RAPHAEL DE SOUZA PINTO

**Inibição do estresse oxidativo em macrófagos
previne a redução no conteúdo do receptor ABCA-1
induzida por albumina modificada por glicação
avançada**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

**São Paulo
2011**

RAPHAEL DE SOUZA PINTO

**Inibição do estresse oxidativo em macrófagos
previne a redução no conteúdo do receptor ABCA-1
induzida por albumina modificada por glicação
avançada**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pinto, Raphael de Souza

Inibição do estresse oxidativo em macrófagos previne a redução no conteúdo do receptor ABCA-1 induzida por albumina modificada por glicação avançada / Raphael de Souza Pinto.-- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Aterosclerose 2.Diabetes mellitus 3.Produutos finais de glicosilação 4.Colesterol 5.Estresse oxidativo 6.ABCA-1

USP/FM/DBD-180/11

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM 10) do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Este projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Bolsa de Doutorado Direto 09/53412-9 e 09/54688-8.

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais, Jose Antonio Pinto e Teresinha Lima de Souza Pinto, por todo o sacrifício que realizaram para me dar oportunidade de crescer na vida por meio dos estudos, sempre me ensinando a ter respeito, amor e ética em tudo que eu viesse a desenvolver. Esse é um dos frutos que posso retribuir.

Agradecimentos

Este trabalho não demonstra apenas o esforço de um jovem pesquisador, com anseios e desejos na descoberta pelo novo e desconhecido mundo científico. Este trabalho guarda em cada detalhe, a participação de pessoas que foram fundamentais para que ele fosse concretizado, e para estes eu devo o meu humilde e singelo agradecimento.

À **Dra. Marisa Passarelli**, que desde o início foi muito mais do que orientadora, foi amiga, confidente, anjo da guarda ou até mesmo a segunda mãe. Aprendo muito com esta pessoa magnífica, pelo exemplo de vida e superação. A sua arte de orientar e ensinar me inspira. Graças a esse aprendizado diário, entrei no laboratório um garoto imaturo e hoje, posso dizer, que por mais que ainda em muitas situações não tenha a convicção que ainda esteja totalmente pronto, me sinto realizado como um ser humano. Ela não só me ensinou a arte da pesquisa, mas também me ensinou os fundamentos básicos de um grande cidadão, ter ética, respeito e amor não só na pesquisa, mas também em todos os segmentos da minha vida. Por toda essa história, eu te agradeço muito “Má”, apelido carinhoso a você, Marisa, e não um adjetivo bastante comum de se ouvir, a respeito de orientadores.

À **Dra. Edna Nakandakare**, por muitas e muitas razões, agradeço esta excelente e competente endocrinologista, chefe do Laboratório de Lípidos, professora e pesquisadora, que me abriu as portas e lutou para que elas sempre pudessem permanecer abertas. Graças a ela, pude realizar grandes feitos em minha vida, desde a minha primeira ida a um congresso internacional, as batalhas traçadas para conquistarmos uma bolsa, sempre demonstrando empenho e carinho durante todos esses anos todos dentro e fora do laboratório. Muito obrigado.

Ao **Dr. Eder Quintão**, por quem me faltam até palavras para descrever a capacidade intelectual deste tão adorado e admirado professor, doutor e pesquisador. Exemplo para os mais jovens por seu entusiasmo contagiante na pesquisa. Por sua própria vivência em ser um grande “avô”, sempre receberá de seus netos, como eu, uma eterna gratidão por todo o reconhecimento, carinho. Obrigado por traçar uma batalha em toda a minha jornada durante esses anos.

À **Gabriela Castilho**, uma pessoa fascinante e empolgante que tive todos esses anos ao lado, não só nos experimentos, mas também como a minha irmã “mais nova”, dentro e fora do laboratório. A irmã que nunca tive, mas que espero manter para toda a eternidade. Gabi, muito obrigado por todas as nossas conversas, festas, brigas, partidas de tênis, tudo e principalmente este trabalho, que não teria o menor sentido sem a sua participação.

Ao **Dr. Sergio Catanozi**, que além de ser um excelente biólogo, com mestrado, doutorado e pós-doc, conseguiu recentemente o título de bacharel em medicina veterinária, nos ensinou a cada dia o quanto vale a pena todo o esforço, todo o sacrifício em busca do que amamos e sonhamos. Agradeço por todos os momentos em que pude te acompanhar, tanto nas cirurgias envolvendo os animais, quanto nos grandes shows que a vida nos proporcionou. Você é um cara épico e nunca sairá da minha vida.

À **Dra. Débora Rocco**, a mulher que colocou todos para correr, desde os camundongos até os mais sedentários. Uma mulher fascinante, a minha “irmã” loira, que foi e sempre será presença marcante na minha pouca estrada da vida. Trabalhar contigo foi muito gratificante, nunca vi uma pessoa tão inspirada para fazer um *western-blot*. Todas as manhãs foram muito importantes ao teu lado. Obrigado quando sorriu, chorou, brigou e xingou do meu lado. Aproveito o mesmo espaço para agradecer ao **Dr. Alexandre Galvão**, que em muitas e muitas vezes, com uma boa resenha, pode traduzir os sentimentos da pós-graduação e de todas as formas possibilitou a fuga para momentos relaxantes e de total descontração em meio a todo o estresse que o doutorado possa causar.

Ao grande amigo e parceiro deste trabalho **Dr. Bruno Paim**, o qual sempre foi e será um grande parceiro, não só nos experimentos, mas por toda a vida. A ida até Campinas sempre foi muito prazerosa, pois sabia que lá estaria alguém muito sábio na técnica e também um grande amigo para os momentos de intervalo nos experimentos.

