CARLOS ANDRÉ MINANNI

**Redução da modificação da albumina por glicação
avançada no diabetes mellitus reestabelece a
homeostase de colesterol em macrófagos**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Minanni, Carlos André

Redução da modificação da albumina por glicação
avançada no diabetes mellitus reestabelece a
homeostase de colesterol em macrófagos / Carlos
André Minanni. -- São Paulo, 2020.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Diabetes mellitus
3.Colesterol 4.Produtos finais de glicação avançada
5.HDL-colesterol 6.Transportadores de cassetes de
ligação de ATP

USP/FM/DBD-217/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

- Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM-10), com a colaboração do Laboratório de Carboidratos (LIM-18) e do Ambulatório de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Projeto foi registrado na Plataforma Brasil (Parecer #2.453.384), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP e Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA #071/2017) da Faculdade de Medicina da USP;
- Apoio financeiro FAPESP (2015/21072-5).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que com muito carinho, não mediram esforços para que eu pudesse evoluir. Aos meus pais, cujos sacrifícios permitiram que eu chegasse até aqui. À minha irmã, por vibrar com minhas conquistas. Aos meus tios, por todo apoio. À minha tia, em especial, que sempre me orientou durante toda esta trajetória. Aos meus avós Ana, Teresinha (i.m.), Dovílio (i.m.) e Adelino (i.m.), por acreditarem no meu potencial. E à minha noiva e companheira Cláudia, pelo amor, parceria e bom-humor que movem nossa relação.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Marisa Passarelli, pela paciência e pelo tempo despendido na minha orientação, tem minha admiração como professora e pesquisadora. Agradeço seus ensinamentos, dentro e fora da vida acadêmica, sua disponibilidade e seus exemplos como pessoa e mãe.

À Dra. Adriana Machado Saldiba de Lima e Dr. Rodrigo Tallada Iborra, pelo acolhimento desde o início do projeto, pelo apoio e pela partilha do conhecimento, alicerces sem os quais esta tese não teria sido possível.

Ao Dr. Raphael de Souza Pinto e Dra. Lígia Shimabukuro Okuda, por todo entusiasmo e ensinamentos, mesmo aos finais de semana e madrugada. Agradeço o companheirismo e companhia.

À Me. Monique de Fátima Mello Santana e Dr. Aécio Lira, parceiros de bancada, agradeço enormemente a ajuda de vocês, fico feliz ao ver o quanto evoluímos juntos neste período.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, pelo incentivo aos nossos trabalhos, compartilhando sempre sua experiência científica e prática clínica.

Ao Professor Éder Quintão, pelo exemplo de vida, dedicação e amor à ciência, seguramente uma inspiração para todos nós.

A todos que direta ou indiretamente foram partes fundamentais deste projeto: Dra. Patrícia Cazita, Dr. Sérgio Catanozi, Dra. Mônica Spadoni, Dra. Ana M. Lottenberg, Dr. Simão A. Lottenberg, Dra. Márcia Queiróz, Dr. Ísio Shulz, Dra. Valéria S. Nunes, Kelly Gomes, Maria Isabela Caldas, Paula Ramos Pinto, Guilherme Ferreira, Milessa Afonso, Karoline Santana, Fabiana Ferreira, Guilherme A. Marcelino, Mariana Ribeiro, Ana Paula Bocchi, Vanessa del Bianco, Diego Gomes, Elda Dantas, Lis Mie, Maria

Silvia Lavrador, Ana Elise Andrade, Mariana Ribeiro, Renata Torres, Letícia Rodrigues, Mayara Trevisani, Sayonara Assis e Marcos Tadashi. Obrigado pela parceria nesta caminhada.

À Cláudia Souza, sempre pronta para ajudar, e Rosibel Sileide, obrigado por todo carinho.

Ao Ambulatório de Diabetes do HC-FMUSP, Dra. Márcia Nery e Dra. Sandra Villares, pelo estímulo, assim como todo o time da Sala de Coletas, Francisca, Milena, Renata, Roseli, cujo auxílio foi fundamental para realização deste projeto. Também à Cida da Comissão de Pós-graduação, Rubens, Roberta e Rosana, pelo auxílio durante estes anos.

À Dra. Maria Lúcia C. Corrêa Gianella, pelos bons conselhos e orientação, em especial no início desta tese.

Às professoras titulares, Dras. Berenice B. Mendonça e Ana Cláudia Latrônico, por estimularem um ambiente de pesquisa de grande qualidade.

À minha banca de qualificação, Drs. Sérgio Dib, Márcio Mancini e Simão Lottenberg, pelas preciosas sugestões.

Ao Ch. Benê C. C. Teixeira (i.m.), importante figura no início da minha formação como pessoa.

Ao amigo Rafael Saad, pelas sugestões semânticas e gramaticais.

Aos animais empregados durante os experimentos, utilizados com toda ética possível em prol do conhecimento científico.

Aos participantes desta tese, pelos quais buscamos avançar o conhecimento na procura de uma melhor prática diária.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”

José de Alencar (1829-1877)

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Diabetes mellitus - hiperglicemia e complicações em longo prazo	2
1.2 Produtos de glicação avançada	5
1.3 Produtos de glicação avançada e aterosclerose	10
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Casuística	21
4.2 Isolamento da albumina de indivíduos com DM e controles sem DM	22
4.3 Modificação <i>in vitro</i> da albumina bovina por glicação avançada	23
4.4 Dosagem de endotoxina nas albuminas controles e glicadas <i>in vitro</i>	23
4.5 Dosagem de CML na albumina isolada de indivíduos com DM pré- e pós-CG	24
4.6 Obtenção de lipoproteínas do plasma humano	24
4.7 Acetilação de LDL	25
4.8 Cultura de macrófagos da linhagem J-774	25
4.9 Cultura de macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea	26
4.10 Efluxo de ¹⁴ C-colesterol de macrófagos	26
4.11 Análise do conteúdo de lípidos em macrófagos	27
4.12 Determinação da expressão de <i>Abca1</i> , <i>Nox4</i> , e <i>Jak2</i> por RT-qPCR em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM pré- e pós-CG	28

4.13	Determinação do conteúdo de ABCA-1 por <i>imunoblot</i>	30
4.14	Determinação da taxa de decaimento do ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM1 com controle inadequado e de indivíduos controles sem DM.....	31
4.15	Avaliação da persistência do efeito da albumina glicada <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sobre a sensibilização de macrófagos ao estímulo inflamatório.....	31
4.16	Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF).....	33
4.17	Avaliação da persistência do efeito da albumina glicada <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> sobre o efluxo de ¹⁴ C-colesterol celular por HDL.....	33
4.18	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	37
5.1	Perfil dos indivíduos DM1 e DM2 nos períodos pré- e pós-CG	38
5.2	Efluxo de colesterol em portadores de DM1 e DM2 pré- e pós-CG	41
5.3	Conteúdo intracelular de lípidos em macrófagos incubados com albumina de indivíduos com DM isolada nos períodos pré- e pós-CG	43
5.4	Expressão gênica em macrófagos tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-CG.....	45
5.5	Conteúdo total de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG	47
5.6	Persistência do efeito da albumina de indivíduos com DM isolada nos períodos pré- e pós-CG sobre a secreção de TNF por macrófagos	48
5.7	Taxa de decaimento do ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina de indivíduos com DM1 com controle glicêmico inadequado e de indivíduos controles	50
5.8	Persistência do efeito da albumina-GAD sobre a resposta inflamatória de macrófagos	53
5.9	Persistência do efeito da albumina-GAD sobre a redução do efluxo de colesterol de macrófagos	56
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	66
8	DOCUMENTOS ANEXOS	68
9	REFERÊNCIAS.....	76

LISTAS

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

^{14}C-colesterol:	Colesterol marcado com radioisótopo ^{14}C
3-DG:	3-deoxiglicosona
ABCA-1:	Transportador cassete A-1 de ligação ao ATP
ABCG-1:	Transportador cassete G-1 de ligação ao ATP
ACCORD:	<i>Action to Control Cardio-vascular Risk in Diabetes</i>
ADA:	<i>American Diabetes Association</i>
ADVANCE:	<i>Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation</i>
AGE:	Produto de glicação avançada
AGER1:	Receptor 1 para produtos de glicação avançada
Alb-AGE:	Albumina modificada por glicação avançada
Alb-Controle:	Albumina não-modificada
Alb-GAD:	Albumina bovina modificada in vitro por glicolaldeído
Apo A-I:	Apolipoproteína A-I
AUC:	<i>Area Under the Curve</i>
BMDM:	Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea
CETP:	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CML:	Carboximetil-lisina
CT:	Colesterol total
DCCT/EDIC:	<i>Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
DCV:	Doença cardiovascular
DM1:	Diabetes mellitus tipo 1
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FAFA:	Albumina isenta de ácidos graxos
FCS:	Soro fetal de bezerro

FPLC:	Cromatografia líquida para separação rápida de proteínas
GAD:	Glicolaldeído
GO:	Glioxal
HbA1c:	Hemoglobina glicada
HDL:	Lipoproteína de densidade alta
ICAM-1:	Molécula de adesão intracelular-1
IDF:	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1:	Interleucina-1
IL-6:	Interleucina-6
JAK:	Janus cinase
JNK:	JUN cinase terminal
LCAT:	Lecitina colesterol aciltransferase
LDL:	Lipoproteína de densidade baixa
LPS:	Lipopolissacarídeo
MGO:	Metilglioxal
mRNA:	RNA mensageiro
NADPH oxidase:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NF-KB:	Fator nuclear kappa B
PBS:	Solução tampão fosfato
Pós-CG:	Albumina isolada de portadores de DM pós-controle glicêmico
Pré-CG:	Albumina isolada de portadores de DM pré-controle glicêmico
QM:	Quilomícron
RAGE:	Receptor para produtos de glicação avançada
RE:	Retículo endoplasmático
ROS:	Espécies reativas de oxigênio
SCD-1:	Esteroil-CoA dessaturase 1
SR-BI:	Receptor <i>scavenger</i> classe B, tipo 1
TG:	Triglicérides
TNF:	Fator de necrose tumoral
TRC:	Transporte reverso de colesterol
UKPDS:	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
VCAM-1:	Molécula de adesão celular vascular-1
VLDL:	Lipoproteína de densidade muito baixa

TABELAS

Tabela 1 -	Dados clínicos e bioquímicos dos indivíduos com DM nos períodos pré- e pós melhora do controle glicêmico (CG).....	39
Tabela 2 -	Dados clínicos e bioquímicos dos indivíduos controles e com DM1.....	50

FIGURAS

Figura 1 -	Reação de glicação ou Maillard	6
Figura 2 -	Via de sinalização AGE-RAGE	9
Figura 3 -	Transporte Reverso de Colesterol.	11
Figura 4 -	Protocolo experimental	32
Figura 5 -	Protocolo experimental.	34
Figura 6 -	Protocolos experimentais.....	35
Figura 7 -	Porcentagem de mudança de CML ligada à albumina e HbA1c nos períodos pré- e pós melhora do controle glicêmico.....	40
Figura 8 -	Efluxo de ¹⁴ C-colesterol de macrófagos tratados com albumina isoladas nos períodos pré- e pós-CG.....	42
Figura 9 -	Conteúdo intracelular de lípidos em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG.	44
Figura 10 -	Expressão gênica de <i>Nox4</i> , <i>Jak2</i> e <i>Abca1</i> em macrófagos tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-CG.....	46
Figura 11 -	Conteúdo de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-controle glicêmico.	47
Figura 12 -	Tempo de persistência do efeito da albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG sobre a secreção de TNF por macrófagos.....	49

Figura 13 - Taxa de decaimento de ABCA-1 em macrófagos J774 tratados com albumina isolada de indivíduos DM1 e indivíduos controles.	52
Figura 14 - Tempo de persistência do efeito da albumina-GAD sobre a secreção de TNF por macrófagos.....	54
Figura 15 - Tempo de persistência do efeito da albumina-GAD sobre a secreção de IL-6 por macrófagos.	55
Figura 16 - Persistência do efeito da albumina-GAD (modificada <i>in vitro</i>) sobre a redução do efluxo de ¹⁴ C-colesterol de macrófagos.	56

RESUMO

Minanni CA. *Redução da modificação da albumina por glicação avançada no diabetes mellitus reestabelece a homeostase de colesterol em macrófagos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Produtos de glicação avançada (AGEs) associam-se, independentemente, com o risco cardiovascular, e constituem uma das bases da memória metabólica, a qual fundamenta a manutenção do risco elevado de complicações do diabetes mellitus (DM) previamente descompensado, mesmo após a normalização da glicemia. Avaliou-se o efeito da redução da modificação da albumina por AGEs sobre o efluxo de colesterol, conteúdo intracelular de lípidos, expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos, taxa de decaimento e conteúdo do receptor ABCA-1 em macrófagos. Além disso, foi investigado o tempo de persistência do efeito da albumina modificada por AGEs na sensibilização de macrófagos à resposta inflamatória e no prejuízo da remoção de colesterol celular. Albumina foi isolada do soro de indivíduos com DM1 e DM2 antes e após melhora do controle glicêmico (pré- e pós-CG), por cromatografia rápida para separação de proteínas e extração alcoólica. Albumina bovina modificada *in vitro* por AGEs foi preparada pela incubação com glicolaldeído (albumina-GAD) e albumina controle, com tampão fosfato. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea de camundongos enriquecidos em ^{14}C -colesterol foram incubados com albumina pré-CG e pós-CG e o efluxo de colesterol determinado após incubação com apoA-I ou HDL₂. Coloração com *Oil Red O* foi utilizada para quantificação do conteúdo intracelular de lípidos. A expressão gênica foi determinada em macrófagos J774 por RT-qPCR e a taxa de degradação de ABCA-1, mediante tratamento destas células com ciclohexamida. O efluxo de colesterol (%; n = 3) foi maior nas células incubadas com albumina pós-CG ($5,5 \pm 0,6$ e $11,1 \pm 1,2$; respectivamente para apo-AI e HDL₂) em comparação com a albumina pré-CG ($2,80 \pm 0,7$ e $4,4 \pm 0,8$; p < 0,05). O conteúdo de lípidos (μm^2) foi menor nas células tratadas com albumina pós-CG incubadas com apo-AI ($0,6 \pm 0,3$) e HDL₂ ($1,2 \pm 0,4$) em comparação com a albumina pré-CG ($2,8 \pm 0,4$ e $2,6 \pm 0,03$, respectivamente). A expressão de *Abca1* foi semelhante entre os grupos, mas a de *Nox4* e *Jak2* foi, respectivamente, reduzida e aumentada pela

albumina pós-CG em comparação com a albumina pré-CG. O conteúdo proteico de ABCA-1 foi 94% menor em macrófagos tratados com albumina pré-CG em comparação a pós-CG. Albumina isolada de indivíduos DM1 com controle glicêmico inadequado em comparação àquela de indivíduos controles, induziu maior taxa de decaimento (20%) do ABCA-1 em macrófagos. A albumina-GAD e a albumina isolada de DM pré-CG favoreceram maior secreção de TNF e IL-6 por macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e este efeito persistiu mesmo após 8 h da remoção do estímulo pela albumina modificada por AGEs. O mesmo foi observado para a redução do efluxo de colesterol, a qual persistiu após 9 h da retirada do insulto pela albumina modificada por AGEs. Em conclusão, a melhora do CG refletida pela redução da modificação de albumina por AGEs melhorou a expressão de genes que modulam a funcionalidade do ABCA-1, reduziu a taxa de degradação deste receptor e aumentou seu conteúdo em macrófagos, o que se vinculou à melhora do efluxo de colesterol e redução do acúmulo intracelular de lípidos. Os efeitos da albumina modificada por AGEs são persistentes em macrófagos e condizem com alterações na homeostase de lípidos e estresse inflamatórios baseados em modelo de memória metabólica celular.

