*).

4.10. Quantificação de carboximetil-lisina (CML) no plasma

O plasma foi diluído 4 vezes e posteriormente em tubos eppendorf, o anticorpo primário foi diluído em 36 vezes com *Sample Dilution Buffer* (3 µL do anticorpo primário mais 105 µL do *Sample Dilution Buffer*). Em seguida os tubos foram agitados, e adicionados em duplicatas 100 µL da amostra em cada wells da placa do kit de ELISA já conjugada. A placa foi incubada por 1 hora a temperatura de (25°C) em agitação de 300 rpm. Em seguida a placa foi lavada com *Wash Buffer* (200 µL) por 4 vezes. Posteriormente as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (HRP conjugated Detection Antibody), por 1 hora a temperatura ambiente em agitação (300 rpm), a placa foi lavada 4 vezes com *Wash Buffer* e em seguida a placa foi incubada com 100 µL do substrato reagente de 10 a 20 minutos, em temperatura ambiente, até começar a intensificar a coloração dos wells. Após iniciar a modificação da coloração dos wells, adicionar 100 µL do *Stop Solution* e realizar a leitura lido em um leitor de microplacas usando em um comprimento de onda de 450 nm. (*Circulex CML, Woburn, MA, EUA*).

4.11. Determinação de pentosidina e AGE totais na HDL

Os conteúdos de AGEs totais e pentosidina foram determinados por método de fluorescência. HDL (100 µL) foram adicionados a 100 µL de PBS com EDTA em microplacas de 96 *wells* de fundo preto (*Costar, Black*). A análise foi realizada em fluorímetro (*Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader*). As amostras foram excitadas no comprimento de onda de 370 nm e a fluorescência emitida em 440 nm e 378 nm, respectivamente, para AGE total e pentosidina.

4.12. Quantificação de carbamilação na HDL

Foram adicionados 100 µL de amostra e do padrão de CBL-BSA à placa revestida com anticorpo anti-CBL, e incubado a 37°C por 2 horas. Posteriormente a placa foi lavada com *Wash Buffer* por 3 vezes, e em seguida foi adicionado 100 µL do anticorpo anti-CBL (diluído) e incubado por 1 hora à temperatura ambiente em um agitador orbital. Em seguida a placa foi lavada com *Wash Buffer* por 3 vezes e em seguida foi adicionado 100 µL do anticorpo HRP secundário e incubado por 1 hora, à temperatura ambiente em um agitador orbital. Após a lavagem com *wash buffer* foi adicionado 100 µL da solução de substrato em cada *well*, incluindo a curva, posteriormente foi incubado em um agitador por 2 a 30 minutos. Após a modificação da coloração dos *wells*, foi adicionado 100 µL de *stop solution* a cada *well*, a leitura é realizada em um leitor de microplacas usando um comprimento de onda de 450 nm. (Cell Biolabs, INC – STA-877).

4.13. Dosagem de Homocitrulina

O plasma foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi adicionado, em duplicata, em tubos de 2 mL com anel de vedação e 50 µL em cada

tubo de padrão de homocitrulina. Em seguida foi adicionada 5 µL de solução dodecil sulfato de sódio (SDS) e 5 µL de solução de proteinase K a cada tubo as amostras mais reagentes foram misturadas por *up and down* e incubadas por 2 h a 37°C. Em seguida foram adicionados 250 µL de reagente de *sample A* e 50 µL de *sample B* em cada tubo, e incubados em banho seco por 30 min a 95° C. Os tubos foram transferidos para 4°C por 5 min e centrifugados a 18.000xg por 10 min a 4°C. Foram transferidos 200 µL de cada sobrenadante para placa de microtitulação de 96 wells e lido em um leitor de microplacas usando absorvância de 540-560 nm como comprimento de onda primário (Homocitulline / Citulline Assay Kit- CELL BIOLABS, INC).

4.14. Proteômica da HDL

4.14.1. Digestão proteolítica da HDL

A concentração da proteína de HDL foi determinada pelo teste de Bradford (*Bio-Rad, Hercules, CA, EUA*) utilizando albumina bovina como padrão. Proteína de HDL (10 µg) foram solubilizados em bicarbonato de amônia 100 mM, ditiotretol e iodoacetamida, após digestão com tripsina (1:4, Promega, Madison, WI, EUA) por 4 horas a 37° C. A tripsina foi adicionada as amostras (1:50 de HDL) e a incubação foi feita durante a noite a 37° C. As amostras foram desalinizadas usando extração em fase sólida (coluna Oasis PRIME HLB SPE; Waters) após hidrólise ácida com ácido trifluoacético a 2% e posteriormente congeladas a - 80° C até análises de MS. Antes da análise da EM, as amostras foram ressuspensas em ácido fórmico a 0,1% (concentração final de proteína de 25 ng/µL).

4.14.2. Análise proteômica direcionada

As HDL digeridas (50 ng de proteína) foram quantificadas por monitoramento de reação paralela (PRM), como descrito anteriormente (Silva *et al.*, 2020). Resumidamente, um Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) usando um íon Flex NG de nanospray fonte (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha). Uma lista de inclusão agendada (janela de 3 minutos) contendo m/z de peptídeos precursores de interesse e tempos de retenção correspondentes foi gerada usando o *software Skyline* (MacLean *et al.*, 2010).

4.14.3. Seleção de peptídeos da HDL para quantificação direcionada

A metodologia PRM foi montada a partir de análises proteômicas de *shotgun* como descrito anteriormente (Silva *et al.*, 2020). Foram identificadas noventa e uma proteínas, mas esse número foi reduzido para 47 proteínas, eliminando potenciais proteínas contaminantes como a queratina e proteína com < 2 peptídeos únicos. Peptídeos com alto sinal de interferência e erro de massa > 10 ppm foram excluídos. Os peptídeos contendo metionina também foram evitados e apenas peptídeos detectados satisfatoriamente foram incluídos na análise final. Após critérios de exclusão, restaram 32 proteínas. Para análise estatística, consideramos o melhor peptídeo que representa cada proteína de interesse. Para encontrar esses peptídeos substitutos, primeiro foi determinado o par de peptídeos com o melhor coeficiente de correlação de *Pearson*. Desses 2 peptídeos, o peptídeo com o coeficiente de variação (CV) mais baixo foi finalmente selecionado.

4.14. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. 2007). As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) de um fator com pós-teste de *Dunnett* ou teste t de *Student*. As análises de correlação foram realizadas pelo teste de *Sperman*. Considerou-se o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5. Resultados

5.1. Dados antropométricos e bioquímicos

Na **tabela 2**, estão apresentados os dados antropométricos e bioquímicos dos indivíduos com DM categorizados nos grupos TFG > 60 + A1 e A2 e TFG < 60 + A3 (DRD franca) e indivíduos controles não-diabéticos, com TFG > 60, pareados por sexo e idade. No grupo com TFG < 60 + A3 houve maior predominância de indivíduos do sexo masculino (72 %) em comparação ao grupo controle (55 %) e TFG > 60 + A1 e A2 (30 %) e a massa corporal foi maior. A média de idade foi semelhante entre os grupos. O tempo de DM (anos) foi maior nos indivíduos com TFG < 60 + A3 ($17,8 \pm 6,5$) em comparação ao grupo TFG > 60 + A1 e A2 ($13,8 \pm 6,4$). Ao contrário, o histórico de DCV foi maior no grupo TFG > 60 + A1 e A2 (44 %) em comparação ao TFG < 60 + A3 (20 %). A porcentagem de HbA1c foi maior no grupo com TFG > 60 + A1 e A2 em comparação ao grupo controle e as concentrações plasmáticas de frutossamina, CT, TG, HDLc e CML foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 2. Dados clínicos e antropométricos

-	n (F/M)	Idade (anos)	Tempo de DM (anos)	Histórico de DCV (%)	IMC (Kg/m ²)	HbA1c (%)	Frutossamina (μmol/L)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDLc (mg/dL)	CML μg/mL plasma
Controle TFG > 60	8 (4/4)	70,0±8,6	-	-	24,8±2,5	5,5±0,2	227±21	210±47	137±95	57±21	0,5 (0,3-1,0)
TFG > 60 + A1 e A2	10 (7/3)	65,0±7,8	13,8±6,4	2 (20%)	33,4±6,0*	8,1±0,6*	305±68	143±21*	97±28	52±17	1,7 (0,5-3,4)
TFG < 60 + A3	25 (7/18)	67,4±8,0	17,8±6,5	11 (44%)	29,0±5,0	8,3±0,9	347±71*	174±54	148±64	47±22	1,0 (0,7-7,3)

IMC = índice de massa corporal; HbA1c = hemoglobina glicada; CT = colesterol total; TG = triglicérides; HDLc = HDL colesterol (média ± DP); CML = carboximetil-lisina (mediana - intervalo). * p < 0,05 em comparação ao grupo controle. Os resultados foram comparados por ANOVA de um fato de pós-teste *Dunnnett*.

Os medicamentos utilizados pelos controles e com DRD encontram-se listados na **tabela 3**. Mais de 80 % dos portadores de DRD estavam em uso de insulina; mais de 70 % destes indivíduos usavam estatina e beta-bloqueadores. O uso de inibidores de enzima conversora de angiotensina I (IECA) e de metformina foi exclusivo aos indivíduos do grupo TFG < 60 + A3 e o uso de bloqueadores do receptor de angiotensina 2 (BRA) foi de, 36%, 60% nos grupos TFG > 60 +A1 e A2 e TFG < 60 + A3. Eritropoietina foi utilizada em 12% dos indivíduos do grupo com TFG > 60 + A1 e A2, apenas.

Tabela 3. Medicamentos utilizados pelos indivíduos com DRD estratificados de acordo com TFG e taxa de EUA e controles.

	n	Insulina (%)	IECA (%)	BRA (%)	AAS (%)	Estatina (%)	Beta Bloqueador (%)	Metformina (%)	EPO (%)
Controle TFG > 60	8	-	-	-	-	1 (12,5 %)	1 (12,5 %)	-	-
TFG > 60 + A1 e A2	10	8 (80 %)	1 (10 %)	6 (60 %)	7 (70 %)	7 (70 %)	8 (80 %)	9 (90 %)	-
TFG < 60 + A3	25	25 (100 %)	-	9 (36 %)	22 (88 %)	22 (88 %)	18 (72%)	1 (4 %)	3 (12 %)

IECA = inibidores da enzima conversora de angiotensina; BRA = bloqueadores do receptor de angiotensina II; AAS = ácido acetilsalicílico; EPO = eritropoietina.