Ao **Dr. Aníbal Vercesi**, por ter apoiado desde o início a realização desse trabalho, possibilitando o uso de seu laboratório, de todos os equipamentos, reagentes e de todo acesso e ajuda ao conhecimento do fascinante mundo das mitocôndrias.

À **Fabiana Góes**, a quem acompanhei no seu início dentro da pós-graduação, infelizmente o tempo foi curto durante a pesquisa, mas tenho a

certeza que será eterno durante as nossas vidas, com você aprendi muito a ver que as pessoas podem até ser diferentes, mas que elas contribuirão sempre e acrescentarão muito para o nosso crescimento.

Aos grandes parceiros de momentos felizes e tristes que estiveram presentes em todas as etapas de construção, discussão e aprendizado. Pessoas maravilhosas que estavam lado a lado, não só nos fluxos laminares da sala de cultura, mas também nos mesmos objetivos e sonhos que pudemos dividir e compartilhar. Entramos jovens, mas construímos muito, construímos *papers*, lares, famílias e filhos. Estiveram presentes e pude acompanhar a todos, bem como vocês puderam me dar todo o suporte necessário durante a minha vida. Muito obrigado a **Adriana Saldiba-Lima, Rodrigo Iborra, Ligia Okuda e Fabiana Ferreira.**

À **Rosibel Sileide da Silva**, pois sem as brincadeiras, as suas duras e principalmente sem o teu cafezinho e amor, não conseguiria ter energia suficiente para chegar muitas vezes tão cedo ao laboratório e sair algumas vezes tão tarde. Muito obrigado.

À **Claudia Souza**, que sempre foi muito prestativa e teve muita paciência comigo nos inúmeros processos burocráticos que também devem fazer parte do nosso crescimento na pós-graduação. Obrigado por sempre ter mostrado essa calma e sempre ter um sorriso no rosto para nos atender.

À **Senária Egutti**, por toda a amizade, carinho e respeito que teve desde a época da iniciação científica e agora durante toda a pós-graduação.

À **Maria Aparecida, a Cida**, pessoa carismática que a disciplina de Endocrinologia e Metabolismo não vive sem. Além de todos os cuidados que sempre tem com todos os alunos, agradeço muito por toda a amizade, carinho e respeito que teve por mim em todos os momentos dentro e fora da pós-graduação.

Aos grandes amigos e funcionários do laboratório de Lípidos, **Ana Maria Lottenberg, Simão Lottenberg, Isio Chultz, Mônica Q.T.S. Neves, Valéria Sutti Nunes, Jussara Rocha, Patrícia Cazita**, os quais sempre participaram, apoiaram e construíram juntos parte dos comentários e sugestões deste trabalho.

Aos colegas que estão iniciando a vida científica, ou aos que já iniciaram e participaram do início, meio ou do fim de todo esse tortuoso trabalho, **Diego Gomes, Paula Pinto, Maria Olivia Carvalho, Tatiana Venâncio, Fernanda**

Fusco, Paula Philipson, Roberta Marcondes Machado, Alessandra Carreiro, Juliana Tironi, Karina Souza, Renata Bombo, Klara Rahmann, Flavia Carmo, Isabel Cristina D. Ribeiro, Patrícia Rios, Ana Paula, Denise, Ana Charf.

Aos colegas de laboratórios vizinhos ou parceiros, **Rita de Cássia, Maria Heloísa Massola Shimizu, Maria Lúcia Gianella, Flavia Campos, Natália Inada, Mariana Fernandes, Ana Katarina Leite, Mariana Vitule, Humberto Dellê, Nivaldo Francisco da Silva.** Obrigado pelas conversas e participações nos corredores do complexo HC-FMUSP e ao **Laboratório de Bioenergética** da Unicamp, que possibilitou grande parte da realização desta pesquisa.

Aos novos amigos do **Centro Universitário – Cesmac**, principalmente aos colegas biomédicos, à direção da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS) e aos alunos que entenderam, me apoiaram e foram o combustível nessa reta final dessa conquista.

À **FAPESP**, financiadora desse projeto. Nossa novela terminou como e toda e qualquer drama, em um final feliz. À **FMUSP, Fundação Faculdade de Medicina e Disciplina de Endocrinologia e Metabolismo** que juntamente com a **FAPESP** fizeram parte de todo o suporte financeiro dos meus estudos.

Às pessoas que fizeram e fazem parte da construção da minha vida: Aos meus saudosos avôs **Pedro Souza e José Henriques Pinto**, os quais construíram e ensinaram seus netos os valores éticos e de sabedoria que devem constar em qualquer ser humano. Agradeço às minhas avós, **Elizabeth Souza e Dolores Pinto**, por todo o amor e confiança que depositaram a mim.

Aos meus **familiares** e padrinhos **Cesar Tomazinho e Marta Tomazinho** que sempre estiveram presentes e incentivando os meus passos rumo ao sucesso profissional e pessoal.

Em especial, aos meus respeitados e amados pais, **JOSE ANTONIO PINTO E TERESINHA LIMA DE SOUZA PINTO**, por todo o sacrifício que tiveram durante todos estes anos, que permitiram que eu pudesse ter todas as condições de batalhar e correr atrás dos meus sonhos e objetivos. Estarão presentes em todos os momentos da minha vida, eternizados pelo meu amor, mas sobretudo, pelo exemplo que sempre estará fixo em minha memória. Ao meu irmão **Rhenan de Souza Pinto**, que sempre me admirou e a quem eu sempre fui um grande admirador também. Sem eles a minha vida não teria o menor sentido.