Descritores: Aterosclerose; Diabetes mellitus; Colesterol; Produtos finais de glicação avançada; HDL-colesterol; Transportadores de cassetes de ligação de ATP.

ABSTRACT

Minanni CA. *Reduced albumin modification by advanced glycation end products in diabetes mellitus restores cholesterol homeostasis in macrophages* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Advanced glycation products (AGEs) are independently associated with cardiovascular risk and constitute one of the bases of metabolic memory, which supports the maintenance of high-risk complications in previously decompensated diabetes mellitus (DM), even after normalization of glycemia. It was evaluated the effect of the reduction in albumin modification by AGEs on the cholesterol efflux, intracellular lipid content, expression of genes involved in lipid flux, ABCA-1 content, and decay rate in macrophages. In addition, it was investigated the persistence time of AGE-albumin effect on macrophage sensitization to inflammation and damage in cholesterol efflux. Serum albumin was isolated from subjects with T1DM and T2DM before and after improvement of the glycemic control (GC) by fast protein liquid chromatography and alcoholic extraction. Bovine albumin was in vitro modified by AGEs by incubation with glycolaldehyde (GAD-albumin) and control albumin with phosphate buffer. Bone marrow-derived macrophages enriched with ^{14}C -cholesterol were incubated with albumin isolated bGC and aGC and cholesterol efflux determined after incubation with apoA-I or HDL₂. Staining with Oil Red O was used for the quantification of intracellular lipid content. Cholesterol efflux to apoA-I and HDL₂ (%; n = 3) was higher in cells incubated with albumin isolated aGC (5.5 ± 0.6 and 11.1 ± 1.2 , respectively) as compared to albumin isolated bGC (2.80 and 4.4 ± 0.8 , respectively; $p < 0.05$). Lipid content (μm^2) was lower in cells treated with albumin isolated aGC and incubated with apoA-I (0.6 ± 0.3) and HDL₂ (1.2 ± 0.4) compared to albumin isolated bGC (2.8 ± 0.4 and 2.6 ± 0.03 , respectively). The expression of *Abca1* was similar between groups, but *Nox4* and *Jak2* were respectively reduced and increased by post-GC albumin compared to albumin in the bGC period. ABCA-1 protein levels were 94% lower in macrophages treated with albumin from bGC period as compared to albumin from aGC. Albumin from poorly controlled T1DM subjects induced a 20% increase in the ABCA-1 decay rate. As compared to non-modified control

albumin and albumin isolated from control subjects, GAD-albumin and albumin isolated from subjects with DM bGC induced a higher secretion of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6) by macrophages stimulated with lipopolysaccharides and this effect persisted even after 8 h of the removal of AGE-albumin from cells. The same was observed for the reduction in cholesterol efflux that persisted 9 h after the removal of AGE-albumin. In conclusion, the improvement in GC reflected by the reduction of albumin modification by AGEs, favored the expression of genes that positively modulate ABCA-1 functionality, reduced ABCA-1 intracellular degradation, and increased the ABCA-1 protein level that was related to the improvement of cholesterol efflux and reduced intracellular lipid accumulation. The effects of AGE-albumin are persistent in macrophages favoring alteration in cellular lipid homeostasis and inflammatory stress according to a metabolic memory cell-based model.

Descriptors: Atherosclerosis; Diabetes mellitus; Cholesterol; Glycation end products, advanced; Cholesterol, HDL; ATP-binding cassette transporters.

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus - hiperglicemia e complicações em longo prazo

O diabetes mellitus (DM) é caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente da deficiência na produção ou na ação da insulina, ou ambos os mecanismos. Embora os fatores causais - genéticos, biológicos e ambientais - dos principais tipos de DM ainda não sejam completamente conhecidos (IDF, 2019), as alterações no metabolismo de carboidratos, lípidos e proteínas que cursam ao longo do seu desenvolvimento vinculam-se ao estabelecimento de complicações micro e macrovasculares em longo prazo.

As últimas duas décadas foram marcadas por dados alarmantes acerca da epidemia do DM. A prevalência desta doença, em 2019, foi de 9,3%, o que corresponde a cerca de 463 milhões de pessoas. Estima-se que no ano de 2045 este número chegará a mais de 700 milhões de pessoas com DM, segundo a *International Diabetes Federation* (IDF, 2019).

O DM confere um maior risco de desenvolvimento de várias complicações crônicas, tanto macro quando microvasculares. Do ponto de vista macrovascular, sabe-se que a doença cardiovascular (DCV) é 2 a 3 vezes maior do que em pessoas sem DM (Danaei et al., 2006; Sarwar et al., 2010). Já as complicações microvasculares incluem lesões na retina (retinopatia), doença renal (nefropatia) e lesão neuronal (neuropatias), que constituem causas mais comuns de amaurose, doença renal crônica e amputações não-traumáticas de membros inferiores, respectivamente (IDF, 2019).

O controle glicêmico intensivo e precoce é a principal estratégia para reduzir o risco de complicações crônicas do DM. O grande estudo clássico *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) demonstrou que a terapia glicêmica intensiva em indivíduos com diagnóstico recente de DM tipo

2 (DM2) foi associada à redução de risco de complicações microvasculares clinicamente evidentes e uma redução não significativa de 16% no risco relativo de infarto agudo do miocárdio (IAM; $p = 0,052$) (UK Prospective Diabetes Study, 1998). No DM2, a terapia glicêmica intensiva demonstrou benefícios no estudo *Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicon Modified Release Controlled Evaluation* (ADVANCE), com redução de eventos microvasculares em 14% (Patel et al., 2008); e no estudo *Action to Control Cardio-vascular Risk in Diabetes* (ACCORD), com redução não-significativa de 10% em infarto agudo do miocárdio (IAM) não-fatal, acidente vascular encefálico não-fatal e morte por doenças cardiovasculares (Gerstein et al., 2008). Entretanto, em muitos casos, o controle glicêmico advindo após um período de descompensação intensa não foi capaz de prevenir o desenvolvimento de complicações crônicas (Gaede et al., 2008).

Em indivíduos com DM tipo 1 (DM1), o *Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (DCCT/EDIC) demonstrou que a terapia glicêmica intensiva tem efeito em longo prazo sobre riscos subsequentes de complicações microvasculares, como redução da retinopatia e diminuição de albuminúria, respectivamente, 4 anos e 7-8 anos após o término do estudo, apesar do aumento da glicemia. O mecanismo fisiopatológico responsável pela melhora dos desfechos e por efeitos prolongados de uma intervenção precoce permanece não totalmente esclarecido e é conhecido como “memória metabólica” ou “efeito legado” (Nathan et al., 2005).

O conceito de memória metabólica refere-se ao estresse celular e tecidual persistente, mesmo após a normalização da glicemia e é fortalecido pela evidência clínica/epidemiológica de que a precocidade na introdução da terapia intensiva para o controle glicêmico é fator crucial na prevenção de complicações do DM (Nathan et al., 2005; Ihnat et al., 2007; Holman et al., 2008; Patel et al., 2008).

Estudos *in vitro* evidenciaram a persistência da expressão e atividade de proteínas marcadoras de estresse oxidativo e inflamatório e mediadores de morte celular em células endoteliais e retinianas tratadas durante 14 dias

com meio com alta concentração de glicose, seguindo-se de exposição por 7 dias em meio com baixa glicose (Ihnat et al., 2007). Na retina de ratos diabéticos, o controle glicêmico inadequado induziu o aumento de caspase-3, da atividade do NF-KB e estresse oxidativo quando comparada a retinas de ratos saudáveis. Nos animais diabéticos, a reinstituição do bom controle glicêmico após 2 meses de mau controle foi capaz de reduzir esses parâmetros, o que não foi observado após 6 meses prévios de descompensação (Kowluru, 2003; Kowluru; Abbas; Odenbach, 2004).

A base fisiopatológica da memória metabólica reside na modificação permanente de macromoléculas durante o período de descompensação glicêmica e no risco acumulado memorizado pela exposição em longo prazo ao estresse oxidativo e a produtos de glicação avançada (AGEs), que podem favorecer modificações epigenéticas. O risco de complicações mantém-se mesmo com intervenções multifatoriais baseadas em agentes redutores da glicemia e drogas antilipêmicas e anti-hipertensivas (Gaede et al., 2008; Cooper et al., 2018).

O estresse oxidativo celular é apontado como elo para o desenvolvimento de complicações típicas do DM. A maior metabolização da glicose ao longo da via glicolítica favorece o escape de elétrons da cadeia fosforilativa mitocondrial, com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas promovem o aumento da atividade da enzima reparadora do DNA, poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), a qual modifica a estrutura e prejudica a função da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Consequentemente é reduzido o fluxo ao longo da via glicolítica, com acúmulo de substratos que são desviados para a via das pentoses, das hexosaminas, geração de diacilglicerol e formação de metilglioxal (MGO) (Browlee, 2001). Este oxoaldeído é bastante reativo e propaga rápida e irreversivelmente a reação de glicação (Ihnat et al., 2007).

A geração de ROS induzida pela hiperglicemia favorece alterações epigenéticas persistentes em células endoteliais humanas e em modelos animais (Paneni et al., 2013; Cooper et al., 2018), caracteristicamente devido à alteração na região promotora proximal do gene do NF-KB (subunidade p65)

o que promove a expressão de genes inflamatórios. Essas alterações (em geral, no perfil de metilação de histonas) persistem por 6 dias após normalização da concentração de glicose no meio de cultura e, por meses, em animais com DM após recuperação da função das células beta pancreáticas. A redução da geração mitocondrial de ROS e da produção de superóxido induzida por MGO previnem alterações epigenéticas e o aumento da transativação de NF-KB (El-Osta et al., 2008).

1.2 Produtos de Glicação Avançada

No início do século XX, Louis Camile Maillard evidenciou a reação entre açúcares redutores e alimentos em processamento a altas temperaturas, como responsável pela alteração de cor (escurecimento) e paladar. Anos mais tarde, Patton & Hill (1948) descreveram a reação química, na época denominada glicosilação não-enzimática a qual, no final da década de 60, foi reconhecida no organismo humano por Rahbar e cols. (1969) como responsável pela modificação de uma fração da hemoglobina encontrada no sangue de indivíduos diabéticos (HbA1c). Desde então, a reação de glicação, termo utilizada para diferenciar a reação de glicosilação enzimática que ocorre durante o processamento pós-traducional de proteínas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi, vem sendo estudada em diferentes condições metabólicas e associada à alteração estrutural e funcional de macromoléculas. A glicação é prevalente no DM e outras condições onde prevalece o estresse carbonila e/ou falha na destoxificação de intermediários da reação. Entretanto, ela é inerente ao envelhecimento mesmo em indivíduos saudáveis, ocorrendo, neste caso, principalmente em associação a proteínas de meia-vida longa.

A reação de glicação (**figura 1**) é caracterizada pela ligação covalente, não-enzimática, entre a glicose ou outros monossacarídeos redutores com resíduos de lisina e arginina das proteínas e grupos amino-terminais de proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos. Isso promove a formação reversível

de uma base de Schiff, a qual é seguida por rearranjos moleculares que levam à formação do produto Amadori ou frutossil-lisina, que caracteriza produto de glicação precoce. A hemoglobina glicada (HbA1c) e a frutossamina, utilizadas no seguimento clínico do DM, são exemplos de produtos precoces de glicação. Rearranjos inter e intramoleculares do produto Amadori levam à geração dos AGEs, os quais alteram irreversivelmente a estrutura e função de diversas macromoléculas (Brownlee; Cerami, 1981).

Figura 1 - Reação de glicação ou Maillard. Resíduos amino-terminais de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolípidos são modificados por açúcares redutores de forma não-enzimática. O primeiro composto formado, a base de Schiff, é bastante instável, sofrendo fácil dissociação. No entanto, caso a reação prossiga, são formados produtos mais estáveis, denominados Produtos Amadori. A auto-oxidação da glicose, a decomposição da Base de Schiff e rearranjos do Produto Amadori levam à formação de oxoaldeídos, tais como glicoxal, glicolaldeído, metilglicoxal e 3-deoxiglicose, que propagam a reação de glicação de forma rápida e irreversível com a formação de produtos de glicação avançada (AGEs). Os principais AGEs são a carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, dímeros de glicoxal e metilglicoxal, pirralina, glicosepane, hidroimidazolonas derivados de metilglicoxal e argipirimidina, pentosidina e furosina

A auto-oxidação da glicose e a degradação da base de Schiff e do produto Amadori também geram oxoaldeídos, como metilglioxal (MGO), glioxal (GO), glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona (3DG) (Kato; Shin; Hayase, 1987; Frye et al., 1998; Thornalley, 2005). Esses compostos são extremamente reativos e têm grande habilidade de reagir com proteínas e lipídeos em reações que, em sua grande maioria, envolvem eventos oxidantes. Em consequência, forma-se uma gama de AGEs que diferem em complexidade, fluorescência e capacidade de formar cruzamentos entre moléculas (Reddy et al., 1995). Os principais AGEs identificados *in vivo* incluem carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, dímeros de glioxal e metilglioxal, pirralina, glicosepane, hidroimidazolonas derivadas de metilglioxal e argipirimidina.

Carboximetil-lisina (CML) é o AGE mais abundante (Ahmed; Thorpe; Baynes, 1986; Vlassara; Palace, 2002; Ruiz; Ramasamy, Schmidt, 2020) resultante da reação com GO e GAD. Sua concentração está aumentada na lesão aterosclerótica (Baidoshvili et al., 2004), sendo apontado como importante marcador do insulto oxidante e inflamatório (Nerlich; Schleicher, 1999). Biópsias de pele de indivíduos diabéticos incluídos no estudo DCCT revelaram que a concentração de CML se correlacionou de modo independente com o desenvolvimento de complicações microvasculares, incluindo neuropatia, nefropatia e retinopatia, além de ter se correlacionado com o risco de progressão de retinopatia e nefropatia nos dez anos seguintes observacionais do estudo EDIC (Genuth et al., 2005). A emissão de fluorescência é característica de uma grande parte dos AGEs, mas não todos, o que permite sua mensuração indireta por técnica não-invasiva. A autofluorescência da pele correlaciona-se positivamente com a concentração plasmática e tecidual de AGEs e com a manifestação de complicações em longo prazo do DM (DCCT/EDIC).