5.2. Proteômica da HDL

As proteínas associadas à HDL foram analisadas por proteômica direcionada, utilizando-se cromatografia líquida em nano escala acoplada à espectrometria de massas (Nano-LC/MS/MS). Noventa e uma proteínas foram encontradas em associação às partículas de HDL em todos os grupos experimentais. Destas, 29 proteínas foram quantificáveis (**Tabela 4**) e 2 apresentaram-se mais expressas no grupo TFG < 60 + A3 em comparação ao grupo controle: a apolipoproteína D (apoD, **figura 4A**) e a apolipoproteína A-IV (apoA-IV, **figura 4B**).

Tabela 4. Proteoma da HDL

Proteínas associadas à HDL	
Nome	Abreviatura
Alfa - 1 – antitripsina	A1AT
Apolipoproteína A-II	apoA-II
Apolipoproteína A-I	apoA-I
Apolipoproteína A-IV	apoA-IV
Apolipoproteína B-100	apoB
Apolipoproteína C-I	apoC-I
Apolipoproteína C-II	apoC-II
Apolipoproteína C-III	apoC-III
Apolipoproteína C-IV	apoC-IV
Apolipoproteína D	apoD
Apolipoproteína E	apoE

Apolipoproteína F	apoF
Apolipoproteína H	apoH
Apolipoproteína L	apoL
Apolipoproteína M	apoM
Cistatina C	CYTC
Clusterina	Clus
Complemento C3	CO3
Fosfatidilcolina-esterol aciltransferase	LCAT
Paraoxonase sérica aralisterase	PON1
Paraoxonase sérica lactonase 3	PON3
Prenilcisteína oxidase 1	PCYOX
Proteína AMBP	AMBP
Proteína amiloide sérica A-I	SAA1
Proteína amiloide sérica 4	SAA4
Proteína de transferência de fosfolípidos	PLTP
Proteína relacionada à haptoglobina	HPTR
Proteína transtirretina	TTHY
Proteína de transferência de éster de colesterol	CETP

Figura 4. Proteômica da HDL. As HDL foram isoladas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade ($D = 1,065 - 1,21 \text{ g/mL}$). Dez microgramas de proteína de HDL ($10 \mu\text{g}$) dos indivíduos com DRD e controles foram digeridas com tripsina, durante 4 h, a 37° C . As amostras foram desalinizadas e após espectrometria de massa, as proteínas identificadas foram comparadas com o proteoma humano disponível na base de dados Uniprot. As comparações por ANOVA de um fator, com pós-teste de *Dunnett*. **Painéis A:** apoD e **B:** apoA-IV.

5.3. Correlação da proteômica com taxa de excreção urinária de albumina

Observou-se correlação negativa entre a apolipoproteína A-I (apoA-I, **Figura 5A**), apolipoproteína C-IV (apoC-IV, **Figura 5C**) e proteína sérica amiloide A-4 (SAA4, **Figura 5B**) com a taxa de EUA. Correlação positiva observada entre cistatina C (**Figura 5D**) e apolipoproteína A-IV (apoA-IV, **Figura 5E**) com a taxa de EUA.

Figura 5. Correlação entre proteômica da HDL e taxa de excreção urinária de albumina. As HDL foram isoladas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade ($D = 1,063 - 1,21 \text{ g/mL}$). Dez microgramas de proteína de HDL ($10 \mu\text{g}$) dos indivíduos com DRD foram digeridas com tripsina, durante 4 h, a 37°C . As amostras foram dessalinizadas e após, espectrometria de massa, as proteínas identificadas foram comparadas com o proteoma humano disponível na base de dados Uniprot. As associações entre proteínas de HDL e taxa de EUA foram realizadas por correlação de *Spearman*. **Painéis A:** apoA-I, **B:** SAA-4; **C:** apoC-IV; **D:** cistatina C e **E:** apoA-IV.

5.4. Composição da partícula de HDL

A composição da partícula de HDL em lípidos e apoA-I está demonstrada na **figura 6**. O conteúdo das HDL em CT (**painel A**) e TG (**painel B**) foi semelhante entre todos os grupos. Observou-se diminuição no conteúdo de fosfolípidos (**painel C**) e apoA-I (**painel D**) das HDL do grupo $\text{TFG} < 60 + \text{A3}$ em comparação ao grupo controle.

A **B**

Figura 6. Composição das partículas de HDL. As HDL foram isoladas do plasma de portadores de DRD e controles, por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade. Os indivíduos foram categorizados de acordo com a taxa de filtração glomerular maior e menor que 60 e pela taxa de EUA (Controle (n = 7); TFG > 60 + A1 e A2 (n = 10); TFG < 60 + A1 (n = 25)). O conteúdo de CT, TG e fوسفولípides foi determinado por método enzimático e apoA-I, por imunoturbidimetria. Os resultados foram comparados por ANOVA de um fato com pós-teste *Dunnnett*. **Painéis A:** CT, **B:** TG; **C:** fوسفولípides e **D:** apoA-I.

5.5. Correlação entre a composição das partículas de HDL e a TFG

Observou-se correlação positiva entre fosfolípides (**Figura 7, painel A**), e apolipoproteína A-I da HDL (**Figura 7, painel B**).

A

B

Figura 7. Correlação entre a composição das partículas de HDL e a TFG. As HDL foram isoladas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade ($D = 1,063 - 1,21$ g/mL); o conteúdo de fosfolípides foi determinado por método

enzimático e apoA-I, por imunoturbidimetria. As associações entre os componentes da HDL com a TFG foram realizadas por correlação de *Spearman*. **Painéis A:** fosfolípides e **B:** apoA-I.

5.6. Determinação de pentosidina e AGE total na HDL

O conteúdo de AGE total (**Figura 8, painel A**) e pentosidina (**Figura 8, painel B**) foi determinado na HDL, sendo para ambos os casos, maior nas HDL dos indivíduos com TFG < 60 + A3 (80 % e 93,7%, respectivamente), em comparação ao grupo controle. Embora os valores de HbA1c e frutossamina tenham sido semelhantes entre os grupos, o estresse carbonila de acordo com a taxa de EUA e TFG < 60 pode ser atribuído as alterações renais que acompanham aos indivíduos com A3 e se refletem na menor destoxificação de precursores da reação de glicação e maior estresse oxidativo.

Figura 8. Determinação do conteúdo de AGE total e pentosidina na HDL. As HDL foram isoladas do plasma de portadores de DRD categorizados de acordo a taxa de filtração glomerular e com a taxa de EUA em TFG > 60 + A1 + A2 (n = 10); TFG < 60 + A3 (n = 25) e controles (n = 7). O conteúdo de AGE total (**painel A**) e pentosidina (**painel B**) foi determinado na HDL pela medida de absorbância na faixa de fluorescência em 440 nm (AGE total) e 378 nm (pentosidina). Os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Dunnett*.

5.7. Correlação entre o conteúdo de AGE total e pentosidina na HDL com a taxa de excreção urinária de albumina (EUA)

Foi observada correlação positiva entre o conteúdo de AGE total na HDL (Figura 9, painel A) e pentosidina (Figura 9, painel B) com a EUA.

Figura 9. Correlação conteúdo de AGE total e Pentosidina na HDL com a taxa de excreção urinária de albumina. As HDL foram isoladas por ultracentrifugação

em gradiente descontínuo de densidade ($D = 1,063 - 1,21 \text{ g/mL}$); o conteúdo de AGE total (A) e pentosidina (B) foi determinado na HDL pela medida de absorbância na faixa de fluorescência em 440 nm (AGE total) e 378 nm (pentosidina). As associações entre AGE total e pentosidina na HDL com a taxa de EUA foram realizadas por correlação de *Spearman*.

5.8. Quantificação da carbamoilação da HDL

A modificação de HDL por ácido ciânico que reflete o estresse urêmico foi maior no grupo com $\text{TFG} < 60 + \text{A3}$ em comparação ao grupo controle (**Figura 10**).

Figura 10. Carbamoilação da HDL. As HDL foram isoladas do plasma de portadores de DRD categorizados de acordo com a $\text{TFG} > 60 + \text{A1} + \text{A2}$ ($n = 10$) e $\text{TFG} < 60 + \text{A3}$ ($n = 25$) e indivíduos controles ($n = 7$). A carbamoilação da HDL foi determinada pelo método de ELISA. Os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Dunnett*.

5.9. Determinação do efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos mediado por HDL

As HDL foram utilizadas como aceptoras de ^{14}C -colesterol de macrófagos derivados de células da medula óssea (BMDM). Estas células foram, previamente,

sobrecarregadas com LDL acetilada e colesterol radioativo e as incubações com HDL (50 µg/mL de meio) realizadas por 6 h. Conforme pode ser observado na **figura 11**, o efluxo de ^{14}C -colesterol mediado pelas HDL isoladas do grupo TFG < 60 + A3 foi menor em comparação aquele mediado pelas HDL do grupo controle.

Figura 11. Efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos mediado por HDL. As HDL foram isoladas do plasma por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade e utilizadas como aceptores de colesterol celular. Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM), previamente sobrecarregados com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol, foram incubados com HDL (50 µg/mL). O efluxo de colesterol foi determinado após a medida da radioatividade no meio de cultura e daquela remanescente nas células, sendo calculado como: $(^{14}\text{C}\text{-colesterol no meio} / ^{14}\text{C}\text{-colesterol no meio} + ^{14}\text{C}\text{-colesterol na célula}) \times 100$. Incubações controles foram realizadas apenas na presença do meio de cultura e os resultados subtraídos daqueles obtidos na presença de HDL. Os indivíduos foram categorizados de acordo com TFG > 60 +A1 e A2 (n = 10) TFG < 60 +A3 (n = 25) e controle (n = 7). Os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste *Dunnnett*.