Por fim, a minha noiva e futura esposa **ANGELA OLIVEIRA DE GODOY ILHA**, que sempre soube e acompanhou desde o início essa minha longa jornada no laboratório. Mesmo estando ao lado não entendia muito bem o porquê de todo o meu sacrifício. Porém no fim, ao vivenciar semelhante experiência, me deu e me dá todo o apoio necessário para que eu sempre possa seguir em frente sem ter o medo de errar, como errei em muitos experimentos. Faz-me olhar para o horizonte e correr atrás de todos os “SIMs” que nessa vida eu estou para conquistar. Agradeço também aos seus pais **Regina Maria de Oliveira Ilha e Luciano Pinto Ilha**, por acreditarem em mim e permitir que a filha deles pudesse seguir junto comigo na minha batalha, em busca das nossas conquistas e nossos sonhos.

A todas essas pessoas, que são mais que especiais, dedico essa tese como uma singela forma de agradecimento e de carinho que tiveram por mim em todos os momentos da minha vida.

**“Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter
paciência do que qualquer outro talento.”**

**“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos
é um oceano.”**

Isaac Newton

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Diabetes Mellito e Produtos de glicação avançada	17
1.2. Produtos de glicação avançada e Aterosclerose	24
2. OBJETIVOS	30
3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	31
3.1. Glicação de albumina.....	31
3.2. Determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML) na albumina e mobilidade eletroforética	31
3.3. Cultura de macrófagos da linhagem J774.....	32
3.4. Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	32
3.5. Análise de apoptose por citometria de fluxo.....	33
3.6. Determinação da expressão do receptor ABCA-1 por citometria de fluxo	33
3.7. Avaliação da respiração mitocondrial.....	34
3.8. Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas em macrófagos	34
3.9. Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS.....	53
APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

ABCG-4: *ATP binding cassette transporter G-4*

ACAT: acil colesterol aciltransferase

AGE: produtos de glicação avançada

ALE: produtos de lipoxidação avançada

Apo: apolipoproteína

AMG: aminoguanidina

BF: benfotiamina

CCCP: carbonilcianeto 3-clorofenilhidrazona

CE: colesterol esterificado

CEL: carboxietil-lisina

CETP: proteína de transferência de CE

CL: colesterol livre

CML: carboximetil-lisina

CT: colesterol total

3-DG: 3-deoxiglicosona

DHE: dihidroetídio

DM 1: diabetes melito tipo 1

DM 2: diabetes melito tipo 2

DPI: cloreto de difenileno-iodônio

FABA: albumina isenta de ácidos graxos

FCPP: carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona

GAD: glicolaldeído

GO: glioxal

HDL: lipoproteínas de alta densidade

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

ICAM-1: molécula 1 de adesão intercelular

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDH: lactato desidrogenase

LDL: lipoproteínas de densidade baixa

LOX-1: receptor para LDL oxidada

MET: metformina

MGO: metilglioxal

mRNA: RNA mensageiro

NADPH oxidase: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

NF- κ B: fator nuclear kappa B

O₂⁻: ânion superóxido

OH⁻: radical hidroxila

PBS: solução tampão fosfato

PIO: pioglitazona

RAGE: receptor para produtos de glicação avançada

ROS: espécies reativas de oxigênio

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

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

TG: triglicérides

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

TRC: transporte reverso de colesterol

VLDL: lipoproteínas de densidade muito baixa

VCAM-1: molécula 1 de adesão a células vasculares

RESUMO

Pinto RS. **Inibição do estresse oxidativo em macrófagos previne a redução no conteúdo do receptor ABCA-1 induzida por albumina modificada por glicação avançada** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011, 64p.

Produtos de glicação avançada (AGE) prejudicam o transporte reverso de colesterol, por diminuírem o efluxo de colesterol de macrófagos, mediado por HDL. Neste estudo, avaliamos o papel da albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE) sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria e pelo sistema NADPH oxidase, e sua implicação sobre o conteúdo do receptor de HDL (ABCA-1) em macrófagos. Albumina-AGE foi preparada pela incubação com glioxal (GO), metilglioxal (MGO) ou glicolaldeído (GAD) e albumina controle (albumina C), com tampão fosfato apenas. Albumina C e AGE foram incubadas com macrófagos, ao longo do tempo, para determinação da produção de ROS e do conteúdo de ABCA-1, por citometria de fluxo. Macrófagos tratados com albumina-GO, MGO e GAD apresentaram aumento na produção de ROS de, respectivamente, 24%, 25% e 24%, em comparação às células tratadas com albumina C. A elevação na produção de ROS foi prevenida pelo tratamento celular com inibidor de NADPH oxidase ou desacoplador mitocondrial, evidenciando o papel da NADPH oxidase e da mitocôndria na geração de ROS induzida pela albumina-AGE. Em comparação com as células tratadas com albumina-C, a respiração mitocondrial basal, determinada por oxigrafia, foi reduzida em 35% e 46% nas células expostas, respectivamente, à albumina-GO e albumina-GAD e não foi restabelecida após tratamento celular com desacoplador mitocondrial. O conteúdo total de proteínas carboniladas aumentou 41% em macrófagos tratados com albumina-GAD, em comparação à albumina-C. A redução no conteúdo de ABCA-1, observada após 8 horas de tratamento com albumina-GAD, foi paralela ao incremento na produção de ROS, sendo prevenida pelo tratamento com aminoguanidina, a qual também diminuiu a geração de ROS em macrófagos tratados com albumina-AGE. Por outro lado, a benfotiamina não conseguiu restaurar o conteúdo de ABCA-1, o que foi associado

à menor redução na geração de ROS, promovida por este fármaco. Os resultados apontam para papel da albumina-AGE na diminuição do efluxo de colesterol celular, notadamente por reduzir a expressão de ABCA-1, vinculada ao aumento do estresse oxidativo em macrófagos. A inibição do estresse oxidativo, induzido pela albumina-AGE, previne distúrbios no transporte reverso de colesterol por impedir a redução de ABCA-1, contribuindo assim para prevenir a aterosclerose no diabetes melito.