Diversas macromoléculas estão sujeitas à modificação por AGEs, a depender do estresse hiperglicêmico ou inflamatório e sua duração, bem como das características da cadeia polipeptídica, em particular, a quantidade de resíduos de aminoácidos sensíveis à reação com glicose ou oxoaldeídos

(em especial, lisina e arginina). Fontes exógenas de AGEs também contribuem para o *pool* corporal destes compostos e incluem a dieta e o tabaco. A forma de cocção, em altas temperaturas e a seco contribuem para a maior formação de AGEs, especialmente, em alimentos ricos em gordura, seguidos por aqueles enriquecidos em carboidratos (Snelson; Coughlan, 2019).

Os efeitos dos AGEs (**figura 2**) nas células são, principalmente, mediados pelos receptores para produtos de glicação avançada (RAGE), os quais desencadeiam uma série de sinalizações intracelulares que resultam no aumento da formação de ROS (Wautier et al., 2001; Goldin et al., 2006). As ROS, por sua vez, ativam NF-KB (Yeh et al., 2001), com propagação da resposta inflamatória crônica e vasoconstritora, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) (Schmidt et al., 1995; Cooper et al., 2018), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (Vlassara et al., 1988; Schmidt et al., 1994; Haslbeck et al., 2004), endotelina-1 (Quehenberger et al., 2000) e do próprio RAGE. Alguns AGEs promovem o entrecruzamento de polipeptídeos, alterando a conformação da matriz extracelular. Esses eventos, juntamente com o prejuízo no metabolismo das lipoproteínas, concorrem para o dano vascular e favorecem a gênese e progressão da aterosclerose no DM (Soro-Paavonen et al., 2008) e em outras situações, como doença renal crônica e inflamação, onde prevalecem a formação ou a falha na destoxificação dos oxoaldeídos, conforme destacado acima (Ramasamy et al., 2005; Thornalley, 2005).

Fonte: Zong et al., 2011

Figura 2 - Via de sinalização AGE-RAGE. A sinalização decorrente da interação AGE-RAGE promove a geração de espécies reativas de oxigênio, pelo sistema da NADPH oxidase, com ativação do receptor nuclear KB (NF-KB), resultando no aumento da expressão de marcadores inflamatórios (TNF, IL-1, IL-6, interferon-gama), moléculas de adesão e mediadores de angiogênese e apoptose que contribuem para as complicações do DM. A cascata de sinalização JAK-STAT consiste em um receptor de superfície celular, uma janus cinase (JAK) e duas proteínas de transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT). O sinal transmitido para o meio intracelular resulta em transcrição de DNA e expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose

O receptor 1 para produtos de glicação avançada (AGER-1) contrapõe à sinalização do RAGE e favorece a expressão de genes envolvidos na resposta antioxidante. Embora poucos detalhes sejam conhecidos sobre o AGER-1, sua expressão no tecido renal associa-se inversamente com o desenvolvimento da doença renal no DM (Rabbani et al., 2018).

1.3 Produtos de glicação avançada e aterosclerose

Modificações na composição das lipoproteínas desempenham um papel importante no desenvolvimento da aterosclerose no DM, uma vez que processos como oxidação e glicação tornam estas partículas reconhecíveis pelos receptores *scavenger* dos macrófagos, levando ao acúmulo celular de colesterol e à formação de células espumosas. A oxidação das partículas de LDL ocorre principalmente na parede vascular, onde as defesas antioxidantes são proporcionalmente menores do que no compartimento plasmático. LDLs oxidadas exercem quimiotaxia a monócitos, o que perpetua a diferenciação local de macrófagos e favorecem o insulto oxidativo e inflamatório nestas células e em células endoteliais e musculares. Essas últimas invadem a túnica íntima das artérias, adquirindo um perfil fenotípico fagocítico em detrimento de sua capacidade contrátil (Wong et al., 2018).

No DM, prevalece a glicação da apolipoproteína B (apoB), principal constituinte estrutural das LDL, VLDL e QM, e de resíduos de fosfolípidos, o que condiciona prejuízo na metabolização destas lipoproteínas. QM e VLDL glicosados são menos suscetíveis à ação da lipoproteína lipase. Além disso, a apoB glicada é menos reconhecida pelos receptores do tipo B-E, o que favorece maior disponibilidade de LDL à íntima arterial (Rabbani et al., 2010).

As HDL glicadas, por sua vez, apresentam menor tempo de residência no plasma e tem sua metabolização ao longo do transporte reverso de colesterol (TRC) comprometida, graças à interferência sobre a atividade da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) e vários receptores celulares, como o receptor *scavenger* tipo B classe I (SR-BI) (Gomez Rosso et al., 2017). Alterações na capacidade antioxidante da HDL no DM foram observadas em indivíduos DM2, em decorrência de modificações químicas e estruturais que afetam sua funcionalidade e sua capacidade antiaterogênica, independentemente de sua concentração plasmática (Gomez Rosso et al., 2017; Koekemoer et al., 2017).

A albumina glicada corresponde à maior parte das proteínas circulantes modificadas no DM e sua concentração no plasma correlaciona-se positivamente com o desenvolvimento de complicações macrovasculares (Kumeda et al., 2008; Jin et al., 2009; Greifenhagen et al., 2016; Neelofar et al., 2016).

A albumina glicada reduz a remoção de colesterol de macrófagos pela apoA-I e subfrações de HDL, comprometendo a primeira etapa do TRC. Por meio do TRC, o excesso de colesterol das células periféricas é dirigido ao fígado, o que permite sua eliminação na bile e excreção fecal (**figura 3**).

Figura 3 - Transporte Reverso de Colesterol. Apolipoproteína A-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 (HDL₂) 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 ou órgãos esteroidogênicos, podendo ser convertido em ácidos biliares ou hormônios esteróides. Por intermédio da CETP, o CE é transferido para os QM, VLDL e LDL, as quais podem ser removidas pelos receptores B-E ou LRP no fígado. A etapa final do TRC é caracterizada pela secreção de colesterol na bile, na forma livre ou após conversão em ácidos biliares, com eliminação fecal

Em macrófagos enriquecidos em lípidos, a exportação do excesso de colesterol para apoA-I, por intermédio do receptor ABCA-1, constitui-se na principal via de esvaziamento do conteúdo celular de colesterol, com menor participação atribuída aos receptores ABCG-1, receptor *scavenger* tipo I classe B (SR-BI) e às vias de difusão (Rosenson et al., 2012). Neste aspecto, os mecanismos de regulação da expressão e conteúdo de ABCA-1 têm sido intensamente investigados.

A glicoxidação intracelular induzida pelo tratamento com açúcares dicarbonila reduz a expressão de ABCA-1 em macrófagos e fibroblastos, com grave prejuízo na remoção de colesterol (Passarelli et al., 2005) e óxidos de colesterol, em especial 7-cetocolesterol (Iborra et al., 2011). Interessante observar que o decréscimo na quantidade de ABCA-1 ocorre mesmo na ausência de variação no mRNA, sugerindo que vias de degradação pós-traducionais estejam envolvidas na redução do transportador. Em consequência, observa-se acúmulo de colesterol celular, o qual é prevenido pelo uso de aminoguanidina. A contrapartida *in vivo* é evidenciada pela redução na quantidade do receptor de HDL observada em macrófagos da lesão aterosclerótica de suínos diabéticos por tratamento com estreptozotocina (Passarelli et al., 2005).

A albumina glicada induz a geração de ROS em macrófagos, tanto por via mitocondrial como pela ativação da NADPH oxidase (de Souza Pinto et al., 2012). Acúmulo intracelular de colesterol, estresse oxidativo e inflamatório, também promovido pela albumina glicada (Okuda et al., 2012), são condições que favorecem o estabelecimento do estresse do retículo endoplasmático (RE) (Castilho et al., 2012).

A albumina glicada sensibiliza macrófagos ao estímulo inflamatório por calgranulina S100 ou lipopolissacarídeo (LPS), o que se reflete pela maior secreção de IL-6, TNF, MCP-1 e VCAM-1. O meio rico em citocinas - advindo destas células tratadas com albumina glicada e, posteriormente, com calgranulina ou LPS - reduz o efluxo de colesterol de macrófagos não estimulados, devido à menor expressão de ABCA-1 (Okuda et al., 2012).

Estes achados apontam para regulação parácrina entre células da lesão aterosclerótica, submetidas ao estresse glicoxidativo e inflamatório e macrófagos recém-diferenciados na parede arterial.

A albumina obtida de portadores de DM com controle glicêmico inadequado contém maior quantidade de CML, em comparação àquela isolada de indivíduos saudáveis, com correlação positiva entre o conteúdo de CML na albumina e a porcentagem de albumina sérica glicada ou concentração de frutamina (de Souza Pinto et al., 2012; Machado-Lima et al., 2013). A albumina isolada de indivíduos portadores de DM1 e DM2 reduz a remoção de colesterol pela ApoA-I, HDL₂ e HDL₃, implicando no acúmulo intracelular de lípidos e na expressão diferencial de genes em macrófagos, acessada por técnica de *microarray* e validação por RT-PCR.

A diminuição no efluxo de colesterol provocada pelo tratamento com albumina DM1 e DM2 foi relacionada à redução na expressão do receptor de HDL e ABCA-1 em 82% e 25%, respectivamente. Interessante notar que o tratamento de macrófagos com albumina DM2 aumentou a expressão da NADPH oxidase 4 (Machado-Lima et al., 2013), o que vai ao encontro da maior geração de ROS observada em macrófagos tratados com albumina glicada (de Souza Pinto et al., 2012).

Outros genes também apresentaram sua expressão alterada na vigência do tratamento com albumina DM1 e DM2, como a Janus cinase 2 (*Jak2*), a qual foi diminuída em macrófagos tratados com albumina DM (Machado-Lima et al., 2013; Machado-Lima et al., 2015). Esta proteína modula a interação da apoA-I com o receptor ABCA-1 (Tang; Vaughan; Oram, 2004). Quando ativada, garante a estabilidade do ABCA-1 e permite a interação com o receptor, favorecendo a remoção de colesterol celular. Além disso, foi observado aumento da expressão de SCD-1 (esteroil-CoA dessaturase 1) após o tratamento com albumina DM1 (Machado-Lima et al., 2013). A superexpressão da SCD-1 promove alterações na composição de fosfolípidos da membrana plasmática, levando à diminuição do efluxo de colesterol mediado por apoA-I. O aumento da geração de ácidos graxos

insaturados pela SCD-1 leva à desestabilização do ABCA-1 na membrana plasmática e se contrapõe aos efeitos estimulantes de LXR sobre a transcrição do gene *ABCA1* (Sun et al., 2003).

Estudo prévio evidenciou que o RAGE medeia as ações da albumina glicada sobre o fluxo de lípidos celulares. Em macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea de animais *knock out* para RAGE (RAGE KO) não são observadas reduções no efluxo de colesterol celular para apoA-I e subfrações da HDL, após tratamento com albumina glicada, em comparação às células obtidas de animais selvagens. Da mesma forma, o silenciamento do RAGE aboliu os efeitos deletérios da albumina glicada sobre o efluxo de colesterol celular e a expressão de ABCA-1 (Iborra et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

---

2 JUSTIFICATIVA

O valor preditivo da albumina modificada por glicação avançada (albumina glicada) para o risco cardiovascular tem sido demonstrado em diversos trabalhos (Furusyo et al., 2013; de Vos et al., 2017; Hanssen et al., 2018). Em grandes ensaios clínicos, a concentração de AGEs circulantes (representada em sua maioria pela albumina glicada) correlaciona-se positivamente com o desenvolvimento de complicações tardias, independentemente do valor de hemoglobina glicada. Os AGEs são formados, em grande parte, por reações de oxidação e aceleram o estresse oxidativo intracelular. Ambos os eventos concorrem para a memória metabólica, a qual fundamenta a manutenção do risco elevado de complicações mesmo após a normalização glicêmica.

A albumina glicada interfere negativamente no efluxo de colesterol celular, por reduzir a expressão dos receptores de HDL (Machado et al., 2006; Machado-Lima et al., 2013; Machado-Lima, 2015). Isto se vincula ao estresse oxidativo celular e à propagação de estresse de retículo endoplasmático em macrófagos (Castilho et al., 2012). Estudo prévio evidenciou que a albumina glicada sensibiliza macrófagos à produção de citocinas inflamatórias, as quais prejudicam em macrófagos saudáveis o efluxo de colesterol (Okuda et al., 2012). No entanto, até o momento não foi determinado se o controle glicêmico é capaz de reduzir o efeito negativo da albumina glicada sobre o fluxo de lípidos e qual o tempo de persistência do efeito da albumina glicada na modulação da resposta inflamatória e efluxo de colesterol em macrófagos.

Assim, foram testadas as seguintes hipóteses: 1) a melhora do controle glicêmico - refletida pela redução da glicação avançada da albumina (*in vivo*) - é capaz de reestabelecer o efluxo de lípidos celulares, modulando favoravelmente o conteúdo de ABCA-1 em macrófagos; 2) os efeitos da albumina-GAD (albumina modificada por glicação avançada *in vitro*) e da albumina modificada *in vivo* por glicação avançada sobre a resposta

inflamatória e efluxo de colesterol perduram em macrófagos, mesmo após remoção do insulto, contribuindo para o prejuízo no fluxo de lípidos em modelo baseado em memória celular.

3 OBJETIVOS

---

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da melhora do controle glicêmico, refletido pela redução da modificação *in vivo* da albumina por glicação avançada, sobre a homeostase de colesterol e a persistência do efeito da albumina glicada sobre o efluxo de colesterol e resposta inflamatória em macrófagos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar: 1) o efeito da albumina sérica, isolada de indivíduos com DM antes (pré-CG) e após a melhora do controle glicêmico (pós-CG), sobre o efluxo de colesterol mediado por subfrações de HDL₂ e HDL₃, conteúdo intracelular de lípidos, expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos e o conteúdo de ABCA-1 em macrófagos; 2) a taxa de decaimento do receptor ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada de DM1 descompensados em comparação à isolada de indivíduos sem DM; 3) a persistência do efeito da albumina glicada *in vivo* e *in vitro* (albumina-GAD) na sensibilização à resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeo e efluxo de colesterol mediado por subfrações de HDL₂ e HDL₃.