5.10. Determinação da atividade antioxidante da HDL

A atividade antioxidante das HDL foi determinada por meio da oxidação de LDL (isolada de plasma de doador saudável) ao longo do tempo, em incubação com sulfato de cobre e HDL dos diferentes indivíduos. Calculou-se o tempo de

retardo de oxidação da LDL conferido pela presença das HDL, o qual foi semelhante todos os grupos experimentais (**Figura 12, painel A**). A razão máxima de formação de dienos conjugados (produtos de oxidação) na LDL também foi semelhante entre os grupos (**Figura 12, painel B**).

Figura 12. Determinação da atividade antioxidante da HDL. As HDL foram isoladas do plasma de portadores de DRD categorizados de acordo TFG > 60 +A1 e A2 (n = 9) TFG < 60 +A3 (n = 21) e controles (n = 6). O tempo de retardo para oxidação de LDL (**Figura 12, painel A**) e a razão máxima de formação de dienos conjugados (**Figura 12, painel B**) foram determinados mediante incubação de LDL isolada de doador saudável na presença de solução de CuSO_4 e das HDL dos portadores de DRD e controles. Os resultados foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de *Dunnett*.

5.11. Atividade anti-inflamatória da HDL

A capacidade anti-inflamatória da HDL foi maior nos indivíduos com DRD em comparação ao grupo controle. A secreção de IL-6 (**Figura 13, painel A**) e TNF-alfa (**Figura 13, painel B**), foi menor nos macrófagos tratados com HDL dos indivíduos com TFG < 60 + A3 em comparação aos controles. Este achado deve ser consequente ao enriquecimento da HDL em apoA-IV que apresenta importante função anti-inflamatória.

Figura 13. Atividade anti-inflamatória da HDL. Macrófagos derivados de células da medula óssea (BMDM), previamente sobrecarregados com LDL acetilada foram incubados com as HDL do grupo com TFG < 60 + A3 (n = 10) e controle (n = 7). Após lavagem, as células foram tratadas com LPS, por 24 h. A concentração de citocinas foi determinada no meio de cultura por ELISA; interleucina 6 (**painel A**) e TNF-alfa (**painel B**). Os resultados foram comparados por teste t de *Student*.

6. Discussão

A incidência de complicações renais no DM é elevada, o que agrava o risco de morbi-mortalidade por DCV. Embora diversos fatores de risco para aterosclerose possam estar presentes na DRD, alterações funcionais nas HDL podem prejudicar suas ações antiaterogênicas. Neste estudo, avaliamos em indivíduos com DM2 e DRD a composição, modificação química e proteômica da HDL e sua habilidade em remover colesterol de macrófagos, inibir a oxidação de LDL e a inflamação em macrófagos.

Considerando-se a evolução da doença renal no DM, os indivíduos foram divididos de acordo com a TFG e a EUA. Esta última, embora não esteja, invariavelmente, aumentada com a perda gradual da função renal no DM, atua como elemento adicional à redução da TFG na predição de risco CV.

A análise do proteoma da HDL, em indivíduos não submetidos a terapias dialíticas, evidenciou 91 proteínas igualmente associadas as HDL de todos os grupos experimentais tanto com DM ou sem a doença, no entanto 29 proteínas foram quantificáveis. Aumento da concentração de apoA-IV naqueles com maiores valores de albuminúria e/ou redução da TFG foi um achado consistente deste estudo. A apoA-IV é uma apolipoproteína sintetizada no intestino e secretada na linfa mesentérica (Ghiselli *et al.*, 1986), sendo transportada pelos QM mas, principalmente, pelas HDL, sendo a terceira apolipoproteína mais abundante nesta lipoproteína. A apoA-IV apresenta função antiaterogênica, atuando na remoção de colesterol celular e promovendo ativação da lipoproteína lipase (Goldberg *et al.*, 1990), LCAT e CETP (Guyard-Dangremont *et al.*, 1994). Além disso, sua atividade antiaterogênica é complementada por propriedades anti-inflamatórias (Vowinkel *et*

al., 2004) e antioxidantes (Goldberg *et al.*, 1990; Steinmetz *et al.*, 1990; Duverger *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997).

Embora a apoA-IV seja glicada no plasma de DM, estudo anterior evidenciou que, apesar da grande geração de pirralina, CML e argipirimidina em sua estrutura, a apoA-IV glicada não perde sua habilidade em mediar a remoção de colesterol de macrófagos (Okuda *et al.*, 2020). Isto pode explicar o fato de não se observar maiores reduções no efluxo de colesterol, mesmo com importante aumento de AGE total e pentosidina nas HDL do grupo TFG < 60 + A3, em comparação ao grupo controle observada no presente estudo. Entretanto, a glicação da apoA-IV *in vitro* prejudica sua habilidade de inibir a resposta inflamatória promovida por lipopolissacarídeos o que regula negativamente a transcrição gênica dos receptores de HDL, ABCA-1 e ABCG-1 (Okuda *et al.*, 2020).

Diversos trabalhos demonstram que a apoA-IV pode ser utilizada como marcador precoce de perda de função renal em indivíduos com DRC e na população geral. Propõe-se uma relação causal entre função renal e concentração desta apolipoproteína, embora mais estudos sejam necessários para compreender a base fisiopatológica desta associação (Kronenberg *et al.*, 2017).

Um trabalho realizado com 124 pacientes com síndrome nefrótica observou acentuado aumento das concentrações séricas e urinárias de apoA-IV em comparação aos controles. Neste estudo a apoA-IV foi positivamente correlacionada com a concentração sérica de albumina, com correlação fraca com a proteinúria. Além disso, a apoA-IV apresentou-se aumentada de acordo com a redução da função renal (Lingenhel *et al.*, 2006), o que vai ao encontro dos nossos achados, onde se demonstrou aumento de apoA-IV nas HDL dos indivíduos do

grupo com TFG < 60 + A3 em comparação ao grupo controle e correlação positiva entre apoA-IV e taxa de EUA. Kronenberg *et al* (2002) também demonstraram que as concentrações de apoA-IV aumentam com a diminuição da função renal. Por outro lado, em indivíduos em HD, a redução de apoA-IV foi associada ao maior risco de morte por todas as causas (Kollerits *et al.*, 2012). Neste sentido, ainda é incerta a atuação da apoA-IV no risco CV da DRD, considerando-se suas ações ambíguas, na proteção cardiovascular e piora da função renal. Deve-se considerar, conforme comentado acima, a possível perda de função desta apolipoproteína frente à sua modificação por glicação e/ou carbamoilação; sendo assim o aumento de sua concentração na DRC não reflete sua ação antiaterogênica.

Além do apoA-IV, observou-se um incremento em apoD no grupo TFG < 60 + A3 em comparação ao grupo controle não-DM e com TFG > 60. A apoD é uma apolipoproteína atípica muito relacionada à proteína de ligação a retinol e que se encontra principalmente ligada à HDL. Nesta lipoproteína, ela parece contribuir para a remodelagem do núcleo hidrofóbico, uma vez que facilita a ancoragem da LCAT na HDL e carrega lisofosfatidilcolina (produto gerado pela ação da LCAT), embora não seja claro se tem o potencial de ativar ou inibir a enzima. Alguns estudos evidenciam aumento do conteúdo de apoD em áreas de lesão aterosclerótica humanas (Sarjeant *et al.*, 2003) e de camundongos *knockout* para apoE (Sarjeant *et al.*, 2003), bem como no proteoma de HDL de indivíduos com doença arterial coronariana (Vaisar *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não está claro se este aumento de apoD nestas condições refere-se à sua atuação na indução da aterosclerose ou se representa mecanismo adaptativo compensatório as alterações observadas na DCV (Perdomo *et al.*, 2009).

A cistatina e a proteína relacionada à haptoglobina apresentam correlação positiva com a taxa de EUA. A cistatina vincula-se diretamente ao prejuízo da função renal e é um indicador endógeno de função renal. Alguns estudos apontam também sua utilização como marcador de aterosclerose coroanariana e eventos cerebrovasculares, embora existam controversias (Vakili *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018).

O papel da proteína relacionada à haptoglobina não está totalmente esclarecido, seja em relação à doença renal como quanto à modulação da HDL e risco CV. Ela é uma proteína de fase aguda produzida no fígado e associada, principalmente, à apolipoproteína L-I (apoL-I) presente nas HDL, estando relacionada ao fator lítico do tripanossoma-1 (TLF1) (Hajduk *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1995).

A proteômica de HDL tem sido estudada na DRC, mas as análises, em sua grande maioria, foram realizadas com indivíduos em terapia hemodialítica, o que pode interferir nos resultados observados. Estudo realizado em pacientes com DRC em hemodiálise avaliou o proteômica da HDL, identificando 303 proteínas, das quais 122 foram selecionadas após ajustes. Apenas 40 das 122 proteínas apresentaram diferença entre os pacientes em hemodiálise e os saudáveis. Observou-se que a expressão de apoC-II e apoC-III foi maior na fração da HDL de pacientes em hemodiálise em comparação aos saudáveis. Transtirretina e a proteína relacionada à haptoglobina, apresentaram expressão significativamente mais baixa na HDL dos indivíduos em hemodiálise em comparação aos saudáveis (Mangé *et al.*, 2012).

Em indivíduos em hemodiálise, com ou sem DM, observou-se aumento de amiloide sérico A1, albumina, fosfolipase A2 e apoC-III em análise de proteoma de HDL. Juntamente com a redução no conteúdo de fosfolípidos e aumento de triglicérides e lisofosfolípidos, estas modificações vincularam-se à redução no efluxo de colesterol de macrófagos pelas HDL (Holzer *et al.*, 2011). Em outro estudo, alterações na proteômica da HDL foram encontradas em indivíduos em hemodiálise em comparação aos controles e relacionadas à alteração de função destas lipoproteínas descritas na DRC (Florens *et al.*, 2019). Shao *et al* (2015) também avaliaram o proteoma de HDL de indivíduos em hemodiálise em comparação a controles. Algumas proteínas foram marcadamente mais encontradas nas HDL dos indivíduos com DRC, em sua maioria relacionadas à injúria renal beta 2 microglobulina, fator D do complemento, cistatina C, prostaglandina-H2 D-isomerase, proteína de ligação ao retinol 4 e proteína AMBP (AMBP). Outras foram mais presentes no grupo controle, entre elas: apoA-I, apoA-II, apoL-I, apoM e PON1, o que pode conferir maior prejuízo as atividades antiaterogênicas das HDL na DRC (Shao *et al.*, 2015).