Descritores: aterosclerose, diabetes mellitus, produtos finais de glicosilação, colesterol, estresse oxidativo, ABCA-1

SUMMARY

Pinto RS. **Inhibition of macrophage oxidative stress prevents the reduction of ABCA-1 transporter induced by advanced glycated albumin** [thesis]. São Paulo: Faculty of Medical Science, University of São Paulo; 2011, 64p.

Advanced glycation end products (AGE) impair reverse cholesterol transport, by decreasing the HDL-mediated cholesterol efflux from macrophages. We evaluated the role of advanced glycated albumin (AGE-albumin) on the generation of reactive oxygen species (ROS) by mitochondria and NADPH oxidase, and its implication on the HDL receptor (ABCA-1) level in macrophages. AGE-albumin was prepared by incubation with glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO) or glycolaldehyde (GAD) and control albumin (C-albumin) with phosphate buffered saline alone. C and AGE-albumin were incubated along time with J774 macrophages in order to determine ROS production and ABCA-1 protein level by flow cytometry. Macrophages treated with GO, MGO and GAD-albumin presented, respectively, 24%, 25% and 24% increased ROS production compared to cells treated with C-albumin. The increase in ROS production was prevented by cell treatment with a NADPH oxidase inhibitor or mitochondrial uncoupler, demonstrating a role of NADPH oxidase and mitochondria in AGE-albumin-induced ROS generation. Compared to cells treated with C-albumin, basal mitochondrial respiration, determined by oxygraphy, was 35% and 46% reduced in cells exposed, respectively, to GO and GAD-albumin and was not restored after cell treatment with mitochondrial uncoupling. Intracellular carbonyl content increased 41% in macrophages treated with GAD-albumin as compared to C-albumin. In macrophages treated with GAD-albumin, the reduction in ABCA-1 content observed after 8 hours of treatment was accompanied by the increase of ROS production. Aminoguanidine that prevented ROS generation was able to restore ABCA-1 levels. On the other hand, benfotiamine failed to restore ABCA-1 protein levels which was ascribed to a lesser reduction in ROS generation by this compound. These results point to a role of AGE-albumin on the reduction of cellular cholesterol efflux, notably by diminishing ABCA-1 protein level in macrophages which is associated with intracellular oxidative stress. Inhibition of oxidative stress

induced by AGE-albumin prevents disturbances in reverse cholesterol transport by curbing the reduction of ABCA-1 elicited by advanced glycation in macrophages and therefore may contribute to the prevention of atherosclerosis in diabetes mellitus.

Descriptors: atherosclerosis, diabetes mellitus, advanced glycation end products, cholesterol, oxidative stress, ABCA-1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes Melito e Produtos de glicação avançada

A hiperglicemia é o principal fator na etiopatogenia das complicações ao longo prazo do diabetes melito, as quais se associam ao aumento do estresse oxidativo plasmático e tecidual. O estresse oxidativo celular é apontado como o elo comum na gênese das complicações do diabetes melito.

Na hiperglicemia, o aumento da metabolização da glicose pela via glicolítica favorece a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-). Este aumenta o estresse oxidativo, inibindo enzimas importantes da via glicolítica. Com isso há um desvio de substratos, o que leva à formação do aldeído bifuncional metilglioxal (MGO), o qual modifica proteínas e lípidos intracelulares formando os produtos de glicação avançada (AGE).

Os AGE, por sua vez, aumentam o estresse oxidativo, criando um ciclo vicioso. Além disso, na hiperglicemia há aumento da metabolização da glicose pela via do sorbitol, das hexosaminas e ativação da proteína quinase C, as quais levam ao desbalanço redox intracelular e propagação do insulto oxidativo e, consequentemente, geração dos AGE (Nishikawa *et. al.*, 2000; Brownlee, 2001).

A reação de glicação foi originalmente descrita em 1912, pelo químico francês Louis Camille Maillard, como reação de Maillard ou de escurecimento. Ela ocorre por meio da interação covalente não-enzimática entre açúcares redutores e grupos amina dos resíduos de lisina e arginina e das porções terminais das proteínas, fosfolípidos e ácidos nucleicos (Glomb & Monnier, 1995). O primeiro composto formado é uma base de Schiff, a qual pode ser dissociada ou sofrer rearranjos que levam à formação do produto Amadori ou frutossil-lisina.

A autooxidação da glicose, a decomposição da base de Schiff e os rearranjos do produto Amadori levam à formação de aldeídos bifuncionais, como glioxal (GO), MGO, glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona (3-DG). Estes compostos são intermediários altamente reativos, gerados por vias oxidativas e não oxidativas, que propagam a reação de glicação em sentido irreversível (**Figura 1**).

Metilglioxal é formado por reação não enzimática, a partir da dihidroxiacetona fosfato, a qual é formada pela oxidação da glicose na via glicolítica ou pela via do poliol. O MGO pode originar-se de aminoácidos, como serina, treonina e corpos cetônicos por reações enzimáticas (Thornalley, 1990; Nishikawa *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2003; Ahmed, 2005). Glioxal e GAD podem ser formados pela oxidação de ácidos graxos poli-insaturados ou ascorbato e por meio de reações inflamatórias (Wells-Knecht *et al.*, 1996; Rahbar & Figarola, 2003).