4 MATERIAL E MÉTODOS

---

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq; projeto 146265/2017) e todos os procedimentos foram realizados após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo para utilização de animais foi estritamente realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - CEUA 071/17).

4.1 Casuística

Indivíduos portadores de DM1 e DM2, de ambos os sexos, foram selecionados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Não foram incluídos no protocolo indivíduos com hipotireoidismo e hipertireoidismo descompensado, insuficiência renal ou hepática, microalbuminúria, etilistas, tabagistas, ou que utilizassem suplementos vitamínicos.

Foram inicialmente recrutados 14 indivíduos recém admitidos no Ambulatório, com valores de HbA1c > 8% (superiores a 2% do limite de normalidade valor de referência 6,0%) e concentração plasmática de triglicérides abaixo de 400 mg/dL. Foram realizadas duas coletas de sangue venoso, após um período de 12 h de jejum, uma no período de descompensação glicêmica e outra após melhora das variáveis metabólicas, quando atingida a queda de HbA1c de pelo menos 1% em relação ao valor anterior, acompanhado da queda da frutossamina.

Dos indivíduos originais, 6 atingiram os critérios previstos e foram incluídos nos experimentos, não sendo os demais incluídos por ausência de controle glicêmico no período de seguimento ou incongruência entre HbA1c e

frutosamina. O intervalo entre as coletas foi variável, de acordo com o tempo necessário para a compensação dos indivíduos. Amostras de urina foram colhidas para dosagem de microalbuminúria. A determinação da frutosamina foi realizada por método colorimétrico automatizado, enquanto a HbA1c por método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), certificado pelo *National Glyco Hemoglobin Standardization Program* (NGSP-EUA). As concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-c e TG foram determinadas por método enzimático colorimétrico automatizado, enquanto a concentração plasmática de LDL-c por método cinético automatizado. Os dados clínicos e bioquímicos destes indivíduos foram detalhados nos resultados.

Um outro grupo de indivíduos portadores de DM1 com controle glicêmico inadequado (n=4) e indivíduos controles sem DM (n=5) também foram incluídos no estudo, tendo sido realizada uma única coleta de sangue venoso, após um período de 12 h de jejum.

4.2 Isolamento da albumina sérica de indivíduos com DM e controles sem DM

Amostras de sangue dos participantes de todos os grupos, após jejum de 12 horas, foram colhidas em tubos secos e, imediatamente, centrifugadas a 3000 rpm, por 20 min, a 4°C, para obtenção do soro. A este, foram adicionados os seguintes conservantes ($\mu\text{L/mL}$ de plasma): 20 μL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%), 10 μL de azida sódica (5%) (Merck, Darmstadt, Alemanha); 5 μL de benzamidina (2 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 5 μL de aprotinina (0,5%) (Sigma-Aldrich) e 0,5 μL de PMSF (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30 mM de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich). As amostras foram estocadas a -70°C até posterior processamento. A albumina foi extraída por cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography*), utilizando-se coluna de afinidade para albumina,

HiTrap^{tm}Blue (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), seguida de purificação por extração alcoólica, conforme descrito (Machado-Lima et al., 2015). A integridade das albuminas foi analisada por cromatografia em gel de poliacrilamida, utilizando-se como controle albumina humana disponível comercialmente (Sigma, St. Louis, EUA).

4.3 Modificação *in vitro* da albumina bovina por glicação avançada

Albumina bovina isenta de ácidos graxos e com concentração de endotoxina inferior a 0,1 ng/mg (Sigma-Aldrich) foi incubada na presença de solução de 10 Mm de glicolaldeído (Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha) recém preparada em tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L) com EDTA (pH = 7,4). Albumina controle (Alb-C) foi preparada na presença de PBS contendo apenas EDTA. As incubações foram realizadas sob condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37°C, com agitação lenta durante 4 dias. Em seguida, as amostras foram dialisadas contra PBS e esterilizadas em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e todas as amostras congeladas a -70°C até o seu uso.

4.4 Dosagem de endotoxina nas albuminas controles e glicadas *in vitro*

A quantidade de endotoxina das albuminas foi determinada pelo ensaio da Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Cape Cod, Falmouth, MA, USA). Em todas as amostras, a concentração de endotoxinas foi inferior a 50 pg/mL, a qual é referida como não sendo capaz de induzir resposta inflamatória em estudos de cultura celular (Valencia et al., 2004).

4.5 Dosagem de CML na albumina isolada de indivíduos com DM pré- e pós-CG

Para detecção de carboximetil-lisina (CML), foi utilizado o método ELISA, imunoensaio enzimático (*Circulex CML/N^ε-(Carboxymethyl)lysine ELISA Kit*, (Circulex CML, Woburn, EUA). Foram adicionados 100 µL da amostra (albumina isolada dos participantes do estudo) à placa revestida com anticorpo anti-CML (anti-*Carboxymethyl*), e incubado a 37°C por 2 horas. A placa foi lavada com solução tampão de lavagem por 3 vezes, e novamente incubada com 100 µL do anticorpo anti-CML (diluído 1:1000), por 1 hora à temperatura ambiente em um agitador orbital. Após novo processo de lavagem (solução tampão de lavagem por 3 vezes), adicionou-se à placa 100 µL do anticorpo HRP secundário, seguido por incubação à temperatura ambiente, por 1 hora, em agitador orbital. A placa foi lavada mais uma vez com solução tampão e, a seguir, 100 µL da solução de substrato reagente foi adicionado a cada poço, incluindo os referentes à curva-padrão, e incubado por 20 a 30 minutos sob agitação. Após a intensificação da cor nos poços, adicionou-se 100 µL da solução de bloqueio. A leitura foi realizada com um leitor de microplacas e 450 nm de comprimento de onda.

4.6 Obtenção de lipoproteínas do plasma humano

Lipoproteína de densidade baixa (LDL; $d = 1,019 - 1,063$ g/mL) foi isolada do plasma humano por ultracentrifugação sequencial e purificação por gradiente descontínuo de densidade (Havel; Eder; Bragdon, 1955; Redgrave; Roberts; West, 1975).

4.7 Acetilação de LDL

A LDL foi acetilada segundo protocolo descrito por Basu e cols. (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 (NaCl – 0,15 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 (Basu et al., 1976).

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 e cols. (1951).

4.8 Cultura de macrófagos da linhagem J-774

Macrófagos da linhagem murina J-774 foram doados gentilmente pela Dra. Hiro Goto do Laboratório de Sorologia (LIM-38) do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O cultivo celular foi realizado em garrafas de 75 cm² com o meio RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino. Antes de atingirem confluência total, as células foram lavadas, duas vezes, com solução isotônica (PBS) contendo 2 mg/mL de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA). Para experimento as células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 24 poços (1,5 x 10⁶ células/poço) e incubadas por um período de 48 h para adesão.

4.9 Cultura de macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea

A obtenção de macrófagos, a partir de células isoladas da medula óssea (BMDMs) de camundongos foi realizada seguindo o protocolo do Laboratório da Dra. Ann Marie Schmidt, Diabetes Research Program, New York University School of Medicine, NY, EUA. Para tanto, o tecido das pernas de camundongos C57BL/6 selvagens foi removido e dissecado. 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, sendo, a seguir, semeadas em placas de cultura com incubação por 5 dias, em atmosfera de CO₂ 5%. No quinto dia, o meio de cultura foi trocado por novo meio condicionado de células L929. No sexto dia, as células foram incubadas com meio DMEM com baixa concentração de glicose, contendo 10% de soro fetal bovino (FCS).

4.10 Efluxo de ¹⁴C-colesterol de macrófagos

Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram incubados em placas de cultura com 96 poços em concentração de $0,8 \times 10^6$ células/mL de RPMI (Gibco) contendo 10% SFB, antibióticos e glutamina. Após confluência, foram incubados com DMEM (*Low Glucose*, Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescido com 50 µg de LDL acetilada/mL e 0,3 µCi de ¹⁴C-colesterol/mL (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 48 h. Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato (PBS - NaCl 150 mmol/L, Na₂HPO₄ 20 mmol/L, NaH₂PO₄ 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L - pH 7,4) com FAFA, as células foram tratadas, por 18 h, com meio DMEM (*Low Glucose*, Gibco) suplementado com

1 mg/mL de albumina isolada do soro de indivíduos DM isoladas antes e após a melhora do controle glicêmico. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram incubadas novamente com 1 mg/mL de albumina isolada do soro de indivíduos DM isoladas antes e após a melhora do controle glicêmico, na presença ou ausência de apoA-I (30 µg/mL; por 8 h), HDL₂ (50 µg/mL; por 6 h) ou HDL₃ (50 µg/mL; por 6 h). O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, para remoção de fragmentos celulares e transferido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora (Perkin Elmer, Turko, Finlândia).

Os poços das placas foram lavados com solução fisiológica gelada (4°C) por 2 vezes. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a radioatividade determinada após evaporação do solvente. As células foram incubadas com 250 µL de NaOH 0,2 N, durante 3 h, a temperatura ambiente, seguindo-se a determinação da concentração de proteína, pelo método de Lowry e cols. (1951). A porcentagem de efluxo de colesterol foi calculada como: $\frac{^{14}\text{C}\text{-colesterol no meio}}{^{14}\text{C}\text{-colesterol no meio} + ^{14}\text{C}\text{-colesterol na célula}} \times 100$. A porcentagem de efluxo obtida mediante incubação com apoA-I, HDL₂ ou HDL₃ indicou o efluxo total de colesterol, do qual subtraiu-se o valor obtido pela incubação com DMEM contendo apenas albumina (efluxo basal). Desta forma, obteve-se a porcentagem de efluxo de colesterol mediada por aceptores específicos (apoA-I, HDL₂ ou HDL₃) (Machado-Lima A, 2015).

4.11 Análise do conteúdo de lípidos em macrófagos

Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram incubados com DMEM (Gibco) contendo 1 mg de albumina isenta de ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich), acrescido com 50 µg de LDL acetilada/mL durante 48 h. A seguir, foram tratados por 18 h com DMEM contendo 1 mg/mL de albumina isolada dos indivíduos DM antes e após melhora do controle glicêmico. Após lavagem com PBS/FAFA, os BMDMs

foram incubados novamente com albumina dos indivíduos DM antes e após melhora do controle glicêmico, na presença ou ausência de apoA-I (30 µg/mL; 8 h) ou HDL₂ (50 µg/ mL; 6 h). Passado o período de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS/FAFA e fixadas com solução de formalina 10% em PBS, por 1 h, a temperatura ambiente. Os macrófagos foram corados com solução de *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) 0,5% em propileno glicol por 2 h, seguido de lavagem com água destilada. As placas de cultura foram, então, colocadas em estufa a 32°C por 45 min.

As lamínulas foram colocadas sobre lâminas em solução de glicerina Jelly, e as células visualizadas em microscópio óptico (*Olympus Microscope BX-51*, Leeds Precision Instruments, Inc). As imagens foram capturadas por câmera (*Sony CCD Camera*) acoplada a microscópio. Dez campos de cada lâmina foram analisados na magnitude de 400 x. A coloração com *Oil Red O* foi quantificada de maneira cega por um único investigador, utilizando o *software* específico (*Image-Pro Plus* - Media Cybernetics, Bethesda, MD, EUA) versão 6,0 para Windows. O conteúdo de lípidos foi expresso como porcentagem do conteúdo de *Oil Red O* no campo pela área total (todo o campo da lâmina detectado pelo *software*).

4.12 Determinação da expressão de *Abca1*, *Nox4*, e *Jak2* por RT-qPCR em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM pré- e pós-CG

Macrófagos da linhagem J774 enriquecidos em colesterol foram tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-CG (2 mg/mL) durante 48 h. O mRNA total dos macrófagos foi extraído com uso do estojo comercial *RNeasy mini kits* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. A avaliação da integridade do RNA foi avaliada após eletroforese em gel de agarose, para a visualização das bandas correspondentes aos RNAs 28S e 18S. A quantificação foi feita no equipamento Nanodrop (Spectrophotometer ND1000 - Thermo Scientific -

Wilmington DE, EUA) e somente amostras com relação OD260/OD240 $\geq 1,8$ foram utilizadas.

Para a síntese de cDNA a partir do RNA extraído foi utilizado o estojo comercial High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 500 ng de RNA. O cDNA sintetizado foi utilizado na análise de expressão gênica em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA): *Nox4* (NADPH oxidase 4) Mm00479246_m1; *Jak2* (Janus kinase 2) Mm01208489_m1; *Abca* (ATP binding cassette subfamily A member 1) Mm00442646_m1. A expressão gênica relativa foi determinada pelo gene *Ipo8* (Importina 8) Mm01255158_m1. Na seleção das sondas, foram escolhidas aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir o impacto de contaminação por DNA (Bustin et al., 2005; Kubista et al., 2006).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems,) e os resultados foram analisados pelo software StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems). Para cada par de *primer* dos genes-alvo e do gene controle interno foi calculada a eficiência de amplificação; uma amostra de cDNA foi diluída 1:5, 1:50 e 1:500 ou na diluição que se mostrou mais eficiente para as amostras, e foi realizada uma PCR para cada uma destas diluições. Um gráfico colocando o valor de Ct (Threshold cycle, número do ciclo calculado no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção) de cada diluição de cDNA em função da diluição da amostra foi construído e a inclinação (“*slope*”) desta reta foi utilizada para o cálculo de eficiência de amplificação conforme a fórmula: Eficiência de amplificação = $10(-1/\text{SLOPE})$. A semelhança das eficiências de amplificação dos pares de *primers* dos genes-alvo e do gene controle interno permitiu a utilização do modelo matemático $\Delta\Delta\text{CT}$ (Yuan et al., 2006). No caso das eficiências de amplificação que diferiram, foi usado o modelo matemático descrito por Pfaffl (2001).

4.13 Determinação do conteúdo de ABCA-1 por imunoblot

Após tratamento com albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG, os macrófagos da linhagem J774 foram lisados com solução TRIS (TBS) contendo conservantes e inibidores de protease (aprotinina 1,5 μ M, pepstatina 2 μ M, leupeptina 1 μ M e PMSF 0,1 mM). Após centrifugação a 1500 rpm, durante 10 min, a 4°C, o botão celular foi rediluído em 300 μ L de TBS contendo conservantes e inibidores de protease. O conteúdo proteico foi determinado pelo método BCA (Pierce Biotechnology, Rockford EUA). Proteína celular (50 mcg) foi aplicada em gel de poliacrilamida 6%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose durante 1 h e 30 min a 120V (Unidade de Transferência semi-seca TE-70 - GE Healthcare, EUA), seguindo-se bloqueio de sítios não ocupados por meio de incubação com PBS contendo 5% de leite desnatado e Tween 0,05%. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-ABCA-1 (1:1000 - anticorpo gentilmente cedido pelo Prof. Shinji Yokoyama da Universidade de Nagoya, Japão) durante 3 h a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS/Tween, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-rato, conjugado a peroxidase (1:2000) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific Rockford, IL, EUA) e a captura de imagem foi realizada pelo fotodocumentador ImageQuant 350 (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, EUA).