Das 122 proteínas identificadas na HDL, no estudo de Mangé *et al* (2012), 40 foram diferentemente expressas entre indivíduos com DRC em diálise e controles saudáveis. Mais recentemente, o proteoma da HDL foi analisado em 191 indivíduos com DM1, participantes do estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT). Oito proteínas foram associadas à proteinúria, embora apenas a paraoxonase 1 foi, simultaneamente, associada com a EUA e o conteúdo de cálcio na coronária (Shao *et al.*, 2019).

Wang *et al* (2018) demonstraram o enriquecimento em 8 proteínas relacionadas à inflamação e ao metabolismo lipídico (amiloide sérico A1, A2 e A4; hemoglobina beta, proteína relacionada à haptoglobina, proteína de transferência de colesterol esterificado, CETP, proteína de transferência de fosfolípidos, PLTP e Apolipoproteína E) em HDL de recém inseridos em terapia substitutiva em comparação a aqueles em tempo prologado de hemodiálise (Wang *et al.*, 2018).

A análise das HDL de pacientes em início de terapia hemodialítica (cerca de 4 meses) revelou maior quantidade de amiloide sérico A1, A2 e A4, hemoglobina beta, proteína relacionada à haptoglobina, CETP, PLTP e apoE, em comparação aos pacientes ainda sem terapia substitutiva. Entretanto, houve apenas uma tendência à redução no efluxo de colesterol. Ambos os grupos foram semelhantes quanto à porcentagem de pacientes com DM (Wang *et al.*, 2018).

Ainda na análise de proteômica, não se observou, no presente estudo, alteração no conteúdo de apoA-I, embora correlação positiva entre apoA-I medida por esta técnica e TFG tenha sido evidenciada. Interessante que a medida de apoA-I por imunoturbidimetria demonstrou menor conteúdo desta apolipoproteína nas HDL do grupo TFG < 60 + A3. Sendo assim, é possível que *in vivo*, a remoção de colesterol celular possa ser prejudicada pelo menor conteúdo de apoA-I em indivíduos com DRD francamente estabelecida. Isto não pode ser evidenciado em nosso modelo experimental, no qual as concentrações de HDL para o ensaio de remoção de colesterol de macrófagos são pareadas pelo conteúdo de proteína.

Diminuição no conteúdo de fosfolípidos da HDL também foi observada no grupo TFG < 60 + A3 em relação ao controle, e associação positiva entre fosfolípidos de HDL foi observada em relação à TFG. Notadamente, os fosfolípidos

são moduladores positivos da remoção de colesterol celular, por facilitarem a interação das HDL com domínios de membrana plasmática que garantem a exportação de colesterol por via de difusão e/ou mediada por receptores específicos.

Menor capacidade de remoção de colesterol celular foi observada nas HDL isoladas do grupo TFG < 60 + A3, em comparação ao grupo controle. A redução no efluxo de colesterol deve contribuir como importante componente para a aterogênese da DRD, e para o risco residual de doença macrovascular nestes pacientes, mesmo após controle do perfil lipídico, pressórico e outros fatores de risco.

Menor capacidade de remoção de colesterol celular foi observada em estudo com portadores de DRC nos estágios 3 e 4 em comparação a controles, embora a correção pela idade (a qual foi estatisticamente superior no grupo DRC) tenha anulado tal diferença (Kaseda *et al.*, 2018). Neste sentido, a literatura aponta para o papel do envelhecimento na redução da propriedade das HDL em mediar o transporte reverso de colesterol de macrófagos (Coronini-Huntley *et al.*, 1993; Corti *et al.*, 1997), o que constitui importante viés nos estudos de efluxo de colesterol entre portadores de DRC e controles. Além disso, no estudo de Kaseda *et al.* (2018), os casos com DRC moderada e grave foram agrupados nas análises.

Yamamoto *et al.* (2012) avaliaram a funcionalidade das HDL em pacientes em estágio avançado da DRC, em terapia dialítica. A remoção de colesterol celular foi prejudicada neles em comparação a controles saudáveis. Além disso, a diminuição na remoção de colesterol também foi observada em pacientes com DRC

e DM e com DM sem DRC em relação aos controles, sem correlação com os valores de proteína C reativa e marcadores inflamatórios (Yamamoto *et al.*, 2012).

Diferentemente de nosso estudo, outros trabalhos utilizaram o soro depletado em apoB para medir a remoção de colesterol celular. Embora, do ponto de vista lipídico, este soro contenha apenas HDL, como lipoproteína, ele contém outros componentes que modulam a remoção celular de colesterol, como albumina, insulina, haptoglobina, mediadores inflamatórios entre outros. Além disso, o soro mascara e impinge a variação nas concentrações de HDLc e apoA-I, frequentemente alteradas no DM e DRC, e que classicamente são preditores inversos de risco cardiovascular por modularem positivamente a remoção de colesterol celular.

Mier *et al* (2015) investigaram a capacidade do soro de portadores de DRC, adultos jovens e crianças, em mediar o efluxo de colesterol. Este foi reduzido apenas nos pacientes em diálise, o que se vinculou, entretanto, à menor concentração de apoA-I no soro e não, propriamente, à capacidade intrínseca das HDL em removerem colesterol celular.

De modo semelhante, Maeba *et al* (2018), reportam redução no efluxo de colesterol mediado pelo soro depletado em apoB em pacientes com DRC em estágio 5 em comparação a aqueles no estágio 3. Entretanto, não houve no estudo comparação com indivíduos controles e a redução de efluxo, entre outros aspectos, pode ser atribuída à menor concentração plasmática de HDLc nos casos em estágio 5 (Maeba *et al.*, 2018).

Monócitos isolados de pacientes com DRC em estágio 4 e 5 apresentam menor expressão de ABCA-1 com comprometimento no efluxo de colesterol para

apoA-I. No entanto, nestes mesmos pacientes a capacidade do soro depletado de apoB em remover colesterol foi preservada (Ganda *et al.*, 2017).

Na presente investigação, o grau de modificação das HDL por AGE total e pentosidina foi maior nos indivíduos com TFG < 60 + A3 em comparação ao grupo controle. Estudo realizado com indivíduos em diversos estágios da DRC em diálise peritoneal e hemodiálise demonstrou maior concentração de pentosidina no plasma, a qual se relacionou, diretamente, com a progressão da doença renal crônica. Além disso, nesse estudo, a concentração de pentosidina foi maior no estágio 5 da DRC em comparação ao estágio 1 (Machowska *et al.*, 2016).

Estudo realizado com pacientes entre os estágios 1 a 5 da DRD sem terapia dialítica ou em hemodiálise ou diálise peritoneal, evidenciou que as concentrações plasmáticas de pentosidina foram maiores entre aqueles com DRD (sem diálise, em hemodiálise ou diálise peritoneal) em comparação aos com DRC nos estágios 1,2,3, e 4. No entanto, os indivíduos em hemodiálise apresentam maiores concentração de pentosidina do que aqueles em diálise peritoneal. O aumento da pentosidina plasmática foi considerado um preditor independente de mortalidade por todas as causas e DCV associando-se a TFG baixa e com os biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação (Machowska *et al.*, 2016).

Em modelo animal de uremia, induzida em ratos por nefrectomia 5/6 observou-se maior concentração de AGE total e pentosidina o que foi prevenido pelo tratamento dos animais com o antioxidante N-acetilcisteína. Interessante que, nestes animais, não foram observadas alterações na composição de HDL em lípidos e proteínas, tampouco no efluxo de colesterol. A remoção de colesterol, mediada por HDL foi, entretanto, grandemente prejudicada pela albumina destes

animais, por meio da indução de estresse de retículo endoplasmático, o qual se vincula à redução no conteúdo do receptor de HDL, ABCA-1, o qual medeia a maior parte da exportação de colesterol de macrófagos (Machado *et al.*, 2014).

Ainda, no presente estudo, a modificação de HDL por carbamoilação foi maior no grupo TFG < 60 + A3 em comparação ao grupo controle. Sun *et al* (2016), demonstraram em casos com doença renal em hemodiálise uma concentração elevada de HDL carbamoilada, positivamente associada com a uremia. Holzer *et al* (2011), demonstraram que ocorre uma disfunção da HDL quando ela é carbamoilada, prejudicando o transporte reverso de colesterol. Em outro estudo *in vitro* (Holzer *et al.*, 2012) demonstrou-se que a carbamoilação torna a HDL disfuncional, reduzindo a atividade da paraoxonase 1.

Em indivíduos em hemodiálise observou-se menor concentração de paraoxonase associada ao maior grau de carbamoilação desta enzima, o que pode agravar o estresse oxidativo e o risco cardiovascular (Change *et al.*, 2019).

A HDL exerce funções antioxidantes e anti-inflamatórias, que protegem a LDL do dano oxidativo e do acúmulo de produtos de peroxidação primária e secundária inibindo a formação de célula espumosas de macrófagos e a oxidação da LDL. Estudos demonstram redução na propriedade antioxidante da HDL na DRC, com aumento da produção de radicais livres e da peroxidação lipídica (Jackson *et al.*, 1995). Redução nas atividades da superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase e catalase (CAT) foram evidenciadas em pacientes submetidos à hemodiálise (Durak *et al.*, 1994; Ongajooth *et al.*, 1996).

O acúmulo de AGE de baixo peso molecular em pacientes com doença renal crônica em estágio 5 está associado à redução da atividade da PON1 (Gugliucci *et*

al., 2007). O mesmo é relatado em DM, o que reduz a capacidade antioxidante da HDL (Zhou *et al.*, 2008).