Figura 1. Reação de Glicação (Reação de Maillard ou de escurecimento): A reação de glicação caracteriza-se pela ligação covalente não-enzimática entre glicose ou outros açúcares redutores com proteínas, fosfolípides e ácidos nucleicos (porção amino). Formam-se Base de Schiff e Produto Amadori, os quais, juntamente com a autooxidação da glicose, podem gerar aldeídos bifuncionais [glioxal (GO), metilglioxal (MGO), 3-deoxiglicosona (3-DG) e glicolaldeído (GAD)]. Estes propagam rapidamente a reação em sentido irreversível formando os produtos de glicação avançada (AGE).

Foi inicialmente proposto que a formação dos AGE ocorria em proteínas de meia-vida longa, como colágeno e cristalino, devido à lentidão da reação. No entanto, graças à alta reatividade dos aldeídos bifuncionais, os AGE são encontrados também em proteínas de meia-vida curta. Interessante notar que os oxoaldeídos podem ser gerados no período pós-prandial em pacientes portadores de DM 1 (Beisswenger *et al.*, 2001), contribuindo para a rápida modificação de proteínas circulantes, como por exemplo a albumina e as apolipoproteínas.

Os aldeídos bifuncionais originam diversos tipos de AGE, bastante diferentes em sua estrutura e propriedades físico-químicas. Na maioria das vezes, os AGE são formados por reações que envolvem oxidação, sendo denominadas de produtos de glicoxidação. Os principais AGE são a carboximetil-lisina (CML) e a carboxietil-lisina (CEL), formados pela interação de resíduos de lisina com GO e MGO, respectivamente (Degenhardt *et al.*, 1998). Outros AGE incluem a pentosidina, a pirralina, e os dímeros de lisina-metilglioxal e lisina-glioxal (Valencia *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2008) (**Figura 2**).

Figura 2. Estrutura dos principais AGE.

A formação aumentada de AGE ocorre no sangue e tecidos de portadores de DM e, também, em vários estados patológicos, como aterosclerose, doença de

Alzheimer, artrite reumatoide, insuficiência renal crônica e cirrose hepática (Myata *et al.*, 1998; Maczurek *et al.* 2008; Calcutt *et al.*, 2009; Hyogo & Yamagushi, 2008). Portanto, a geração destes compostos parece ocorrer independentemente da presença de hiperglicemia (Odani *et al.*, 1999; Lapolla *et al.*, 2003). Na doença renal crônica, por exemplo, prevalecem falhas de destoxificação, devido à falência da função renal. O processo dialítico é incapaz de remover precursores de AGE, os quais permanecem na circulação em formas biorreativas (Mera *et al.*, 2005). Além disso, a incubação celular com ureia aumenta a produção de ROS (Zhang *et al.*, 2004; D'Apolito *et al.*, 2010). Em modelo animal de doença renal crônica foi observado que o aumento de ROS causa resistência à insulina e intolerância à glicose por modificação de moléculas da via de sinalização da insulina (D'Apolito *et al.*, 2010).

Produtos de glicação avançada podem, também, ser de origem exógena. Destacam-se como fontes importantes: a dieta e o tabaco. Alimentos ricos em gorduras são as mais importantes fontes de AGE, seguidos pelos ricos em carboidratos e proteínas. A forma de preparo e o tempo de cozimento dos alimentos também são determinantes para o conteúdo de AGE dos mesmos (Goldberg *et al.*, 2004).

Os AGE de origem exógena, produzidos durante a cocção de alimentos são absorvidos e transportados na circulação pelas lipoproteínas e pela albumina. Lipoproteínas de densidade baixa (LDL) modificadas por AGE, isoladas de portadores de DM que ingeriram dieta rica em AGE, aumentam vias de sinalização intracelular associadas à produção de marcadores inflamatórios (Cai *et al.*, 2004). Camundongos resistentes à leptina (db/db) alimentados com dieta rica em AGE apresentam piora na sensibilidade à insulina (Sandu *et al.*, 2005). Além disso, em pacientes com DM tipo 2 alimentados com dieta rica em AGE, observa-se redução de adiponectina e leptina, aumento da molécula 1 de adesão a células vasculares (VCAM-1) e estresse oxidativo, associado com o aumento de AGE plasmático. Estes eventos não foram encontrados em indivíduos diabéticos que se alimentaram com dieta com baixa concentração de AGE (Stirban *et al.*, 2008).

A interação dos AGE com diversos tipos celulares ocorre por meio de sua ligação com receptores de superfície, como o receptor para produtos de glicação

avançada (RAGE), receptor 1, 2 e 3 para AGE (AGE-R1, 2 e 3), receptores da família *scavenger* (SR-A, SR-BI e CD-36), FEEL-1, FEEL-2 (*fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1 e 2*), LOX-1 (receptor para LDL oxidada), galectina e receptores similares ao Toll (*toll like receptors*) (Horiuchi *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2007; Tamura *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004). Proteínas modificadas por CML, o AGE mais prevalente *in vivo*, interagem com o RAGE, ativando vias de transdução de sinal, que alteram o estado redox intracelular, com aumento da produção de ROS e ativação do fator nuclear NF- κ B. Consequentemente eleva-se a expressão de moléculas de adesão, mediadores inflamatórios (Schmidt *et al.*, 1995; Wautier *et al.*, 1996) e do próprio RAGE (Mukherjee *et al.*, 2005).

Em fagócitos mononucleares isolados de pacientes portadores de DM, observa-se maior geração de ânion superóxido (O_2^-), em relação ao grupo controle não diabético. Tal evento foi decorrente do grau de descompensação glicêmica e associado, em sua maior parte, com a ativação do RAGE, uma vez que o bloqueio do receptor suprimiu o aumento de ROS (Ding *et al.*, 2007).