4.14 Determinação da taxa de decaimento do ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM1 com controle inadequado e de indivíduos controles sem DM

Para avaliar a taxa de degradação de ABCA-1 em macrófagos, foi utilizado cicloheximida em incubações ao longo do tempo. Uma vez que este composto inibe a síntese de novas proteínas, o conteúdo de proteína ABCA-1 detectado por imunoblot reflete sua degradação após incubação com albumina controle ou albumina isolada de indivíduos portadores de DM1 com controle glicêmico inadequado.

Macrófagos J774 foram incubados em placas de 60 mm por 12 h na presença de agonista de LXR 10 μ M (T0901317; Sigma) para maximizar a expressão de ABCA-1. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e expostas a um *pool* de albumina (2 mg/mL) isolada do soro de indivíduos controle saudáveis (C; n=5) ou indivíduos com DM1 (n=4) ao longo do tempo (0,2 % em 4 mL de DMEM de baixa glicose), na presença de 400 μ g de cicloheximida (Sigma) durante 0, 4, 8 h. O imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCA-1 (1:1000), seguindo-se reação com anticorpo secundário. As bandas foram visualizadas após reação com ECL e foram corrigidas por beta-actina. A taxa de decaimento do ABCA-1 foi calculada pela área sob a curva (AUC) do conteúdo de ABCA-1 ao longo do tempo.

4.15 Avaliação da persistência do efeito da albumina glicada *in vivo* e *in vitro* sobre a sensibilização de macrófagos ao estímulo inflamatório

Para determinar se o efeito da albumina-GAD ou isolada de indivíduos com DM, na indução do estresse inflamatório perdura mesmo após sua retirada, BMDMs enriquecidas em colesterol (pela incubação com LDL acetilada; 50 μ g/mL) foram incubados por 48 h na presença de albumina-controle, albumina-GAD e albumina isolada de DM pré- e pós-CG. Após

lavagem cuidadosa com PBS/FAFA, as células foram mantidas apenas com DMEM/FAFA por 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h ou 24 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e tratadas por mais 24 h com lipopolissacarídeo (LPS serotipo E. Coli, 1 µg/mL de meio - Sigma), por 24 h. O meio foi congelado (-70°C) para posterior análise do conteúdo das citocinas inflamatórias, TNF e IL-6 (**figura 4**).

Figura 4 - Protocolo experimental. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram incubados por 48 h na presença de albumina-controle, albumina-GAD ou albumina isolada de DM antes após a melhora do controle glicêmico. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram mantidas apenas com DMEM/FAFA por 0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h ou 24 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e tratadas por mais 24 h com LPS, como insulto inflamatório (1 µg/mL)

4.16 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF)

A concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF) foi determinada por ELISA (R&D System – Duo Set, Minneapolis, EUA).

4.17 Avaliação da persistência do efeito da albumina glicada *in vivo* e *in vitro* sobre o efluxo de ^{14}C -colesterol celular por HDL

A persistência do efeito da albumina-GAD ou isolada de indivíduos com DM sobre o prejuízo no efluxo de colesterol mediado por HDL foi avaliada em BMDMs enriquecidas em ^{14}C -colesterol e colesterol (pela incubação com LDL acetilada; 50 $\mu\text{g/mL}$), incubadas, por 48 h, na presença de albumina-controle, albumina-GAD e albumina isolada de DM pré- e pós-CG. Após lavagem cuidadosa com PBS/FAFA, as células foram mantidas apenas com DMEM/FAFA por 0 h, 3 h, 6 h, 9 h ou 12 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e incubadas na presença ou ausência das subfrações de HDL (HDL₂ e HDL₃; 50 $\mu\text{g/mL}$), por 6 h (**figura 5**). O efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado conforme descrito acima.

Figura 5 - Protocolo experimental. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram incubados por 48 h na presença de albumina-controle, albumina-GAD ou albumina isolada de DM antes após a melhora do controle glicêmico. Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram mantidas apenas com DMEM/FAFA por 0 h, 3 h, 9 h ou 12 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e tratadas por mais 24 h com LPS, como insulto inflamatório (1 µg/mL). A seguir, o efluxo de ^{14}C -colesterol foi determinado para avaliação da persistência do efeito da albumina glicada sobre o prejuízo na remoção de colesterol celular por HDL

Todos os protocolos experimentais realizados encontram-se resumidos na **figura 6**.

Figura 6 - Protocolos experimentais. Indivíduos portadores de DM1 (n=2) e DM2 (n=4) foram inseridos no protocolo de ajuste do controle glicêmico. Um segundo grupo de portadores de DM1 descompensados (n=4) foram utilizados em *pool* para comparação com indivíduos controles (n=5). Os experimentos para avaliar a persistência do efeito da albumina glicada foram conduzidos utilizando-se albumina-GAD e albumina-controle e aquelas isoladas de DM pré- e pós melhora do controle glicêmico

4.18 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, Inc. 2017). As comparações entre os indivíduos pré- e pós-CG foram feitas por teste t de *Student*, pareado. As

comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) de um fator com pós teste de Newman Keuls ou por teste t de *Student*, não pareado. Em todos os casos, foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância for inferior a 5%.

5 RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

5.1 Perfil dos indivíduos portadores de DM1 e DM2 nos períodos pré- e pós-CG

Albumina foi isolada do soro de seis indivíduos com DM, os quais apresentaram melhora no perfil glicêmico. Destes, quatro eram do sexo masculino e dois do sexo feminino. A idade variou entre 27 e 54 anos (média 42 anos), sendo dois indivíduos portadores de DM1 e 4 portadores de DM2. A média de IMC foi de $24,6 \pm 3,9$ Kg/m², sendo o IMC menor nos indivíduos DM1 quando comparado com os DM2. Nenhum dos indivíduos apresentava anemia, e o perfil lipídico foi mais elevado nos DM2.

Nestes indivíduos, insulina NPH e regular, metformina, pioglitazona e gliclazida foram utilizadas para o controle glicêmico. A dieta e os medicamentos utilizados foram mantidos entre a coleta pré- e pós-CG, bem como o peso se manteve estável durante este período. A melhora do CG com base nos valores de HbA1c e frutossamina foi alcançada, como demonstrado na **tabela 1**. Em média, a glicemia de jejum variou de 155 ± 37 (mg/dL) para 109 ± 30 (mg/dL), a HbA1c de $11,8 \pm 2,4$ (%) para $7,08 \pm 0,4$ (%) e a frutossamina de 391 ± 57 (μmol/L) para 297 ± 53 (μmol/L), embora o intervalo de tempo para o controle do DM tenha sido diferente entre os indivíduos.

Tabela 1 - Dados clínicos e bioquímicos dos indivíduos com DM nos períodos pré- e pós melhora do controle glicêmico (CG)

Indivíduos com DM	1	2	3	4	5	6
Idade (anos)	51	33	46	43	54	27
Sexo	M	M	M	M	F	F
Tipo	DM1	DM1	DM2	DM2	DM2	DM2
IMC (kg/m ²)	20,7	17,6	27	23,8	26,5	32,5
Tempo de diagnóstico (anos)	36	23	6	1	1	3
Hb (g/dL)	17,6	14,1	13,4	13,5	12,3	12,1
CT (mg/dL)	156	187	252	155	176	156
HDLc (mg/dL)	83	75	47	28	72	43
LDLc (mg/dL)	94	97	180	95	94	95
TG (mg/dL)	90	76	125	187	51	92
Glicemia Pré-CG (mg/dL)	98	184	147	128	239	135
Glicemia Pós-CG (mg/dL)	103	174	138	60	86	98
Frutosamina Pré-CG (μmol/L)	390	493	325	408	444	287
Frutosamina Pós-CG (μmol/L)	375	319	242	241	360	248
HbA1c Pré-CG (%)	9,2	13,7	12,9	16,5	10,5	8,5
HbA1c Pós-CG (%)	7	7,5	6,1	6,7	8,1	7,1
CML Pré-CG (mU/μg albumina)	50,1	14	40,7	98,5	24,9	13,3
CML Pós-CG (mU/μg albumina)	8	11,09	19	43,6	17,5	9,8
Insulina	+	+	+	+	+	+
Metformina			+	+	+	+
Pioglitazona					+	
Gliclazida				+		+
IECA/BRA			+		+	+
Estatina	+		+	+	+	+
Intervalo da coleta (meses)	12	21	4	2	5	6

IMC = índice de massa corporal; Hb = hemoglobina; CT = colesterol total; HDLc = colesterol na fração de lipoproteína de densidade alta; LDLc = colesterol na fração de lipoproteína de densidade baixa; TG = triglicérides, pré-CG = período pré-controle glicêmico; pós-CG = período após melhora do controle glicêmico; HbA1c = hemoglobina glicada; CML = carboximetil-lisina; IECA = inibidores da enzima conversora de angiotensina; BRA = bloqueadores do receptor AT1

A concentração de CML na albumina foi menor em todos os indivíduos no período pós-CG quando comparados ao pré-CG. Embora a meia vida plasmática da hemoglobina glicada e da albumina sejam bastante diferentes, bem como a cinética das reações de glicação que caracterizam, respectivamente, a formação da HbA1c e da albumina glicada, a porcentagem de alteração nestes parâmetros glicêmicos comparando o período pré- e pós-CG é evidenciado na **figura 7**. Em todos os 6 indivíduos com DM foi observada uma redução na HbA1c que foi acompanhada por uma diminuição de CML ligada à albumina.

Figura 7 - Porcentagem de mudança de CML ligada à albumina e HbA1c nos períodos pré- e pós melhora do controle glicêmico. O sangue foi isolado de indivíduos com DM (n=6) antes (pré-CG) e após (pós-CG) melhora do controle glicêmico. A HbA1c foi determinada por HPLC. A albumina sérica foi isolada por FPLC e purificada por extração alcoólica. A CML foi determinada por ELISA conforme descrito em Materiais e Métodos

5.2 Efluxo de colesterol em indivíduos portadores de DM1 e DM2 pré- e pós-CG

Devido à limitação na quantidade de amostras, as albuminas dos indivíduos 1 a 5 foram utilizadas para medir o efluxo de colesterol dos macrófagos e a expressão gênica, e aquelas dos indivíduos 1, 3 e 6 em experimentos para acessar o conteúdo total de ABCA-1 em macrófagos.

Conforme evidenciado na **figura 7**, as concentrações de CML na albumina diminuíram substancialmente após a melhora do CG nos indivíduos 1 a 5, dos quais a albumina foi utilizada para tratar macrófagos sobrecarregados em LDL acetilada e ^{14}C -colesterol. O efluxo de colesterol mediado por HDL₂ foi maior em macrófagos tratados com albumina isolada do soro de indivíduos no período pós-CG em comparação aquela isolada no pré-CG (**figura 8, painel A**). Na **figura 8, painel B**, os dados dos indivíduos 1 a 5 são mostrados juntos, demonstrando que o controle glicêmico foi capaz de recuperar a capacidade dos macrófagos em exportar o excesso de colesterol para a HDL₂, o que ocorre preferencialmente por intermédio do ABCG-1.

Em relação ao efluxo de colesterol mediado pela apoA-I, o qual reflete principalmente a atividade do ABCA-1, os macrófagos foram testados com albuminas isoladas dos sujeitos 1, 3 e 4. Também foi observada neste grupo uma maior exportação de colesterol quando tratados com albumina do período pós-CG em comparação ao pré-CG (**figura 8, painel C**), embora nenhuma diferença tenha sido observada quando os três indivíduos com DM foram representados juntos (**figura 8, painel D**).

Figura 8 - Efluxo de ^{14}C -colesterol de macrófagos tratados com albumina isoladas nos períodos pré- e pós-CG. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) de camundongos enriquecidos com LDL acetilada e ^{14}C -colesterol foram tratados com albuminas isoladas de indivíduos DM nos períodos pré- e pós-CG (painel A: indivíduos 1 a 5 isoladamente; painel B: indivíduos 1-5 juntos; painel C: indivíduos 1,3 e 4; painel D: indivíduos 1,3 e 4 juntos). O efluxo ^{14}C -colesterol foi determinado mediante incubação por 8 h com apoA-I (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $n=4$) ou HDL₂ (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $n=4$). As comparações foram feitas pelo Teste t de *Student* pareado (painéis A e C) e não pareado (painéis B e D). * $p < 0,05$

5.3 Conteúdo intracelular de lípidos em macrófagos incubados com albumina de indivíduos com DM isolada nos períodos pré- e pós-CG

A coloração com *Oil Red O* foi utilizada para avaliar o conteúdo de lípidos em macrófagos tratados com albumina isolada dos indivíduos 1 e 3 e expostos à apoA-I e HDL₂. A **figura 9** demonstra menor conteúdo intracelular de lípidos naquelas células expostas à albumina isolada no período pós-CG em comparação ao pré-CG, com exceção da incubação com apoA-I no indivíduo 3.

Figura 9 - Conteúdo intracelular de lípidos em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram tratados por 18 h com DMEM contendo 1 mg/mL de albumina isolada dos indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG (painel A, indivíduo 1; painel B, indivíduo 3). Após lavagem com PBS/FAFA, os BMDMs foram incubados novamente com albumina isolada dos indivíduos na presença apoA-I (30 $\mu\text{g/mL}$; $n=2$) ou HDL₂ (50 $\mu\text{g/mL}$; $n=2$). Os BMDMs foram corados com solução de *Oil Red O* por 2 h, seguindo-se lavagem com água destilada. As imagens foram capturadas por câmera acoplada a microscópio. Dez campos de cada lâmina foram analisados na magnitude de 400 x. O conteúdo de lípidos foi expresso como porcentagem do conteúdo de *Oil Red O* no campo pela área total (todo o campo da lâmina detectado pelo *software*). As comparações foram feitas pelo Teste t de *Student*, pareado. * $p < 0,05$

5.4 Expressão gênica em macrófagos tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-CG

Como o comprometimento do efluxo de colesterol induzido pelos AGEs foi previamente relacionado a anormalidades na expressão de genes que regulam a funcionalidade do ABCA-1, avaliamos a expressão de *Abca1*, *Nox4* e *Jak2* em macrófagos tratados com albumina dos indivíduos 1 e 3. A expressão do mRNA de *Abca1* foi semelhante entre os dois períodos do CG, mas as de *Nox4* e *Jak2* foram, respectivamente, reduzidas e aumentadas pela albumina do período pós-CG em comparação com a albumina pré-CG (**figura 10, painéis A, B e C**).