Não foi observada neste estudo alteração na capacidade antioxidante da HDL, refletida pelo tempo de retardo na oxidação de LDL *in vitro* (*lag time*) e pela razão máxima de formação de dienos conjugados comparando-se a DRD e controles. Existe dificuldade na abordagem da função antioxidante das HDL, uma vez que os produtos gerados são lábeis e sofrem rápida interconversão. Além disso, há grande variação entre as formas de análise quando se utilizam modelos celulares ou ensaio puramente químicos.

A composição da HDL e suas propriedades funcionais foram avaliadas em uma coorte 526 pacientes com DRC não-dialíticos (Bauer *et al.*, 2017). Os resultados deste último, ao contrário de vários outros estudos com menor casuística, evidenciaram que a composição da HDL, sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (inferidas por meio do soro depletado em apoB e não em HDL isoladas) não são preditores independentes de desfechos cardiovasculares. Embora a atividade de paraoxonase e HDLc tenham sido associados a desfechos, após o ajuste por fatores de risco cardiovasculares e renais, esse achado não se manteve. Ainda neste estudo, os pacientes com DRC e DM apresentaram menores concentrações de HDLc, PON1 e fosfolipase A-2, e aumento de amiloide A sugerindo que a presença de DM afete a HDL na DRD (Untersteller *et al.*, 2018).

A inflamação na DRC é induzida por várias fontes de estímulos inflamatórios (Dai *et al.*, 2017). A IL-6 acelera o desenvolvimento da DRC, prejudicando o dano renal e contribuindo para lesão endotelial, favorecendo redução da expressão da

óxido nítrico sintase endotelial e adiponectina, o que se vincula ao aumento da incidência de eventos cardiovasculares na DRC (Su *et al.*, 2017).

Estudos em humanos com DM2 e em modelo animal demonstraram que as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 (IL-1), IL-6, TNF-alfa e interleucina 18 (IL-18), estão aumentadas na DRD, contribuindo para a progressão da mesma (Hasegawa *et al.*, 1991; Shikano *et al.*, 2000; Moriwaki *et al.*, 2003; Kalantarinia *et al.*, 2003).

Moriwaki *et al* (2003) demonstraram, em DM2, que a concentração de TNF-alfa no soro foi maior em comparação ao grupo controle. Entretanto, os diabéticos apresentaram concentração maior de TNF-alfa em comparação aos controles independentemente do grau de EUA, apesar de os indivíduos em estágio A2 apresentarem maior concentração de TNF-alfa em comparação aos em estágio A1.

Em relação às concentrações de IL-6, Moriwaki *et al* (2003) observaram um aumento em sua concentração de acordo com o aumento da excreção urinária de albumina.

Maior concentração sérica de IL-6 e excreção urinária desta citocina foram observadas em DRD em comparação aos controles, o que foi também relacionada com a progressão da DRD (Shikano *et al.*, 2000).

De modo semelhante, a concentração de TNF-alfa 1 e 2 é correlacionada com a gravidade da DRD (Kuo *et al.*, 2012; Klein *et al.*, 2009).

Lampropoulou *et al* (2014) demonstraram que indivíduos com DM2 apresentam uma associação entre as concentrações urinárias de TNF-alfa com a evolução da DRD, especialmente naqueles em estágio A3.

Interessantemente, a HDL isolada do grupo TFG < 60 + A3 apresentou, em comparação ao grupo controle, um grande aumento em sua capacidade anti-inflamatória, refletido pela inibição da secreção de IL-6 e TNF-alfa em macrófagos tratados com LPS. Nestas análises, devido à limitação na quantidade de amostras, não foram analisadas as HDLs do grupo TFG < 60 + A1 e A2. A melhora na atividade anti-inflamatória da HDL, mesmo na vigência de DRD franca foi atribuída ao seu enriquecimento em apoA-IV, a qual, conforme comentado anteriormente, apresenta ações anti-inflamatórias e antioxidantes. Neste aspecto, a HDL na DRD parece preservar parte de suas funções, a despeito da redução no efluxo de colesterol, a qual poderia ser ainda maior frente ao grau de modificação química destas lipoproteínas por glicação avançada e carbamoilação. Estudos posteriores, com a adição gradual de apoA-IV às partículas reconstituídas de HDL poderá auxiliar na compreensão da função desta apolipoproteína na preservação da função antioxidante da HDL e na melhora de sua ação anti-inflamatória.

7. Conclusão

Na DRD, a proteômica da HDL é alterada, em função do aumento da EUA e redução da TFG, evidenciando enriquecimento em apoA-IV e apoD. A HDL dos pacientes com DRD franca apresentam maior modificação química por glicação avançada e carbamoilação, com menor capacidade em remover colesterol de macrófagos. O maior enriquecimento em apoA-IV na HDL parece prevenir redução na atividade antioxidante da HDL e contribuir para aumentar sua capacidade anti-inflamatória. Embora a apoA-IV seja predita como marcador de disfunção renal, seu incremento na HDL contribui para preservar parte das funções desta lipoproteína na DRD.

8. Anexos

8.1. Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios de doença renal.

2. PESQUISADOR: Márcia Silva Queiroz, médica, CRM: 77963

Aécio Lopes de Araújo Lira, médico, CRM: 147659

Marisa Passareli, bióloga, responsável substituta pelo Laboratório de Lípidos (LIM 10)
da Faculdade de Medicina da USP

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório de Investigações Médicas da Faculdade de Medicina da USP – LIM 10

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

(em virtude da necessidade de coletas de sangue)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP**

1. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa mostrar que a diminuição progressiva de função renal contribui para várias mudanças metabólicas, hemodinâmicas e inflamatórias que levam a alterações em algumas proteínas e no colesterol, aumentando as chances de doenças do coração. Este estudo tem a finalidade de avaliar parâmetros relacionados a essas mudanças metabólicas e inflamatórias em diversos tipos de colesterol (gorduras do sangue) em pessoas com diabetes e doença renal crônica. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação e consentimento são muito importantes. Este termo de consentimento faz parte do processo de consentimento livre e esclarecido e tem como objetivo informar-lhe sobre o estudo e o que irá lhe acontecer se você decidir participar dele. Leia este documento atentamente para ter certeza de que entendeu todas as informações que ele apresenta.
2. Os procedimentos de rotina como coleta de amostras de sangue serão realizados por um profissional de enfermagem qualificado, após jejum de 12 horas, no início da manhã, colocando uma agulha na veia, utilizando seringas e agulhas descartáveis.
3. Os riscos e desconfortos serão mínimos, apenas decorrentes da coleta de sangue, que podem ser: dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa sem risco à saúde ou decorrentes do jejum de 12 horas, que podem ser tonturas, náuseas, mal estar ou hipoglicemias.
4. Esperamos que os resultados deste estudo contribuam para o melhor entendimento do impacto da redução progressiva da função dos rins em pessoas com diabetes no transporte e utilização do colesterol do sangue, na resposta inflamatória, desta forma, ajudando a esclarecer fatores que possam aumentar as doenças do coração.
5. A dieta e a medicação habitual serão mantidas, de acordo com recomendação médica, bem como o agendamento das consultas.
6. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Márcia Silva Queiroz, que pode ser encontrado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar sala 3305, telefone 3061-7263, e-mail: marcia.queiroz@hc.fm.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnetsp.usp.br.
7. Você tem o direito de acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas, assim como a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
8. Seu direito de confidencialidade será garantido. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
9. Toda a assistência médica será realizada pela equipe do Ambulatório de Nefropatia Diabética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
10. Não cabe indenização pelo fato do estudo apresentar risco mínimo à saúde.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.

(.....) NÃO. Eu dispenso a autorização futura para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-
HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **“Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios de doença renal”**.

Eu discuti com o Dra. Márcia Silva Queiroz sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data _____ / _____ / _____

Assinatura da testemunha Data _____ / _____ / _____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data _____ / _____ / _____

8.2. Platarfoma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios de doença renal .

Pesquisador: Márcia Silva Queiroz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65670017.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.982.033

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de coorte transversal envolvendo indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2, diagnosticados há pelo menos 10 anos, com idade superior a 45 anos, ambos os sexos, com doença renal diabética estágio 1 a 5 ou em terapia renal substitutiva e valores de hemoglobina glicada entre 7-9%, em seguimento regular no Hospital das Clínicas da FMUSP. Os pesquisadores vão avaliar o transporte reverso de colesterol, inflamação e estresse do retículo endoplasmático. O projeto apresenta seus objetivos bem descritos, faz parte da linha de pesquisa dos pesquisadores e o TCLE obedece as normas exigidas pela comissão.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores pretendem avaliar o papel das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes. Os objetivos estão claros e apresentam relevância científica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O desenvolvimento do protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa e trarão a longo prazo esclarecimentos sobre a patogênese da doença.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.982.033

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância na área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado e cumpre as regras exigidas pela comissão.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_702936.pdf	13/03/2017 21:14:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_DRD_e_transporte_cholesterol.docx	13/03/2017 21:13:31	Márcia Silva Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DRD_e_transporte_cholesterol_2017.pdf	13/03/2017 21:11:15	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Outros	documento_cappesq.pdf	13/03/2017 21:05:38	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	13/03/2017 21:04:04	Márcia Silva Queiroz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 1.982.033

Não

SAO PAULO, 24 de Março de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios de doença renal .