Espécies reativas de oxigênio, como o O_2^- , convertido a radical hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Nishikawa *et al.*, 2000), elevam a atividade da poli-ADP-ribose polimerase (PARP). A atividade desta enzima reparadora do DNA tem, como uma das consequências, a inibição da atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), o que reduz o fluxo ao longo da via glicolítica, com aumento da geração do açúcar metilglioxal (MGO). Assim, podem ser formados os AGE, os quais exarcebam o insulto oxidativo.

A internalização do complexo AGE/RAGE é necessária para que ocorra a via de transdução de sinal, como por exemplo, a fosforilação da ERK 1/2 (*Extracellular Signal- regulated Kinases*) e a ativação do NF- κ B (Sevillano *et al.*, 2009). Em modelo experimental de aterosclerose, animal *Knockout* para o receptor de LDL (LDLr $-/-$) e também para o receptor RAGE (RAGE $-/-$), alimentado com dieta aterogênica, observa-se redução do tamanho e complexidade das lesões ateroscleróticas. Isto foi associado com a diminuição da expressão da molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e VCAM-1, além da diminuição do estresse oxidativo na parede do vaso e da proliferação de macrófagos (Sun *et al.*, 2009). Este mesmo estudo demonstra a ligação de LDL

oxidada ao RAGE de macrófagos, com ativação das mesmas vias induzidas por AGE, inclusive o estresse oxidativo.

Mitocôndrias isoladas de células renais de ratos diabéticos apresentam maior geração de O_2^- , vinculada diretamente à hiperglicemia. Além disso, o excesso de geração de O_2^- foi decorrente da modificação pós-traducional de proteínas mitocondriais por glicação avançada, notadamente aquelas envolvidas na beta-oxidação e fosforilação oxidativa (Rosca *et al.*, 2005).

Basta *et al.* (2005) demonstraram diminuição na geração de ROS, induzida por AGE, graças ao tratamento celular com inibidores da NADPH oxidase. Em consequência, houve redução na expressão de moléculas de adesão (Basta *et al.*, 2005; Higai *et al.*, 2006).

As possíveis vias de transdução de sinal ativadas pela interação dos AGE com os demais receptores descritos acima, à exceção do AGE-R1, não foram ainda descritas, sendo possível que os mesmos atuem apenas no clareamento destes compostos da circulação. No entanto, têm sido descritas vias de interação entre receptores de AGE e aqueles que medeiam a resposta inflamatória e imunológica inata (Lin *et al.*, 2006).

A expressão de AGE-R1 encontra-se diminuída em células mesangiais e macrófagos de animais diabéticos não obesos e em células linfomononucleares isoladas de portadores de DM tipo 1 (He *et al.*, 2001), correlacionando-se com a concentração sérica de AGE e com a progressão de nefropatia diabética. Este receptor contrapõe-se à via de sinalização do RAGE, suprimindo o estresse oxidativo celular, por restabelecer a expressão de antioxidantes e minimizar a resposta inflamatória.

Compostos inibidores de glicação, em sua maioria, ligam-se aos intermediários da reação de glicação (Rahbar *et al.*, 2000, Metz *et al.*, 2003), favorecem a destoxificação de compostos precursores ou inibem processos oxidativos. A metformina, além do seu efeito hipoglicemiante, exerce um efeito direto na redução da geração de AGE, por interagir com aldeídos bifuncionais e favorecer vias de destoxificação (Ruggiero-Lopez *et al.*, 1999).

À semelhança da metformina, a pioglitazona é um clássico fármaco utilizado no controle da glicemia. Seu grupo hidrazina reage, diretamente, com aldeídos bifuncionais prevenindo a formação dos AGE (Rahbar *et al.*, 2000).

A aminoguanidina é um composto nucleofílico que sequestra intermediários carbonila reativos, como o MGO, GO e 3-DG (Thornalley *et al.*, 2000), impedindo a formação de CML e CEL e reações de oxidação. Embora não apresente efeitos sobre a glicemia, diversos estudos demonstraram que a aminoguanidina retarda o desenvolvimento de complicações do diabetes, como a nefropatia, neuropatia e vasculopatia. Seu uso *in vivo*, entretanto, é limitado, devido à elevada toxicidade (Freedman *et al.*, 1999).

A piridoxamina é um potente inibidor *in vivo* e *in vitro* da formação dos produtos de glicação avançada e de lipoxidação (ALE), por interagir com o produto Amadori (Adrover *et al.*, 2005). Sua administração a ratos obesos não diabéticos, além de inibir a formação de AGE e ALE, diminui a concentração plasmática de triglicérides, colesterol e creatinina, impedindo assim o desenvolvimento de doenças vasculares e renais (Alderson *et al.*, 2003).

A benfotiamina é usada no tratamento da neuropatia e retinopatia diabética. Ela é um ativador da transcetolase, que direciona os substratos da glicose para a via das pentoses, bloqueando, assim, diversas vias induzidas pela hiperglicemia, como a formação de aldeídos bifuncionais e AGE (Stirban *et al.*, 2006).

O probucol é um potente antioxidante, capaz de reduzir a oxidação e internalização de LDL na íntima arterial, embora apresente inconvenientes sobre o perfil lipídico (Moghadasian *et al.* 1999; Bird *et al.* 1998).

O composto ALT-711 é capaz de diminuir a concentração tecidual de AGE (Candido *et al.*, 2003). O produto alagebrium é o primeiro fármaco de agentes terapêuticos, dentro do grupo ALT-711, que reduz a estabilidade da ligação entre AGE e proteínas.