Figura 10 - Expressão gênica de *Nox4*, *Jak2* e *Abca1* em macrófagos tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-CG. Macrófagos J774 foram incubados com albumina isolada de indivíduos com DM, nos períodos pré- e pós-CG (2 mg de albumina/mL, por 18 h; indivíduos 1 e 3). O RNA total foi extraído e a RT-qPCR foi realizada com cDNA obtido a partir de 500 ng de RNA. Como controle endógeno foi utilizado o gene *Ipo8* (importina 8). O painel A representa a expressão gênica de *Nox4*, o painel B de *Jak2* e o painel C de *Abca1*. As comparações foram feitas pelo Teste t de Student, pareado (n=3). * p < 0,05

5.5 Conteúdo total de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG

Macrófagos J774 foram incubados com albumina isolada nos dois períodos de CG dos indivíduos 1,3 e 6 e o conteúdo total de ABCA-1 determinado por imunoblot. Conforme evidenciado na **figura 11**, em comparação com a albumina pré-CG, o conteúdo total de proteína ABCA-1 (fração de membrana e citosólica) foi 94% maior nos macrófagos tratados com a albumina do período pós-CG. Este resultado vincula-se à melhora do efluxo de colesterol celular observada com as albuminas pós-CG.

Figura 11 - Conteúdo de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada nos períodos pré- e pós-controle glicêmico. Macrófagos da linhagem J774 foram tratados por 18 h com albumina isolada dos indivíduos 1, 3 e 6, nos períodos pré-CG e pós-CG. Após lavagem com PBS, as células foram lisadas em tampão Tris e quantidade igual de proteína celular foi adicionada a gel de poliácridamida 6%. O imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCA-1. Os dados são apresentados como unidades arbitrárias corrigidas por beta-actina. Amostras derivadas do mesmo experimento foram processadas no mesmo gel. As comparações foram feitas pelo teste t de *Student* (média $\pm$ DP). * $p < 0,05$

5.6 Persistência do efeito da albumina de indivíduos com DM isolada nos períodos pré- e pós-CG sobre a secreção de TNF por macrófagos

Foram utilizados os indivíduos 2 e 6 para avaliação do efeito da albumina glicada pré- e pós-CG sobre a sensibilização de BMDMs à estimulação por LPS. A incubação com albumina do período pós-CG, seguida de tratamento com LPS, induziu menor produção de TNF em comparação à incubação com albumina isolada no período pré-CG (**figura 12**). Estes achados evidenciam que a albumina com maior modificação por glicação avançada, em particular, mais enriquecida em CML, potencializa a secreção de citocina inflamatória em macrófagos sobrecarregados em colesterol. Neste sentido, a redução de CML na albumina, obtida pela melhor adequação do controle glicêmico, reduz a injúria inflamatória promovida pelo LPS nestes macrófagos.

Figura 12 - Tempo de persistência do efeito da albumina isolada de indivíduos com DM nos períodos pré- e pós-CG sobre a secreção de TNF por macrófagos. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram incubados com DMEM com baixa concentração de glicose contendo albumina isolada nos períodos pré- e pós-CG (1 mg/mL de meio) dos indivíduos 2 e 6, por 48 h. Após este período, as células foram incubadas apenas com DMEM/FAFA por 4 h, 8 h e 12 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e a seguir tratadas com lipopolissacarídeo (LPS 1 µg/mL de meio), por 24 h. Os painéis A e C representam a secreção de TNF ao longo do tempo. Nos painéis B e D, a área sob a curva (AUC) da secreção de TNF foi calculada após a determinação desta citocina por ELISA. Teste t de *Student*, pareado (n = 3). * p < 0,05

5.7 Taxa de decaimento do ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina de indivíduos com DM1 com controle glicêmico inadequado e de indivíduos controles

Indivíduos saudáveis (C; n=5) e com DM1 com controle glicêmico inadequado (DM1; n=4) foram incluídos neste experimento. O grupo controle foi composto por indivíduos que não utilizavam nenhuma medicação, enquanto o grupo DM1 fazia uso de insulina NPH e regular, conforme destacado na **tabela 2**.

Tabela 2 - Dados clínicos e bioquímicos dos indivíduos controles e com DM1

Indivíduos	Controles (n=5)	DM1 (n=4)
Idade (anos)	28 ± 6	30 ± 6
IMC (kg/m ²)	25 ± 2,7	24,5 ± 2,4
Glicose (mg/dL)	78 ± 5	173 ± 48*
HbA1c (%)	5,3 ± 0,1	9,7 ± 0,5*
Frutosamina (μmol/L)	202 ± 25	414 ± 60*
CML (mU/μg albumina)	5,8 ± 2,3	23 ± 11,9*
Insulina	-	+

IMC = índice de massa corporal; HbA1c = hemoglobina glicada; CML = carboximetil-lisina; * p < 0,05

Conforme evidenciado na **figura 13**, observou-se um aumento de 20% na taxa de decaimento do ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina isolada dos indivíduos DM1 em comparação com a dos indivíduos controles. Esse resultado evidencia maior degradação do ABCA-1, caracterizando o menor conteúdo deste receptor em macrófagos e o prejuízo na remoção de colesterol pela apoA-I e HDL, com consequente acúmulo intracelular de lípidos.

Figura 13 - Taxa de decaimento de ABCA-1 em macrófagos J774 tratados com albumina isolada de indivíduos DM1 e indivíduos controles. Macrófagos J774 foram incubados com agonista de LXR (T0901317) por 12 h e, a seguir, expostos à um *pool* de albumina (2 mg/mL) isolada do soro de indivíduos controles saudáveis (C; n=5) e indivíduos com DM1 (n=4) na presença de ciclohexamida, ao longo do tempo. O imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCA-1 (1:1000), seguindo-se reação com anticorpo secundário. As bandas foram visualizadas após reação com ECL e foram corrigidas por beta-actina (painel A). A taxa de decaimento do ABCA-1 foi calculada pela área sob a curva (AUC) do conteúdo de ABCA-1 ao longo do tempo (painel B). As comparações foram feitas pelo teste t de *Student* (média $\pm$ DP). * $p < 0,05$

5.8 Persistência do efeito da albumina-GAD sobre a resposta inflamatória de macrófagos

A avaliação do tempo de persistência do efeito da albumina-GAD sobre a resposta inflamatória em macrófagos foi feita por meio da utilização de albumina modificada *in vitro* por glicolaldeído (albumina-GAD) em comparação à albumina controle (albumina-C). Conforme previamente descrito, os macrófagos foram incubados com albumina-C ou albumina-GAD por 48 h e a seguir, mantidos em meio isento de AGEs (apenas DMEM/FAFA) por intervalos crescentes de tempo que antecederam a incubação final com LPS, por 24 h.

Na **figura 14 (painéis A e B)**, observa-se que a secreção de TNF persistiu em macrófagos, mesmo após 8 h da retirada da albumina-GAD do meio de cultura. Após 12 e 24 h, não mais se observou aumento da produção de TNF em comparação às células tratadas com albumina-C (**figura 14, painéis C e D**).

Figura 14 - Tempo de persistência do efeito da albumina-GAD sobre a secreção de TNF por macrófagos. Macrófagos foram incubados com DMEM com baixa concentração de glicose (Gibco) contendo albumina-C (1 mg/mL) ou albumina-GAD (1 mg/mL), por 48 h. Após este período, as células foram incubadas com meio isento em AGEs (DMEM/FAFA) por 2 h, 4 h, 6 h ou 8 h (painel A) e 2 h, 12 h e 24 h (painel C), lavadas novamente com PBS/FAFA, e a seguir tratadas com lipopolissacarídeo (LPS 1 µg/mL de meio), por 24 h. A concentração TNF foi determinada por ELISA. O painel B representa a área sob a curva (AUC) da secreção de TNF relativa ao painel A. O painel D representa a razão entre a secreção de TNF observada na albumina-GAD em relação à albumina-C, descritas nos painéis A e C. * $p < 0,05$ nos tempos 2, 4, 6 e 8 h em relação aos controles (painel A); * $p < 0,05$ albumina-GAD em relação ao controle (painel B); * $p < 0,05$ albumina-GAD no tempo 2 h em comparação ao controle (painel C); # $p < 0,05$ albumina-GAD em comparação aos demais tempos (painéis C e D)

De modo semelhante, na **figura 15**, observa-se que a secreção de IL-6 foi muito maior em macrófagos previamente sensibilizados pela albumina-GAD, efeito este que se manteve até 8 h após a retirada da albumina-GAD.

Figura 15 - Tempo de persistência do efeito da albumina-GAD sobre a secreção de IL-6 por macrófagos. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs) foram incubados com DMEM com baixa concentração de glicose (Gibco) contendo albumina-controle (1 mg/ml de meio) ou albumina-GAD (1 mg/ml de meio), por 48 h. Após este período, os BMDMs foram incubados com meio isento em AGEs (DMEM/FAFA) por 2 h, 4 h, 6 h ou 8 h, lavadas novamente com PBS/FAFA, e a seguir tratadas com lipopolissacarídeo (LPS; 1 µg/mL), por 24 h. A concentração IL-6 foi determinada por ELISA (painel A). O painel B representa a área sob a curva (AUC) da secreção de IL-6 relativa ao painel A.* $p < 0,05$ albumina-GAD em comparação ao respectivo controle nos tempos 2, 4, 6 e 8 h (painel A); * $p < 0,05$ em comparação ao controle (painel B)

5.9 Persistência do efeito da albumina-GAD sobre a redução do efluxo de colesterol de macrófagos

Conforme evidenciado na **figura 16**, o efluxo de colesterol mediado por HDL₂ e HDL₃ foi menor em macrófagos tratados com albumina-GAD em comparação à albumina-C, mesmo após 9 h da retirada da albumina-GAD do meio de cultura (**painéis A e C**), o que se normalizou 12 h após o fim da exposição (**painéis B e D**).

Figura 16 - Persistência do efeito da albumina-GAD (modificada *in vitro*) sobre a redução do efluxo de ¹⁴C-colesterol de macrófagos. Macrófagos derivados de células indiferenciadas da medula óssea (BMDMs), enriquecidos com LDL acetilada e ¹⁴C-colesterol, foram tratados com albumina-C ou albumina-GAD. O efluxo de ¹⁴C-colesterol foi determinado mediante incubação por 8 h com HDL₂ (50 µg/ml; n=4) ou HDL₃ (50 µg/ml; n=4). Os painéis A e C representam o efluxo de ¹⁴C-colesterol ao longo do tempo mediados pela HDL₂ e HDL₃, respectivamente. Os painéis B e D representam a razão entre o efluxo de ¹⁴C-colesterol observado na albumina-GAD e albumina-C dos painéis A e C, respectivamente. As comparações foram feitas pelo teste t de *Student*. * p < 0,05 em comparação ao controle nos tempos 0 h, 3 h, 6 h e 9 h para HDL₂ (painel A) e 0 h, 6 h e 9 h para HDL₃ (painel C). # p < 0,05 no tempo 12 h em comparação aos demais tempos (painéis B e D)

6 DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

Os estudos DCCT/EDIC e UKPDS evidenciaram claramente uma relação direta entre os valores de HbA1c e a incidência de doenças cardiovasculares. Os AGEs são prevalentes no DM, especialmente frente ao mau controle glicêmico, e se associam independentemente com a doença cardiovascular. Isto se deve, em parte, ao fato de prejudicarem o metabolismo lipídico e favorecerem a captação de LDL por macrófagos em detrimento de sua remoção pelas HDL e fluxo ao longo do TRC. No presente estudo, avaliamos se a melhora do controle glicêmico em indivíduos com DM reverte o impacto negativo da albumina modificada por glicação avançada sobre a homeostase do colesterol em macrófagos e se há persistência do efeito deletério desta albumina em macrófagos.

O efluxo de colesterol mediado por apoA-I e HDL₂ foi determinado em macrófagos enriquecidos em colesterol, previamente tratados com albumina isolada do soro de indivíduos com DM antes e após melhora do CG. Seis indivíduos foram analisados de modo independente, de acordo com a redução de HbA1c, frutossamina e glicação avançada da albumina (determinada pela CML). As incubações realizadas com albumina sérica isolada no período pós-CG evidenciam maior efluxo de colesterol para apoA-I e HDL₂ com redução dos lípidos intracelulares em comparação às incubações com albumina isolada no período pré-CG.

A albumina é a principal proteína sérica modificada pela glicação no DM, o que é atribuído à sua alta concentração na circulação e à presença de 59 resíduos de lisina em sua estrutura, facilitando sua modificação durante a hiperglicemia. A albumina glicada é positivamente correlacionada com a HbA1c e ambas se associam independentemente à doença coronariana, acidente vascular encefálico isquêmico, insuficiência cardíaca e mortalidade geral (Selvin et al., 2015). Além disso, a albumina glicada foi capaz de refletir o risco de aterosclerose subclínica avaliada pela espessura íntima-média

carotídea em populações chinesas de meia-idade e idosas com homeostase glicêmica prejudicada (Ma et al., 2015).

Embora sua meia-vida não seja longa, a albumina é modificada pelos AGEs devido à reação com os oxoaldeídos, que são elevados no DM, principalmente no período pós-prandial. Concentrações elevadas de oxoaldeídos estão relacionadas à doença cardiovascular, infarto do miocárdio e mortalidade em indivíduos com DM2 (Hanssen et al., 2018). Mesmo que a cinética para glicação avançada na albumina (representada pelo conteúdo de CML) seja diferente daquela da glicação da HbA1c - a qual representa produto precoce de glicação - foi observada uma redução paralela em ambos os parâmetros em todos os seis indivíduos com DM analisados nos dois períodos de compensação metabólica.

Ao buscar o papel dos AGEs na fisiopatologia da aterosclerose *in vivo* e *in vitro*, experimentos prévios evidenciaram que a albumina glicada isolada de indivíduos com DM com controle glicêmico inadequado prejudica a atividade do ABCA-1 (Machado-Lima et al., 2013; Machado-Lima et al., 2015), independentemente de mudanças em sua expressão (Iborra et al., 2018).

No presente estudo, observou-se que a expressão de genes que regulam a funcionalidade do ABCA-1 é modulada favoravelmente pela melhora do CG. A expressão de *Jak2* foi maior nas células tratadas com albumina do período pós-CG em comparação às do pré-CG. A via JAK2/STAT3 está envolvida na regulação positiva do ABCA-1 e modula positivamente a ligação da apoA-I ao ABCA-1, a remoção de lípidos celulares e a resposta anti-inflamatória. Por outro lado, células com inibição seletiva de JAK2 tem o efluxo lipídico mediado por ABCA-1 prejudicado (Tang; Vaughan; Oram, 2004; Tang et al., 2009; Fu et al., 2014).