Pesquisador: Márcia Silva Queiroz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65670017.5.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.397.639

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda a o projeto "Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios de doença renal". Os pesquisadores solicitaram a inclusão da aluna de mestrado Monique de Fátima Mello Santana, orientada pela Profa. Dra. Marisa Passarelli. O projeto e a coleta de amostras não foram alteradas nesta emenda. A emenda é pertinente e não traz riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de um estudo de coorte transversal envolvendo indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2, diagnosticados há pelo menos 10 anos, com idade superior a 45 anos, ambos os sexos, com doença renal diabética estágio 1 a 5 ou em terapia renal substitutiva e valores de hemoglobina glicada entre 7-9%, em seguimento regular no Hospital das Clínicas da FMUSP. Os objetivos são relevantes e não foram alterados com a emenda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O Protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.397.639

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda solicitada é pertinente para o desenvolvimento do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado e não foi alterado.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1019495_E1.pdf	30/10/2017 16:41:57		Aceito
Outros	formulario_emenda.pdf	30/10/2017 16:41:20	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_DRD_e_transporte_coolesterol.docx	13/03/2017 21:13:31	Márcia Silva Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DRD_e_transporte_coolesterol_2017.pdf	13/03/2017 21:11:15	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Outros	documento_cappesq.pdf	13/03/2017 21:05:38	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	13/03/2017 21:04:04	Márcia Silva Queiroz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.397.639

SAO PAULO, 24 de Novembro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8.3. Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios da Doença Renal Diabética”, registrada com o nº 1015/2018, sob a responsabilidade de Marisa Passarelli e Aécio Lopes de Araujo Lira, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 21.03.18

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03-04-2018 Término: 03-04-2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	72
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 21 de Março de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

9. Referências

- Adachi H, Tsujimoto M. FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J Biol Chem*. 2002;277(37):34264-34270.
- American diabetes association diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33(supplement 1):62-69.
- Andrades ME, Lorenzi R, Berger M, Guimarães JA, Moreira JC, Dal-Pizzol F. Glycolaldehyde induces fibrinogen post-translational modification, delay in clotting and resistance to enzymatic digestion. *Chem Biol Interact*. 2009;180(3):478–484.
- Apostolov EO, Ray D, Savenka AV, Shah SV, Basnakian AG. Chronic uremia stimulates LDL carbamylation and atherosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(11):1852–1857.
- Apostolov EO, Shah SV, Ok E, Basnakian AG. Carbamylated low-density lipoprotein induces monocyte adhesion to endothelial cells through intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(4):826–832.
- Apostolov EO, Shah SV, Ray D, Basnakian AG. Scavenger receptors of endothelial cells mediate the uptake and cellular proatherogenic effects of carbamylated LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(10):1622–1630.
- Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, et al. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(1):11–20.
- Attman PO, Samuelsson O, Alaupovic P. Lipoprotein metabolism and renal failure. *Am J Kidney Dis*. 1993;21(6):573–592.
- Attman PO, Samuelsson O, Johansson AC, Moberly JB, Alaupovic P. Dialysis modalities and dyslipidemia. *Kidney Int Suppl*. 2003;(84):S110–S112.

- Ayo SH, Radnik R, Garoni JA, Troyer DA, Kreisberg JI. High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am J Physiol.* 1991;261(4 Pt 2):F571–F577.
- Baigent C, Landray MJ, Reith C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2011;377(9784):2181–2192.
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res.* 2004;95(8):764–772.
- Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(9):3178–3182.
- Bauer L, Kern S, Rogacev KS, et al. HDL Cholesterol Efflux Capacity and Cardiovascular Events in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(2):246–247.
- Berg AH, Drechsler C, Wenger J, et al. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. *Sci Transl Med.* 2013;5(175):175ra29.
- Bermúdez-López M, Arroyo D, Betriu À, Masana L, Fernández E, Valdivielso JM. New perspectives on CKD-induced dyslipidemia. *Expert Opin Ther Targets.* 2017;21(10):967–976.
- Brunelli SM, Thadhani RI, Lynch KE, et al. Association between long-term blood pressure variability and mortality among incident hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2008;52(4):716–726.
- Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(7):1117–1128.

- Cerami C, Founds H, Nicholl I, et al. Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(25):13915–13920.
- Chang CT, Lim YP, Lee CW, et al. PON-1 carbamylation is enhanced in HDL of uremia patients. *J Food Drug Anal*. 2019;27(2):542–550.
- Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*. 2017;132:19–27.
- Christison JK, Rye KA, Stocker R. Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1995;36(9):2017–2026.
- Cohen RD, Castellani LW, Qiao JH, Van Lenten BJ, Lusis AJ, Reue K. Reduced aortic lesions and elevated high density lipoprotein levels in transgenic mice overexpressing mouse apolipoprotein A-IV. *J Clin Invest*. 1997;99(8):1906–1916.
- Cornoni-Huntley J, Ostfeld AM, Taylor JO, et al. Established populations for epidemiologic studies of the elderly: study design and methodology. *Aging (Milano)*. 1993;5(1):27–37.
- Corti MC, Guralnik JM, Salive ME, et al. Clarifying the direct relation between total cholesterol levels and death from coronary heart disease in older persons. *Ann Intern Med*. 1997;126(10):753–760.
- Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?. *Circulation*. 2006;113(21):2548–2555.
- Daffu G, Shen X, Senatus L, et al. RAGE Suppresses ABCG1-Mediated Macrophage Cholesterol Efflux in Diabetes. *Diabetes*. 2015;64(12):4046–4060.
- Dai L, Golembiewska E, Lindholm B, Stenvinkel P. End-Stage Renal Disease, Inflammation and Cardiovascular Outcomes. *Contrib Nephrol*. 2017;191:32–43.
- de Sain-van der Velden MG, Rabelink TJ, Reijngoud DJ, Gadellaa MM, Voorbij HA, Stellaard F, Kaysen GA. Plasma alpha 2 macroglobulin is increased in

- nephrotic patients as a result of increased synthesis alone. *Kidney Int.* 1998;54(2):530-5.
- Dirnhuber P, Schütz F. The isomeric transformation of urea into ammonium cyanate in aqueous solutions. *Biochem J.* 1948;42(4):628–632.
- Drüeke TB, Nguyen Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Lacour B, Descamps-Latscha B. Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001;78:S114–S119.
- Durak I, Akyol O, Başeşme E, Canbolat O, Kavutçu M. Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron.* 1994;66(1):76–80.
- Duverger N, Tremp G, Caillaud JM, et al. Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV. *Science.* 1996;273(5277):966–968.
- Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11654–11660.
- Ekinci EI, Jerums G, Skene A, et al. Renal structure in normoalbuminuric and albuminuric patients with type 2 diabetes and impaired renal function. *Diabetes Care.* 2013;36(11):3620–3626.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 1989;6(1):67–75.
- Fellström, B.C.; Jardine, A.G.; Schmieder, R.E.; Holdaas, H.; Bannister, K.; Beutler, J.; Chae, D.-W.; Chevaile, A.; Cobbe, S.M.; Grönhagen-Riska, C.; et al. for the AURORA Study Group. Rosuvastatin and Cardiovascular Events in Patients Undergoing Hemodialysis. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 1395–1407.

- Florens N, Calzada C, Delolme F, et al. Proteomic Characterization of High-Density Lipoprotein Particles from Non-Diabetic Hemodialysis Patients. *Toxins (Basel)*. 2019;11(11):671.
- Forte TM, Bielicki JK, Goth-Goldstein R, Selmek J, McCall MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation of nascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. *J Lipid Res*. 1995;36(1):148-57.
- Ganda A, Yvan-Charvet L, Zhang Y, et al. Plasma metabolite profiles, cellular cholesterol efflux, and non-traditional cardiovascular risk in patients with CKD. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;112:114–122.
- Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes. A collaborative meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int*. 2011 Jul;80(1):93-104.
- Garner B, Waldeck AR, Witting PK, Rye KA, Stocker R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem*. 1998;273(11):6088–6095.
- Gencer B, Kronenberg F, Stroes ES, Mach F. Lipoprotein(a): the revenant. *Eur Heart J*. 2017;38(20):1553–1560.
- Ghiselli G, Krishnan S, Beigel Y, Gotto AM Jr. Plasma metabolism of apolipoprotein A-IV in humans. *J Lipid Res*. 1986;27(8):813–827.
- Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(6):956–968.
- Glodny B, Nasser P, Rehder P, Unterholzner V, Plaikner M, Koppelstätter C, Petersen J. Reduced glomerular filtration rate due to loss of nephron mass

may be an independent risk factor for atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jun;26(6):1882-7.

Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem*. 1990;265(8):4266–4272.

Groop PH, Thomas MC, Moran JL, et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009;58(7):1651–1658.

Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin Chim Acta*. 2007;377(1-2):213–220.

Guyard-Dangremont V, Lagrost L, Gamber P. Comparative effects of purified apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV on cholesteryl ester transfer protein activity. *J Lipid Res*. 1994;35(6):982–992.

Hajduk SL, Moore DR, Vasudevacharya J, et al. Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. *J Biol Chem*. 1989;264(9):5210–5217.

Halimi JM. The emerging concept of chronic kidney disease without clinical proteinuria in diabetic patients. *Diabetes Metab*. 2012;38(4):291–297.

Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, et al. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 1991;40(6):1007–1012.

Hassan M, Philip P. CANHEART: Is HDL cholesterol a cardiovascular specific risk factor?. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2016;2016(4):e201634.

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955;34:1345-1353.

He CJ, Koschinsky T, Buening C, Vlassara H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol Med*. 2001;7(3):159–168.

- Henle T, Miyata T. Advanced glycation end products in uremia. *Adv Ren Replace Ther.* 2003;10(4):321–331.
- Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, et al. Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(9):1631–1641.
- Holzer M, Gauster M, Pfeifer T, et al. Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(12):2337–2346.
- Holzer M, Schilcher G, Curcic S, et al. Dialysis Modalities and HDL Composition and Function. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(9):2267–2276.
- Holzer M, Zangger K, El-Gamal D, et al. Myeloperoxidase-derived chlorinating species induce protein carbamylation through decomposition of thiocyanate and urea: novel pathways generating dysfunctional high-density lipoprotein. *Antioxid Redox Signal.* 2012;17(8):1043–1052.
- Hörl WH, Cohen JJ, Harrington JT, Madias NE, Zusman CJ. Atherosclerosis and uremic retention solutes. *Kidney Int.* 2004;66(4):1719–1731.
- Iborra RT, Machado-Lima A, Okuda LS, et al. AGE-albumin enhances ABCA1 degradation by ubiquitin-proteasome and lysosomal pathways in macrophages. *J Diabetes Complications.* 2018;32(1):1–10.
- IDF. *IDF Diabetes Atlas 2019 International Diabetes Federation.* 2019.
- Inker LA, Astor BC, Fox CH, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(5):713–735.
- Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1273042.
- Jackson P, Loughrey CM, Lightbody JH, McNamee PT, Young IS. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin Chem.* 1995;41(8 Pt 1):1135–1138.

- Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. *Clin Chem*. 2010;56(9):1401–1412.
- Jaisson S, Kazes I, Desmons A, et al. Homocitrulline as marker of protein carbamylation in hemodialyzed patients. *Clin Chim Acta*. 2016;460:5–10.
- Jaisson S, Kerkeni M, Santos-Weiss IC, Addad F, Hammami M, Gillery P. Increased serum homocitrulline concentrations are associated with the severity of coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53(1):103–110.
- Jiang J, Chen P, Chen J, et al. Accumulation of tissue advanced glycation end products correlated with glucose exposure dose and associated with cardiovascular morbidity in patients on peritoneal dialysis. *Atherosclerosis*. 2012;224(1):187–194.
- Jono T, Kimura T, Takamatsu J, et al. Accumulation of imidazolone, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. *Pathol Int*. 2002;52(9):563–571.
- Jurek A, Turyna B, Kubit P, Klein A. The ability of HDL to inhibit VCAM-1 expression and oxidized LDL uptake is impaired in renal patients. *Clin Biochem*. 2008;41(12):1015–1018.
- Kalantarinia K, Awad AS, Siragy HM. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF-alpha increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. *Kidney Int*. 2003;64(4):1208–1213.
- Kalim S, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. Protein carbamylation in kidney disease: pathogenesis and clinical implications. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(5):793–803.
- Kalousová M, Havrdová E, Mrázová K, et al. Advanced glycoxidation end products in patients with multiple sclerosis. *Prague Med Rep*. 2005;106(2):167–174.

- Kaseda R, Tsuchida Y, Yang HC, et al. Chronic kidney disease alters lipid trafficking and inflammatory responses in macrophages: effects of liver X receptor agonism. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):17.
- Kashyap SR, Osme A, Ilchenko S, et al. Glycation Reduces the Stability of ApoA1 and Increases HDL Dysfunction in Diet-Controlled Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(2):388–396.
- Kasiske BL, Wheeler DC. The management of dyslipidemia in CKD: new analyses of an expanding dataset. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(3):371–374.
- Klein BE, Knudtson MD, Tsai MY, Klein R. The relation of markers of inflammation and endothelial dysfunction to the prevalence and progression of diabetic retinopathy: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(9):1175–1182.
- Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG. Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure: role of excess parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1996;97(10):2167–2173.
- Kollerits B, Krane V, Drechsler C, et al. Apolipoprotein A-IV concentrations and clinical outcomes in haemodialysis patients with type 2 diabetes mellitus--a post hoc analysis of the 4D Study. *J Intern Med.* 2012;272(6):592–600.
- Koyama H, Nishizawa Y. AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD?. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(7):623–635.
- Kronenberg F, Kuen E, Ritz E, et al. Apolipoprotein A-IV serum concentrations are elevated in patients with mild and moderate renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(2):461–469.
- Kronenberg F. Apolipoprotein L1 and apolipoprotein A-IV and their association with kidney function. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(1):39–45.
- Kuchta A, Ćwiklińska A, Czaplińska M, et al. Plasma Levels of Pre β 1-HDL Are Significantly Elevated in Non-Dialyzed Patients with Advanced Stages of Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5):1202.

- Kuo JZ, Guo X, Klein R, et al. Systemic soluble tumor necrosis factor receptors 1 and 2 are associated with severity of diabetic retinopathy in Hispanics. *Ophthalmology*. 2012;119(5):1041–1046.
- Kurosaki Y, Imoto A, Kawakami F, et al. Oxidative stress increases megalin expression in the renal proximal tubules during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(3):F462–F470.
- Kwan BC, Kronenberg F, Beddhu S, Cheung AK. Lipoprotein metabolism and lipid management in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1246–1261.
- Laggner P, Stabinger H, Kostner GM. Separation of subclasses of human serum high density lipoproteins by zonal ultracentrifugation. *Prep Biochem*. 1977;7(1):33–43.
- Lampropoulou IT, Stangou M, Papagianni A, Didangelos T, Iliadis F, Efstratiadis G. TNF- α and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Res*. 2014;2014:394206.
- Levinson SS, Wagner SG. Implications of reverse cholesterol transport: recent studies. *Clin Chim Acta*. 2015;439:154–161.
- Liang K, Kim CH, Vaziri ND. HMG-CoA reductase inhibition reverses LCAT and LDL receptor deficiencies and improves HDL in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(3):F539-44.
- Linden E, Cai W, He JC, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3(3):691–698.
- Lingenhel A, Lhotta K, Neyer U, et al. Role of the kidney in the metabolism of apolipoprotein A-IV: influence of the type of proteinuria. *J Lipid Res*. 2006;47(9):2071–2079.

- Lowenstein CJ, Cameron SJ. High-density lipoprotein metabolism and endothelial function. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(2):166–170.
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–275.
- Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012, 380, 2095–2128.
- Lund-Katz S, Liu L, Thuahnai ST, Phillips MC. High density lipoprotein structure. *Front Biosci.* 2003;8:d1044–d1054.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-241.
- 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 JT, Iborra RT, Fusco FB, et al. N-acetylcysteine prevents endoplasmic reticulum stress elicited in macrophages by serum albumin drawn from chronic kidney disease rats and selectively affects lipid transporters, ABCA-1 and ABCG-1. *Atherosclerosis.* 2014;237(1):343–352.
- Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, et al. In type 2 diabetes mellitus glycated albumin alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Cell Physiol.* 2015;230(6):1250–1257.
- Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Sartori CH, Oliveira ER, Nakandakare ER, Stefano JT, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML, Passarelli M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1-

- mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013 Jan;29(1):66-76.
- Machowska A, Sun J, Qureshi AR, et al. Plasma Pentosidine and Its Association with Mortality in Patients with Chronic Kidney Disease. *PLoS One*. 2016;11(10):e0163826.
- Macisaac RJ, Jerums G. Diabetic kidney disease with and without albuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(3):246-257.
- Macisaac RJ, Panagiotopoulos S, McNeil KJ, et al. Is nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes related to an increase in intrarenal vascular disease?. *Diabetes Care*. 2006;29(7):1560–1566.
- MacLean B, Tomazela DM, Shulman N, Chambers M, Finney GL, Frewen B, Kern R, Tabb DL, Liebler DC, MacCoss MJ. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics*. 2010;26(7):966-8.
- Maeba R, Kojima KI, Nagura M, et al. Association of cholesterol efflux capacity with plasmalogen levels of high-density lipoprotein: A cross-sectional study in chronic kidney disease patients. *Atherosclerosis*. 2018;270:102–109.
- Maeda S, Nakanishi S, Yoneda M, et al. Associations between small dense LDL, HDL subfractions (HDL2, HDL3) and risk of atherosclerosis in Japanese-Americans. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(5):444–452.
- Mangé A, Goux A, Badiou S, et al. HDL proteome in hemodialysis patients: a quantitative nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach. *PLoS One*. 2012;7(3):e34107.
- Mathur S, Devaraj S, Jialal I. Accelerated atherosclerosis, dyslipidemia, and oxidative stress in end-stage renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(2):141–147.
- Meerwaldt R, Zeebregts CJ, Navis G, Hillebrands JL, Lefrandt JD, Smit AJ. Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;53(1):138–150.

- Meier SM, Wultsch A, Hollaus M, et al. Effect of chronic kidney disease on macrophage cholesterol efflux. *Life Sci.* 2015;136:1–6.
- Mera K, Anraku M, Kitamura K, et al. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens Res.* 2005;28(12):973–980.
- Miyata A, Inglis V, Aoki T. Rapid identification of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* by the polymerase chain reaction. *Aquaculture.* 1996;141(1-2):13-24.
- Miyata S, Koshikawa N, Higashi S, et al. Expression of trypsin in human cancer cell lines and cancer tissues and its tight binding to soluble form of Alzheimer amyloid precursor protein in culture. *J Biochem.* 1999;125(6):1067–1076.
- Miyata T, Fu MX, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Thorpe SR, Baynes JW. Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia?. *Kidney Int.* 1998;54(4):1290–1295.
- Molitch ME, Adler AI, Flyvbjerg A, et al. Diabetic kidney disease: a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes. *Kidney Int.* 2015;87(1):20–30.
- Molitch ME, Steffes M, Sun W, et al. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care.* 2010;33(7):1536–1543.
- Moradi H, Pahl MV, Elahimehr R, Vaziri ND. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. *Transl Res.* 2009;153(2):77–85.
- Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism.* 2003;52(5):605–608.

- Nambi V, Ballantyne CM. Fat, fit, and leading the charge: the evolution of measuring high-density lipoprotein subpopulations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2013-2015.
- Newman DJ, Mattock MB, Dawney AB, et al. Systematic review on urine albumin testing for early detection of diabetic complications. *Health Technol Assess.* 2005;9(30):iii–163.
- Nicolas C, Jaisson S, Gorisse L, et al. Carbamylation is a competitor of glycation for protein modification in vivo. *Diabetes Metab.* 2018;44(2):160–167.
- Nofer JR, van der Giet M, Tölle M, et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest.* 2004;113(4):569–581.
- Okuda LS, Castilho G, Rocco DD, et al. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(12):1485-1492
- Okuda LS, Iborra RT, Pinto PR, et al. Advanced glycated apoA-IV loses its ability to prevent the LPS-Induced reduction in cholesterol efflux-related gene expression in macrophages. *Mediators of inflammation.* Article ID 6515401. doi.org/10.1155/2020/6515401
- Ongajooth L, Ongajyooth S, Likidlilid A, Chantachum Y, Shayakul C, Nilwarangkur S. Role of lipid peroxidation, trace elements and anti-oxidant enzymes in chronic renal disease patients. *J Med Assoc Thai.* 1996;79(12):791–800.
- Pageon H, Bakala H, Monnier VM, Asselineau D. Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. *Eur J Dermatol.* 2007;17(1):12–20.
- Panzenböck U, Stocker R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1703(2):171–181.