1.2. Produtos de glicação avançada e Aterosclerose

A aterosclerose é a maior causa de morbidade e mortalidade no DM tipo 1 e 2 (Lamharzi *et al.*, 2004; Meerwaldt *et al.*, 2008; Bo *et al.*, 2006). Alterações no metabolismo de lípidos, juntamente com os demais componentes da síndrome metabólica e estado inflamatório crônico, contribuem para a elevada prevalência de doença aterosclerótica macrovascular no DM 2. Neste contexto, invariavelmente, observa-se aumento na concentração plasmática de triglicérides, de LDL pequenas e densas e redução do colesterol na fração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Vaverkova *et al.*, 2009).

As HDL são inversamente relacionadas com o desenvolvimento de doença arterial coronariana. Isto decorre de suas importantes ações antiaterogênicas, entre elas: 1) transporte reverso de colesterol (TRC), 2) inibição de oxidação das LDL, 3) atividade anti-inflamatória, 4) antiagregante e 5) vasodilatadora.

O TRC caracteriza-se pela retirada do colesterol das células periféricas, incluindo-se as da íntima arterial, e seu transporte ao fígado (Sviridov & Nestel, 2002), para eliminação na bile e excreção fecal e aos órgãos esteroideogênicos. Este processo inicia-se pela remoção de colesterol livre das células por diferentes subfrações de HDL ou apolipoproteínas A-I (apo A-I) dissociadas. Uma vez na partícula de HDL, o colesterol é esterificado pela enzima lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), passando a integrar o núcleo da lipoproteína. Isto impede a recaptação celular do colesterol livre ou seu transporte inespecífico por proteínas plasmáticas, como por exemplo, a albumina.

O transporte de colesterol ao fígado pode ocorrer diretamente pelas HDL, por meio de seu reconhecimento pelo receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-BI). Este receptor remove apenas o colesterol esterificado da HDL, liberando proteínas livres ou partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) que reiniciam a retirada de colesterol celular. O colesterol também pode ser removido indiretamente, por meio da captação de lipoproteínas que contêm apo B, (como as VLDL, LDL e quilomícrons) pelos receptores de LDL (B/E), E e LRP (LDL receptor-related protein) do fígado. Isto ocorre graças à atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP), a qual transfere colesterol

esterificado das HDL para as VLDL, LDL e quilomícrons (Marmillot *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Transporte reverso de colesterol: O transporte reverso de colesterol caracteriza-se pela remoção do excesso do colesterol livre (CL) dos macrófagos arteriais e seu transporte ao fígado. Apo A1 interage com o receptor ABCA-1 favorecendo a saída de CL e a geração de pré-HDL. O CL é esterificado pela lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), o que favorece a formação de HDL maiores, como HDL₂. Estas removem CL celular pela interação com o ABCG-1. O colesterol esterificado (CE) das HDL pode ser diretamente removido pelos receptores SR-BI hepático ou transferido, pela ação da proteína de transferência de CE (CETP), para as LDL e VLDL. Estas são removidas pelos receptores hepáticos de LDL (B/E). No fígado o CL pode ser eliminado diretamente na bile ou convertido a ácidos biliares, sendo excretado nas fezes.

A remoção do colesterol celular ocorre por mecanismo passivo ou ativo. O primeiro é caracterizado pela difusão do colesterol livre a favor de gradiente de concentração por intermédio do receptor SR-BI. O receptor SR-BI é uma glicoproteína, com peso molecular de 82 kDa, pertencente à família CD-36. A estrutura deste receptor permite a formação de um canal hidrofóbico que promove a passagem do colesterol livre da membrana celular para aceptores externos, como as HDL.

O SR-BI é altamente expresso no fígado, gônadas e adrenal, onde capta colesterol esterificado das HDL (Krieger, 2001). Isto fornece substrato para a

síntese hormonal e biliar. Animais que superexpressam SR-BI apresentam maior excreção biliar de colesterol, estando mais protegidos da aterosclerose, a despeito da diminuição do HDL-colesterol no plasma (Trigatti *et al.*, 2003). Em macrófagos e outros tipos celulares a atividade do SR-BI está relacionada com o efluxo de colesterol e é favorecida pelo conteúdo de fosfolípidos das HDL. Não obstante, por pertencer à família de receptores *scavenger*, o receptor SR-BI participa da captação de lipoproteínas modificadas em macrófagos. Desta forma, embora sua expressão *in vivo* favoreça o fluxo centrípeto de colesterol ao fígado, seu papel sobre o fluxo de lípidos celulares em macrófagos ainda é controverso (Wang *et al.*, 2007).

O mecanismo ativo de remoção do colesterol ocorre por meio dos receptores ABCA-1, ABCG-1 e ABCG-4 (*ATP binding cassette transporter A-1, G-1 e G-4*). O receptor ABCA-1 é uma proteína de 2261 aminoácidos e com peso molecular de 210 kDa. A interação da apo A-I livre com o ABCA-1 favorece a hidrólise de duas moléculas de ATP ligadas à estrutura do receptor, fornecendo energia para a translocação do colesterol livre de organelas intracelulares para a membrana. A alça central do ABCA-1 promove a transferência de colesterol livre do folheto interno para o externo da membrana e, a seguir, para as apoA-I (Oram, 2002a). A saída de colesterol livre, por meio do ABCA-1, parece estar condicionada a um importante fluxo de fosfolípidos para o meio extracelular. (Oram & Vaughan, 2006).

Mutações no ABCA-1 em humanos são responsáveis pela doença de *Tangier* e pela Deficiência Familiar de HDL. Em ambos os casos, o efluxo de colesterol é severamente prejudicado, com redução ou, até mesmo, ausência de HDL no plasma e maior prevalência de aterosclerose prematura (Oram, 2002b).