A expressão do mRNA da *Nox4* (a principal isoforma de NADPH oxidase em macrófagos), por sua vez, foi diminuída pela albumina do período pós-CG em comparação com macrófagos tratados com albumina do pré-CG. A estimulação da NADPH oxidase pelos AGEs favorece a geração de ROS, o que se relaciona ao estabelecimento de estresse de retículo endoplasmático

e ao comprometimento do efluxo de colesterol mediado por ABCA-1 em macrófagos (Castilho et al., 2012; de Souza Pinto et al., 2012). A via de degradação de proteínas associada ao estresse de retículo endoplasmático (ERAD) vincula-se à destruição de proteínas mal enoveladas pelo sistema proteasomal e lisossomal. De fato, evidenciou-se maior degradação de ABCA-1 por ambos os sistemas em macrófagos expostos à albumina modificada por glicação avançada. Deste modo, embora a transcrição gênica de *Abca1* esteja preservada, o conteúdo proteico final deste receptor é reduzido por sua degradação intracelular, independentemente da ação de calpaínas de superfície celular. No presente estudo, não foram investigadas as vias clássicas de adaptação às proteínas mal enoveladas (UPR; *unfolded protein response*), tampouco as vias de degradação de ABCA-1. Entretanto, ficou evidente que a melhora do CG é capaz de restaurar o conteúdo de ABCA-1 em macrófagos e que, quando comparado a albumina de indivíduos controles, a albumina de indivíduos com DM1 com controle glicêmico inadequado acelera a degradação deste receptor.

O maior conteúdo de ABCA-1 foi claramente demonstrado em macrófagos incubados com albumina isolada no pós-GC em comparação com amostras obtidas dos mesmos indivíduos durante o período pré-GC. Este achado vai ao encontro daqueles reportados por Iborra e cols. (2018), onde a exposição de macrófagos à albumina modificada por glicação avançada *in vitro* provocou uma degradação mais rápida do ABCA-1, o que pode ser prevenido pelo silenciamento do RAGE (Iborra et al., 2018).

As vias desencadeadas por ROS ainda são desconhecidas, uma vez que a regulação negativa de ABCA-1 pela albumina modificada por produtos de glicação avançada parece ser mediada pela via JAK2/STAT1 (Mo et al., 2011). Em outro estudo, suprimindo a geranilação de Rac-1, e consequentemente a atividade da NADPH oxidase, a rosuvastatina foi capaz de prevenir a redução na exportação de colesterol induzida por AGEs (Ishibashi et al., 2011).

Os dados obtidos com o efluxo de colesterol, conteúdo de lípidos intracelulares, expressão gênica e degradação do ABCA-1 foram reforçados por aqueles encontrados em incubações com albumina sérica de indivíduos DM1 descompensados em comparação com indivíduos controles sem DM. Gourgari e cols. (2018) demonstraram que a queda do efluxo de colesterol em indivíduos jovens DM1 é um importante componente da manifestação precoce de aterosclerose nesta população, tendo sido observada com uma diferença de cerca de 2% de HbA1c (9,1% versus 7,2% em indivíduos DM1 entre 12 e 21 anos de idade), o que é em grande parte é mediado pelo aumento da degradação do ABCA-1 via sistema proteasomal (Iborra et al., 2018).

Cerca de 30 anos após o início do estudo DCCT, observou-se uma menor propensão à incidência de eventos cardiovasculares nos indivíduos participantes do grupo sob tratamento intensivo em relação ao grupo sob tratamento convencional, apesar de a média da HbA1c em ambos os grupos ter sido semelhante no seguimento de longo prazo (aproximadamente 8%). Microalbuminúria sustentada e macroalbuminúria foram mais frequentes no grupo tratamento convencional, além de ser observada uma redução de risco de eventos cardiovasculares de 30% no grupo tratamento intensivo (HR 0,70; IC 95%), apesar de uma menor magnitude de redução de risco quando comparado aos resultados de 10 anos do EDIC (RRR 47%). Embora estes resultados não possam ser extrapolados para indivíduos mais velhos ou portadores de DM2, supõe-se que esta redução do risco advinha do benefício do tratamento intensivo precoce, embora o estudo não tenha sido originalmente desenhado para esta finalidade (DCCT/EDIC Study Group, 2016).

Biópsias de pele advindas destes indivíduos demonstraram que as concentrações de AGE fluorescentes e imunorreativos no colágeno, bem como os AGEs/produtos de glicoxidação específicos (pentosidina e CML) correlacionaram-se com a duração do DM e, em vários graus, com a gravidade da retinopatia e nefropatia em portadores de DM1. Ainda não é claro se o controle glicêmico intensivo em longo prazo evitaria concentrações elevadas de AGEs ou mesmo retardar seu aumento (Monnier et al., 1999).

O tratamento de macrófagos com albumina pré-CG de indivíduos diabéticos e LPS levou ao aumento da secreção de TNF, efeito este que foi reduzido quando comparado com a albumina pós-CG. Estes achados evidenciam que a albumina glicada aumenta o potencial inflamatório de macrófagos frente ao estímulo com LPS, o que é potencializado pelo excesso de colesterol celular, capaz de modular negativamente o efluxo de colesterol. Estes achados vão ao encontro do demonstrado por Okuda e cols. (2012), onde a sensibilização prévia à albumina glicada foi fundamental para um maior efeito inflamatório nos macrófagos quando estimulado por LPS.

Os experimentos com albumina *in vivo* foram complementados com avaliação da persistência da memória metabólica utilizando-se albumina modificada por glicação *in vitro* por glicolaldeído (GAD). Observou-se uma persistência do efeito deletério da albumina-GAD até 8 h após o fim da exposição ao AGE, gerando maior produção de mediadores inflamatórios (TNF e IL-6) quando comparados ao controle, e provocando uma queda no efluxo de colesterol mediado por HDL₂ e HDL₃, que se normalizou 12 h após o fim da exposição à albumina-GAD. Estudo prévio havia observado uma redução de 54% e 55% no efluxo de colesterol mediado pela HDL₂ e HDL₃, respectivamente, porém a persistência deste efeito e recuperação após o repouso em meio isento de AGEs ainda não havia sido demonstrada (Machado-Lima et al., 2015).

Recentemente foi evidenciado em células endoteliais vasculares de cordão umbilical humano que a albumina glicada humana é capaz de regular proteínas envolvidas na disfunção endotelial, relacionadas à apoptose, ao estresse oxidativo e à cascata de NF-KB induzida pela sinalização AGE-RAGE (Banarjee et al., 2018). Os efeitos deletérios da albumina ligada à AGEs na homeostase do colesterol são mostrados como mediados pelo RAGE, receptor altamente expresso em placas ateroscleróticas, uma vez que estes efeitos não foram observados em macrófagos de camundongos *knockout* para RAGE (Machado-Lima et al., 2020). Em outro estudo, foi demonstrado que BMDM de camundongos diabéticos apresentaram redução do efluxo de colesterol para apoA-I e HDL, em comparação com o BMDM de animais

controle. A deleção de *Ager* (RAGE) melhorou o efluxo de colesterol para ambos os receptores (Daffu et al., 2015). No entanto, ainda é desconhecido o envolvimento de outros receptores AGE, como AGER-1, AGHER-3, LOX-1, SR-A, SR-BI e receptores *toll-like*, e também como as isoformas solúveis em RAGE podem neutralizar os efeitos da albumina glicada.

Embora outros componentes da síndrome metabólica subjacente ao DM possam atuar como determinantes do risco cardiovascular, este experimento foi capaz de demonstrar que a albumina sérica purificada pode modular o fluxo lipídico em macrófagos, o que está sob influência direta do controle glicêmico.

É interessante que, independentemente dos valores de HDL-c e apoA-I, utilizados como métrica de proteção cardiovascular, os AGEs podem favorecer a aterosclerose, por limitar a habilidade das HDLs em remover colesterol por intermédio do ABCA-1. Em macrófagos enriquecidos em lípidos a exportação do excesso de colesterol pelo ABCA-1 é a principal via de regulação da homeostase lipídica. Ademais, a glicação avançada também compromete a expressão e a atividade de outros receptores de HDL envolvidos no efluxo de colesterol, como os receptores ABCG-1 e SR-BI (Vèrges, 2009).

No organismo humano, a presença de DM com glicemia não controlada favorece a glicação de lipoproteínas, concorrendo para o maior aporte de LDL glicadas à íntima arterial as quais são avidamente captadas pelo RAGE expresso em macrófagos. Além disso, LDL pequenas e densas, predominantes na dislipidemia da síndrome metabólica, são mais sensíveis à modificação por glicação e menos reconhecidas pelos receptores de LDL do tipo B-E. De outro lado, a glicação da HDL prejudica seu reconhecimento pelos receptores e sua habilidade em mediar o TRC, inibir a oxidação de LDL e a resposta inflamatória.

O TRC é um sistema antiaterogênico e alterações em suas etapas são comumente relacionadas à aterogênese no DM (Daffu et al., 2015). Esta investigação, baseada em modelo de cultura celular, reforça os achados de

ensaios clínicos mostrando que o controle glicêmico melhora o TRC em macrófagos, contribuindo para prevenir o desenvolvimento da aterosclerose.

As partículas de apoA-I 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), sendo que as partículas de HDL maduras (HDL₂) também são capazes de remover o excesso de colesterol celular via receptor ABCG-1 (Okuda et al., 2012). Assim, a avaliação do efluxo de colesterol mediado tanto pela apoA-I quanto pela HDL permite elucidar os mecanismos de comprometimento do TRC no DM.

Em uma coorte recentemente estudada com 8267 participantes foi demonstrado que a capacidade de efluxo de colesterol mediada pela HDL se correlacionou com a incidência de doença cardiovascular na população geral de independentemente das concentrações de HDL-c e apoA-I plasmáticas (Ebtehaj et al., 2019). Em humanos, o papel do controle glicêmico adequado no TRC foi abordado por Fadini e cols. (2014). Estes autores demonstraram que a redução da HbA1c se correlacionou com o aumento do HDL-c, mas não com a melhora da função do HDL ao longo do TRC, embora o grau de glicação da HDL não tenha sido investigado.

Uma limitação do presente estudo é o fato de não termos explicado outras modificações na partícula de albumina além de sua glicação avançada, incluindo fármacos e outros componentes transportados pela albumina. No entanto, o estudo foi capaz de confirmar a especificidade da glicação na indução do prejuízo do efluxo de colesterol como anteriormente relatado (Machado-Lima et al., 2013; Machado-Lima et al., 2015). Outra limitação é o fato de não termos dosado outros AGEs, como a furosina, pentosidina, carboxietil-lisina e hidroimidazolonas, bem como não termos utilizado a metodologia de HPLC para a dosagem das amostras, considerado como o melhor método para determinação de AGEs (Monnier et al., 1999; de Vos et al., 2017). Apesar disso, a determinação de CML por ELISA apresenta uma acurácia adequada quando comparada ao padrão-ouro (Boschetto et al.,

2013; Gómez Ojeda et al., 2017), e sua relevância como um dos principais AGEs *in vivo* permanece atual na literatura (de Vos, 2017; Ruiz, Ramasamy, Schmidt, 2020), se relacionando ao aumento da expressão de CD36 e SR-BI em macrófagos e induzindo o acúmulo de lípidos, acelerando o processo da aterosclerose (Bao et al., 2020).

Apesar de um número pequeno de indivíduos, considerando que a maior partes das análises foram realizadas de modo pareado (pré- e pós-CG), e considerando o *effect size* das principais variáveis de acordo com o estudo-referência (Machado-Lima, 2015), conseguimos obter amostragem com poder suficiente para demonstrar que, do ponto de vista mecanicista, a melhora do controle glicêmico em indivíduos com DM reverteu o impacto negativo da albumina glicada no efluxo de colesterol dos macrófagos, ao reduzir a taxa de decaimento do ABCA-1, aumentando o conteúdo da proteína ABCA-1 e tornando-a mais funcional por meio da modulação positiva da expressão dos genes *Jak2* e *Nox4*. Como prova de conceito, esta investigação baseada em modelo de cultura de células reforça achados de ensaios clínicos que mostram que o controle glicêmico pode melhorar o TRC em macrófagos, contribuindo para prevenir o desenvolvimento de aterosclerose.

Também devemos ter em mente que devido à limitação da amostra não foi possível realizar uma correlação estatística entre concentrações de hemoglobina, frutossamina e AGE com a taxa de efluxo de colesterol e outras variáveis que foram medidas neste estudo. Assim, não poderíamos estabelecer um ponto de corte nesses parâmetros para obter uma melhor resposta do TRC, o que requer um grande estudo populacional.

Assim, considerando a grande quantidade de AGEs no DM, e também em alimentos processados, dietas ricas em gorduras e sua geração independentemente da hiperglicemia, estes dados indicam papel importante dos AGEs no dano ao TRC que pode implicar no desenvolvimento da aterosclerose.

7 CONCLUSÃO

---

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam que a melhora do controle glicêmico em indivíduos com DM reverteu o impacto negativo da albumina glicada sobre o efluxo de colesterol de macrófagos, reduzindo a taxa de decaimento de ABCA-1, aumentando o conteúdo proteico deste receptor e tornando-o mais funcional, por meio da modulação favorável da expressão de *Jak2* e *Nox4*. Além disso, a albumina AGE apresenta um efeito persistente em macrófagos que pode contribuir para perturbações lipídicas baseados na memória metabólica celular.

8 DOCUMENTOS ANEXOS

---

8 DOCUMENTOS 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 SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

MEMÓRIA METABÓLICA E PREJUÍZO NO TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL DE MACRÓFAGOS NO DIABETE MELITO: investigação da persistência do efeito da albumina modificada por glicação avançada sobre o estresse inflamatório e de retículo endoplasmático

2. PESQUISADOR:

PESQUISADOR PRINCIPAL: Dra. Marisa Passarelli

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dr. Carlos André Minanni

CARGO/FUNÇÃO: Médico – CRM/SP 140.675

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Lípidos (LIM-10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da USP e Ambulatório de Diabetes do HCFMUSP

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. Convidamos o(a) Sra. para participar voluntariamente desta pesquisa que visa mostrar que o controle do diabetes é importante para prevenir as doenças cardiovasculares, ocasionados pelo acúmulo de gordura nos vasos. Este estudo tem a finalidade de avaliar parâmetros importantes para o controle do diabetes (como o açúcar, as gorduras, a hemoglobina glicada e a albumina glicada) e sua associação com complicações cardiovasculares.
2. Serão realizadas duas coletas de sangue de 60 mL por punção periférica da veia do antebraço, após jejum de 12 horas, para determinação do açúcar, das gorduras, da hemoglobina e albumina glicada, da frutamina, além do isolamento de todas as frações que transportam o colesterol no sangue. Uma coleta será feita no período inicial, quando seu controle do diabetes ainda estiver insatisfatório. A outra coleta será realizada após a melhora do diabetes. O intervalo entre uma coleta e outra será avisado pelo médico, pois pode variar de pessoa para pessoa. É importante que seja seguida toda orientação e prescrição médica.
3. Os riscos e desconfortos da coleta de sangue serão pequenos e podem incluir: dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa, sem risco à saúde.
4. Deverá ser mantida a dieta e a medicação habitual, de acordo com recomendação médica, bem como o agendamento de todas as consultas, como usual.
5. Espera-se que você atinja bom controle de sua glicose no sangue. Os estudos realizados no laboratório em células permitirão compreender como a redução da hemoglobina e albumina glicada podem prevenir as complicações cardíacas do diabetes.
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 o Dr Carlos André Minanni, que pode ser encontrado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar sala 3305, telefone 3061-7263, ovelgov, e-mail: carlos.minanni@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: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.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 Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

10. Não cabe indenização pelo fato de o 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).

12. Você receberá uma via do termo deste termo de consentimento.

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:.....