- Park L, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med*. 1998;4(9):1025–1031.
- Park LK, Friso S, Choi SW. Nutritional influences on epigenetics and age-related disease. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(1):75–83.
- Penno G, Solini A, Bonora E, et al. Clinical significance of nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetes. *J Hypertens*. 2011;29(9):1802–1809.
- Perdomo G, Henry Dong H. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(1):17–27.
- Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE, Silva KH, Weinberg J, Warram JH, Krolewski AS. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1353-61.
- Perkovic V, Verdon C, Ninomiya T, et al. The relationship between proteinuria and coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2008;5(10):e207.
- Rabbani N, Chittari MV, Bodmer CW, Zehnder D, Ceriello A, Thornalley PJ. Increased glycation and oxidative damage to apolipoprotein B100 of LDL cholesterol in patients with type 2 diabetes and effect of metformin. *Diabetes*. 2010;59(4):1038–1045.
- Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(12):1695-727.
- Rigalleau V, Lasseur C, Raffaitin C, Beauvieux MC, Barthe N, Chauveau P, Combe C, Gin H. Normoalbuminuric renal-insufficient diabetic patients: a lower-risk group. *Diabetes Care*. 2007;30(8):2034-9.
- Rodrigues TC, Pecis M, Canani LH, et al. Caracterização de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 do sul do Brasil: complicações crônicas e fatores associados [Characterization of patients with type 1 diabetes mellitus in

- southern Brazil: chronic complications and associated factors]. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2010;56(1):67–73.
- Rubinow KB, Henderson CM, Robinson-Cohen C, et al. Kidney function is associated with an altered protein composition of high-density lipoprotein. *Kidney Int*. 2017;92(6):1526–1535.
- Sarjeant JM, Lawrie A, Kinnear C, et al. Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(12):2172–2177.
- Sarnak MJ, Amann K, Bangalore S, Cavalcante JL, Charytan DM, Craig JC, Gill JS, Hlatky MA, Jardine AG, Landmesser U, Newby LK, Herzog CA, Cheung M, Wheeler DC, Winkelmayer WC, Marwick TH; Conference Participants. *J Am Coll Cardiol*. 2019;74(14):1823-1838.
- Saulnier PJ, Wheelock KM, Howell S, et al. Advanced Glycation End Products Predict Loss of Renal Function and Correlate With Lesions of Diabetic Kidney Disease in American Indians With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(12):3744–3753.
- Scarpioni R, Ricardi M, Albertazzi V, Melfa L. Treatment of dyslipidemia in chronic kidney disease: Effectiveness and safety of statins. *World J Nephrol*. 2012;1(6):184–194.
- Scheffel RS, Bortolanza D, Weber CS, et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares e de seus fatores de risco em pacientes com diabetes melito do tipo 2 em atendimento ambulatorial [Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus]. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2004;50(3):263–267.
- Sebeková K, Krajciová-Kudlácková M, Schinzel R, Faist V, Klvanová J, Heidland A. Plasma levels of advanced glycation end products in healthy,

- long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. *Eur J Nutr.* 2001;40(6):275–281.
- Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Martins CT. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. *J Bras Nefrol.* 2017;39(3):261–266.
- Shao B, de Boer I, Tang C, et al. A Cluster of Proteins Implicated in Kidney Disease Is Increased in High-Density Lipoprotein Isolated from Hemodialysis Subjects. *J Proteome Res.* 2015;14(7):2792–2806.
- Shao B, Zelnick LR, Wimberger J, et al. Albuminuria, the High-Density Lipoprotein Proteome, and Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(7):1483–1491.
- Sharabas I, Siddiqi N. Cardiovascular disease risk profiles comparison among dialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2016;27(4):692–700.
- Shikano M, Sobajima H, Yoshikawa H, et al. Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron.* 2000;85(1):81–85.
- Shoji T, Nishizawa Y, Kawagishi T, Tanaka M, Kawasaki K, Tabata T, Inoue T, Morii H. Atherogenic lipoprotein changes in the absence of hyperlipidemia in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. *Atherosclerosis.* 1997;131(2):229–36.
- Siemens, T.A.; Riella, M.C.; Moraes, T.P.; Riella, C.V. APOL1 risk variants and kidney disease: What we know so far. *J. Bras. Nefrol.* 2018, 40, 388–402.
- Silva ARM, Toyoshima MTK, Passarelli M, Di Mascio P, Ronsein GE. Comparing data-independent acquisition and parallel reaction monitoring in their abilities to differentiate high-density lipoprotein subclasses. *J Proteome Res.* 2020;19(1):248–259.
- Smink PA, Lambers Heerspink HJ, Gansevoort RT, et al. Albuminuria, estimated GFR, traditional risk factors, and incident cardiovascular disease: the PREVEND (Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease) study. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(5):804–811.

- Smith AB, Esko JD, Hajduk SL. Killing of trypanosomes by the human haptoglobin-related protein. *Science*. 1995;268(5208):284–286.
- Sotokawauchi A, Matsui T, Higashimoto Y, Yamagishi SI. Fructose causes endothelial cell damage via activation of advanced glycation end products-receptor system. *Diab Vasc Dis Res*. 2019;16(6):556-561.
- STARK GR. ON THE REVERSIBLE REACTION OF CYANATE WITH SULFHYDRYL GROUPS AND THE DETERMINATION OF NH₂-TERMINAL CYSTEINE AND CYSTINE IN PROTEINS. *J Biol Chem*. 1964;239:1411–1414.
- Stark GR. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. 3. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*. 1965;4(6):1030–1036.
- Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*. 1999;144(2):285–301.
- Steinmetz A, Barbaras R, Ghalim N, Clavey V, Fruchart JC, Ailhaud G. Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells. *J Biol Chem*. 1990;265(14):7859–7863.
- Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol*. 2017;8:405.
- Subbiah AK, Chhabra YK, Mahajan S. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: a neglected subgroup. *Heart Asia*. 2016;8(2):56–61.
- Sun JT, Yang K, Lu L, et al. Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;310(6):F511–F517.
- Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;161(2):245–254.

- Tang WH, Shrestha K, Wang Z, et al. Protein carbamylation in chronic systolic heart failure: relationship with renal impairment and adverse long-term outcomes. *J Card Fail*. 2013;19(4):219–224.
- Thomas MC, Cooper ME, Zimmet P. Changing epidemiology of type 2 diabetes mellitus and associated chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(2):73–81.
- Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:111–117.
- Tsalamandris C, Allen TJ, Gilbert RE, Sinha A, Panagiotopoulos S, Cooper ME, Jerums G. Progressive decline in renal function in diabetic patients with and without albuminuria. *Diabetes*. 1994;43(5):649-55.
- Untersteller K, Meissl S, Trieb M, et al. HDL functionality and cardiovascular outcome among nondialysis chronic kidney disease patients. *J Lipid Res*. 2018;59(7):1256–1265.
- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911–16.e12.
- Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest*. 2007;117(3):746–756.
- Vaisar T, Tang C, Babenko I, et al. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*. 2015;56(8):1519–1530.
- Vaisar T. Proteomics investigations of HDL: challenges and promise. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(4):410–421.
- Vakili H, Mohamadian A, Naderian M, Khareshi I. Cystatin C may not be a precious predictor for coronary artery disease and its severity: an area of uncertainty. *Acta Biomed*. 2018;89(2):209–213.

- Vaziri ND, Liang K. Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure. *Kidney Int.* 1997;51(3):913–919.
- Vaziri ND, Norris K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2011;31(1-3):189–196.
- Vaziri ND. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure. *Semin Dial.* 2009;22(6):644–651.
- Vaziri ND. Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(2):F262–F272.
- Vaziri ND. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2010 Sep;20(5 Suppl):S35-43.
- Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):12043–12047.
- Vlassara H, Uribarri J, Ferrucci L, et al. Identifying advanced glycation end products as a major source of oxidants in aging: implications for the management and/or prevention of reduced renal function in elderly persons. *Semin Nephrol.* 2009;29(6):594–603.
- Vowinkel T, Mori M, Kriegelstein CF, et al. Apolipoprotein A-IV inhibits experimental colitis. *J Clin Invest.* 2004;114(2):260–269.
- Vupputuri S, Nichols GA, Lau H, Joski P, Thorp ML. Risk of progression of nephropathy in a population-based sample with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011 Feb;91(2):246-52.
- Wang K, Zelnick LR, Hoofnagle AN, et al. Alteration of HDL Protein Composition with Hemodialysis Initiation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(8):1225–1233.

- Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med.* 2007;13(10):1176–1184.
- Wanner C, Krane V, März W, et al. Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis [published correction appears in *N Engl J Med.* 2005 Oct 13;353(15):1640]. *N Engl J Med.* 2005;353(3):238–248.
- Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238–1252.
- Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, et al. Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(5):934–947.
- Winnie AP, Nader AM. Santayana's prophecy fulfilled. *Reg Anesth Pain Med.* 2001;26(6):558–564.
- Witztum JL, Mahoney EM, Branks MJ, Fisher M, Elam R, Steinberg D. Nonenzymatic glucosylation of low-density lipoprotein alters its biologic activity. *Diabetes.* 1982;31(4 Pt 1):283–291.
- Wróblewska M. The origin and metabolism of a nascent pre- β high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux. *Acta Biochim Pol.* 2011;58(3):275-85.
- Wu MF, Xu KZ, Guo YG, Yu J, Wu Y, Lin LM. Lipoprotein(a) and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Current Understanding and Future Perspectives. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019;33(6):739–748.
- Yamamoto S, Yancey PG, Ikizler TA, et al. Dysfunctional high-density lipoprotein in patients on chronic hemodialysis. *J Am Coll Cardiol.* 2012;60(23):2372–2379.
- Yasuda H, Tochigi Y, Katayama K, Suzuki H. Progression of renal fibrosis in congenital CKD model rats with reduced number of nephrons. *Exp Toxicol Pathol.* 2017;69(5):245–258.

- Zhou H, Tan KC, Shiu SW, Wong Y. Increased serum advanced glycation end products are associated with impairment in HDL antioxidative capacity in diabetic nephropathy [published correction appears in Nephrol Dial Transplant. 2008 Jun;23(6):2109]. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(3):927–933.
- Zhou L, Li C, Gao L, Wang A. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). Mol Med Rep. 2015 Sep;12(3):4015-4021.
- Zhu Z, Zhong C, Xu T, et al. Prognostic significance of serum cystatin C in acute ischemic stroke patients according to lipid component levels. Atherosclerosis. 2018;274:146–151.