8.2 Parecer consubstanciado Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MEMÓRIA METABÓLICA E PREJUÍZO NO TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL DE MACRÓFAGOS NO DIABETE MELITO: investigação da persistência do efeito da albumina modificada por glicação avançada sobre o estresse inflamatório e de retículo endoplasmático

Pesquisador: Marisa Pessarelli

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80899317.4.0000.0068

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.453.384

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto para avaliar se os efeitos deletérios da alb-AGE sobre o TRC em macrófagos possam perdurar, mesmo após a retirada do insulto glicoxidativo e que a regularização do controle glicêmico dos pacientes. Para tanto, serão isoladas albumina do soro de pacientes portadores de diabetes melito antes (HbA1c: 8%) e após (HbA1c: 7%) adequação do controle glicêmico e albumina controle ou modificada in vitro por glicação avançada.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Avaliar, em macrófagos: 1) o efeito do controle glicêmico sobre a sensibilização à resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeos, estresse de retículo endoplasmático e efluxo de colesterol e 2) a persistência do efeito da albumina-AGE sobre o estresse inflamatório, oxidativo e de retículo endoplasmático. Para atingir esses dois objetivos, será isolada albumina do soro de pacientes portadores de DM1 e 2 antes (HbA1c 8%) e após (HbA1c 7%) adequação do controle glicêmico e albumina controle ou modificada in vitro por glicação avançada.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, referentes apenas à coleta de sangue por punção venosa, a qual pode ocasionar desconforto leve e pequeno hematoma.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 325 5º andar
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2061-7585 **Fax:** (11)2061-7585 **E-mail:** cappelapq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.453.384

Não há benefícios diretos aos participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com metodologia adequada aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE escrito em linguagem clara e compreensível.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências, e adequado para aprovação.

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_P ROJETO_902949.pdf	07/12/2017 08:16:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcleversao.nova.docx	07/12/2017 08:15:45	Marisa Passarelli	Aceito
Brochura Pesquisa	cadastro.novo.pdf	08/06/2017 10:59:39	Marisa Passarelli	Aceito

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11) 2661-7585

Fax: (11) 2661-7585

E-mail: cappel@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.453.384

Folha de Rosto	folhaderostonova.pdf	08/06/2017 10:58:43	Marisa Passarelli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pesquisacarlosminanni.docx	20/04/2017 13:07:03	Marisa Passarelli	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 21 de Dezembro de 2017

Assinado por:

Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2061-7585 Fax: (11)2061-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

8.3 Comissão de ética no uso de animais

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 “**MEMÓRIA METABÓLICA E PREJUÍZO NO TRANSPORTE REVERSO DE COLESTEROL DE MACRÓFAGOS NO DIABETE MELITO: investigação da persistência do efeito da albumina modificada por glicação avançada sobre o estresse inflamatório e de retículo endoplasmático**”, registrada com o nº 071/17, sob a responsabilidade de **Marisa Passarelli e Carlos Andre Minamni**, 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 07.06.17

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 25-05-2017 Término: 25-05-2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	66
Peso/Idade	07 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

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

CEUA-FMUSP, 07 de Junho de 2017

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

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

9 REFERÊNCIAS

---

9 REFERÊNCIAS

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

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

Banarjee R, Sharma A, Bai S, Deshmukh A, Kulkarni MJ. Proteomic study of endothelial dysfunction induced by AGEs and its possible role in diabetic cardiovascular complications. *Proteomics*. 2018; 187:69-79.

Basu SK, Goldstein JL, Anderson RW, Brown MS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1976; 73:3178-82.

Bao Z, Li L, Geng Y, Yan J, Dai Z, Shao C, Sun Z, Jing L, Pang Q, Zhang L, Wang X, Wang Z. Advanced Glycation End Products Induce Vascular Smooth Muscle Cell-Derived Foam Cell Formation and Transdifferentiate to a Macrophage-Like State. *Mediators Inflamm*. 2020:6850187.

Boschetto P, Campo I, Stendardo M, Casimirri E, Tinelli C, Gorrini M, Ceconi C, Fucili A, Potena A, Papi A, Ballerini L, Fabbri LM, Luisetti M. Plasma sRAGE and N-(carboxymethyl) lysine in patients with CHF and/or COPD. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43(6):562-9.

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

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

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

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

Cooper ME, El-Osta A, Allen TJ, Watson AMD, Thomas MC, Jandeleit-Dahm KAM. Metabolic Karma—The Atherogenic Legacy of Diabetes: The 2017 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes* 2018; 67:785-90.

Daffu G, Shen X, Senatus L, Thiagarajan D, Abedini A, Hurtado Del Pozo C, Rosario R, Song F, Friedman RA, Ramasamy R, Schmidt AM. RAGE suppresses ABCG1-mediated macrophage cholesterol efflux in diabetes. *Diabetes*. 2015; 64(12):4046-60.

Danaei G, Lawes CM, Vander HS, et al. Global and regional mortality from ischaemic heart disease and stroke attributable to higher than-optimum blood glucose concentration: comparative risk assessment. *Lancet* 2006;368:(9548)1651-9.

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

De Souza Pinto R, Castilho G, Paim BA, Machado-Lima A, Inada NM, Nakandakare ER, Vercesi AE, Passarelli M. Inhibition of macrophage oxidative

stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycated albumin. *Lipids*. 2012; 47(5):443-50.

De Vos LC, Boersema J, Hillebrands JL, Schalkwijk CG, Meerwaldt R, Breek JC, Smit AJ, Zeebregts CJ, Lefrandt JD. Diverging effects of diabetes mellitus in patients with peripheral artery disease and abdominal aortic aneurysm and the role of advanced glycation end-products: ARTERY study — protocol for a multicentre cross-sectional study. *BMJ Open* 2017;7(4).

Ebtehaj S, Gruppen EG, Bakker SJL, Dullaart RPF, Tietge UJF. HDL (High-Density Lipoprotein) cholesterol efflux capacity is associated with incident cardiovascular disease in the general population A case-control study from the PREVEND Cohort. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019; 39:1874-83.

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

Fadini GP, Iori E, Marescotti MC, Vigili de Kreutzenberg S, Avogaro A. Insulin-induced glucose control improves HDL cholesterol levels but not reverse cholesterol transport in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*. 2014; 235(2):415-7.

Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem*. 1998; 273:18714-9.

Fu H, Tang YY, Ouyang XP, Tang SL, Su H, Li X, Huang LP, He M, Lv YC, He PP, Yao F, Tan YL, Xie W, Zhang M, Wu J, Li Y, Chen K, Liu D, Lan G, Zeng MY, Zheng XL, Tang CK. Interleukin-27 inhibits foam cell formation by

promoting macrophage ABCA1 expression through JAK2/STAT3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014; 452(4):881-7.

Furusyo N, Koga T, Ai M, Otokozawa S, Kohzuma T, Ikezaki H, Schaefer EJ, Hayashi J. Plasma glycated albumin level and atherosclerosis: Results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Int J Cardiol.* 2013; 167(5):2066-72.

Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J. Med.* 2008; 358:580-91.

Genuth S, Sun W, Cleary P, Gao X, Sell DR, Lachin J, Monnier VM. The DCCT/EDIC Research Group. Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes. *Diabetes* 2015; 64:266-78.

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

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

Gómez-Ojeda A, Jaramillo-Ortíz S, Wrobel K, Wrobel K, Barbosa-Sabanero G, Luevano-Contreras C, de la Maza MP, Uribarri J, Del Castillo MD, Garay-Sevilla ME. Comparative evaluation of three different ELISA assays and HPLC-ESI-ITMS/MS for the analysis of N ϵ -carboxymethyl lysine in food samples. *Food Chem.* 2018;15(243):11-18.

Gomez Rosso LA, Lhomme, M, Meroño, T, Dellepiane A, Sorroche PB. Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL_{3c}; Elsevier Science; Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids; 2017. p. 188-195.

Gourgari E, Playford MP, Campia U, Dey AK, Cogen F, Gubb-Weiser S, Mete M, Desale S, Sampson M, Taylor A, Rother KI, Remaley AT and Mehta NN. Low cholesterol efflux capacity and abnormal lipoprotein particles in youth with type 1 diabetes: a case control study. Cardiovasc Diabetol. 2018;17:158.

Greifenhagen U, Frolov A, Blüher M, Hoffmann B. Plasma proteins modified by Advanced Glycation Endproducts (AGEs) reveal site-specific susceptibilities to glycemic control in patients with type 2 diabetes. J Biol Chem. 2016;291(18):9610-6.

Hanssen NMJ, Westerink J, Scheijen LJ, van der Graaf Y, Stehouwer CDA, Schalkwijk CG and on behalf of the SMART Study Group. Higher plasma methylglyoxal levels are associated with incident cardiovascular disease and mortality in individuals with type 2 diabetes. Diabetes Care 2018;41(8):1689-95.

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

Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest. 1955.34:1345-53.

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

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

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

Ihnat MA, Thorpe JE, Kamat C, Szabó C, Green DE, Warnk LA, Lacza Z, Cselenyák A, Ross K, Shakir S, Piconi L, Kaltreider R, Ceriello A. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia.* 2007;50:1523-31.

International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019.

Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Rosuvastatin blocks advanced glycation end products-elicited reduction of macrophage cholesterol efflux by suppressing NADPH oxidase activity via inhibition of geranylgeranylation of Rac-1. *Horm Metab Res.* 2011;43(9):619-24.

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

Kato H, Shin DB, Hayase F. 3-Deoxyglucosone cross-links proteins under physiological conditions. *Agric Biol Chem.* 1987;51: 2009-11.

Koekemoer AL, Codd V, Masca NGD, Nelson CP, Musameh MD, Kaess BM, Hengstenberg C, Rader DJ, Samani NJ. Large-Scale Analysis of determinants, stability, and heritability of high-density lipoprotein cholesterol efflux capacity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37:1956-62.

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

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

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

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

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

Ma X, Shen Y, Hu X, Hao Y, Luo Y, Tang J, Zhou J, Bao Y, Jia W. Associations of glycated haemoglobin A1c and glycated albumin with subclinical atherosclerosis in middle-aged and elderly Chinese population with impaired glucose regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2015;42(6):582-7.

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

Machado-Lima A, Iborra TR, Pinto RS, Sartori CH, Oliveira ER, Nakandakare ER, Stefano JT, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella MLC, Passarelli M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA1-mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes Metab Res Rev*. 2013;29(1):66-76.

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

Machado-Lima A, Lopez-Diez R, Iborra RT, Pinto RS, Daffu G, Shen X, Nakandakare ER, Machado UF, Corrêa-Ginnella MLC, Schmidt AM, Passarelli M. RAGE mediates cholesterol efflux impairment in macrophages caused by human advanced glycated albumin. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):E7265.

Mo ZC, Xiao J, Liu XH, Hu YW, Li XX, Yi GH, Wang Z, Tang YL, Liao DF, Tang CK. AOPPs inhibits cholesterol efflux by down-regulating ABCA1 expression in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(9):796-807.

Monnier VM, Bautista O, Kenny D, Sell DR, Fogarty J, Dahms W, Cleary PA, Lachin J, Genuth S. Skin collagen glycation, glycoxidation, and crosslinking are lower in subjects with long-term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c as markers of diabetic complications. DCCT Skin Collagen Ancillary Study Group. *Diabetes Control and Complications Trial*. *Diabetes*. 1999;48(4):870-80.

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

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

Neelofar K, Arif Z, Alam K, Ahmad J. Hyperglycemia induced structural and functional changes in human serum albumin of diabetic patients: a physico-chemical study. *Mol Biosyst*. 2016;12(8):2481-9.

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

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

Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Eur Heart J*. 2013;34:2436-46.

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

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

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;1;29(9).

Patton AR, Hill EG. Inactivation of nutrients by heating with glucose. *Science*. 1948;107(2768):68-9.

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

Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969;22;36(5):838-43.

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.

Rabbani N, Thornalley PJ. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018;93(4):803-13.

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

Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry*. 1995;34(34):10872-8.

Redgrave TG., Roberts DCK, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density gradient ultracentrifugation. *Analyt Biochem*. 1975 65:42-9.

Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125(15):1905-19.

Ruiz HH, Ramasamy R, Schmidt AM. Advanced glycation end products: building on the concept of the “Common Soil” in metabolic disease. *Endocrinology*. 2020;161 (1):bqz006.

Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptog S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvi E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S Pennells, L Thompson, A Sattar, White IR, Ray KK, Danesh, J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Emerging Risk Factors Collaboration Lancet*; 2010; 375(9733): 2215-22.

Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(10):1521-8.

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

Selvin E, Rawlings AM², Lutsey PL, Maruthur N, Pankow JS, Steffes M, Coresh J. Fructosamine and glycated albumin and the risk of cardiovascular outcomes and death. *Circulation*. 2015 132(4):269-77.

Snelson M, Coughlan MT. Dietary advanced glycation end products: digestion, metabolism and modulation of gut microbial ecology. *Nutrients*. 2019;22;11(2):215.

Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D, Coughlan MT, Drew BG, Lancaster GI, Thomas M, Forbes JM, Nawroth PP, Bierhaus A, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(9):2461-9.

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

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

Tang C, Liu Y, Kessler PS, Vaughan AM, Oram JF. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J Biol Chem*. 2009;284(47):32336-43.

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

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

Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J, Hughes TE. Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce

inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia*. 2004; 47:844-52.

Vergès B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol*. 2009;23(6):681-5.

Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 2015; 58:886-99.

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

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

Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5):E685-94.

Wong NKP, Nicholls SJ, Tan JTM, Bursill CA. The role of high-density lipoproteins in diabetes and its vascular complications. *Int. J. Mol. Sci*. 2018;19:1680.

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

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

Zong H, Ward M, Stitt AW. AGEs, RAGE, and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 2011;11(4):244-52.