O receptor ABCG-1 (674 aminoácidos e 60 kDa) é altamente expresso em macrófagos enriquecidos com colesterol, bem como em células do cérebro, timo, adrenais e baço de camundongos e do homem. Diferentemente do ABCA-1, o receptor ABCG-1 medeia o efluxo de colesterol para grandes partículas de HDL, como as HDL₂, não interagindo com apoA-I livres (Oram & Vaughan, 2006). A interação prévia de apoA-I com o ABCA-1 favorece a geração de partículas maduras de HDL, as quais posteriormente atuam como ligantes dos receptores ABCG-1 e ABCG-4 (Vaughan & Oram, 2006).

No DM são descritas alterações na expressão e atividade de enzimas e proteínas que direcionam o fluxo ao longo do TRC (Vergès, 2009; Tan, 2009). Como consequência, a entrada de lípidos em macrófagos arteriais é favorecida em detrimento de sua remoção pelas HDL.

O efluxo de colesterol pelas HDL₃, isoladas de portadores de DM mal compensado, é reduzido quando comparado àquele mediado por HDL₃ de indivíduos saudáveis (Passarelli *et al.*, 2000). Este evento, entretanto, não é decorrente da modificação destas lipoproteínas por glicação precoce (Rashduni *et al.*, 1999; Passarelli *et al.*, 2000), mas é afetado pela glicação avançada da apo A-I (Hoang *et al.* 2007) e da HDL (Matsuki *et al.*, 2009).

A glicoxidação intracelular diminui a quantidade do receptor ABCA-1, o que prejudica o efluxo de colesterol e aumenta o conteúdo celular de lípidos. Este evento ocorre sem que se observe mudança na taxa inicial de transcrição do ABCA-1 ou de seu mRNA (Passarelli *et al.*, 2005). Suínos tratados com estreptozotocina e alimentados com dieta aterogênica apresentam maior lesão aterosclerótica e menor conteúdo de ABCA-1 em macrófagos, quando comparado aos animais controles (Passarelli *et al.*, 2005). Este achado evidencia um paralelismo entre as observações de ensaios *in vitro* e o perfil glicêmico *in vivo* contribuindo para redução da quantidade do ABCA-1 em células espumosas.

Proteínas modificadas por glicação interferem com as funções do receptor SR-BI no TRC, suprimindo o efluxo de colesterol livre das células periféricas para as HDL (Lam *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2006). Isto ocorre devido à redução na expressão do receptor SR-BI, além do aumento do mRNA e quantidade total dos receptores SR-A e CD-36 em macrófagos THP-1, induzidos pelo tratamento com LDL glicada e glicoxidada.

A albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE) reduz o efluxo de colesterol celular, mediado por HDL (Machado *et al.*, 2006). Isto decorre da maior captação inespecífica de colesterol livre pelas albuminas modificadas, bem como do prejuízo na remoção deste lípide pelas HDL. A albumina-AGE apresenta, por si, maior capacidade de remover o colesterol celular, embora sua contribuição ao TRC não seja esperada. Neste aspecto, considera-se a diminuta ação da lecitina acilcolesterol transferase (LCAT) sobre a albumina, visto que a apo A-I é cofator desta enzima e fosfolípidos são utilizados como substrato

(Zannis *et al.*, 2006). A transferência de colesterol livre da albumina para a HDL foi demonstrada em um estudo (Zhao & Marcel, 1996), embora seja provável que a recaptação de colesterol livre pelas células seja preponderante e concomitante à captação de albumina modificada por receptores *scavenger* de macrófagos (Machado *et al.* 2006).

O prejuízo no efluxo de colesterol celular foi prevenido pelo tratamento da albumina com metformina e aminoguanidina, compostos que inibem a glicoxidação, e pelo antioxidante probucol (Machado *et al.*, 2006). Estudo realizado por nosso grupo demonstrou que a albumina isolada de pacientes portadores de diabetes tipo 1 e tipo 2, com controle glicêmico inadequado, prejudica o transporte reverso de colesterol, por reduzir a expressão de ABCA-1 e a remoção de colesterol de macrófagos. Além disso, a incubação de macrófagos com as albuminas destes pacientes aumentaram o acúmulo de lípidos intracelular, contribuindo assim para gênese da aterosclerose no diabetes melito (Lima, 2010).

Além de prejudicar o efluxo de colesterol, a albumina-AGE facilita a entrada de LDL em macrófagos e, conseqüentemente diminui e aumenta, respectivamente, a atividade da HMG-CoA redutase e da acilcolesterol aciltransferase (ACAT) (Castilho *et al.*, 2007). Recentemente foi demonstrado que albumina-AGE, ao se ligar ao receptor RAGE, induziu a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos (FABP-4), favorecendo o acúmulo de lípidos em macrófagos (Wang *et al.* 2011).

A albumina é a proteína mais abundante na circulação e é a principal macromolécula modificada por glicação em pacientes portadores de DM ou insuficiência renal crônica (Mera *et al.*, 2005). O aumento do estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia e da presença de albumina modificada por glicação avançada tem sido demonstrado em diferentes tipos celulares, em associação à gênese e à progressão da nefropatia, retinopatia e neuropatia diabética (Calcutt *et al.*, 2009; Fernyhough *et al.*, 2003, Basta *et al.*, 2005; Nishikawa *et al.*, 2000; Hammes *et al.*, 2003).

Maior geração de ROS frente à hiperglicemia *in vivo* e *in vitro* também tem sido descrita em monócitos e macrófagos, embora ainda não esteja esclarecido

se tal evento associa-se ao prejuízo no fluxo de lípidos celulares, induzido pela glicação avançada.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE) sobre a geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos e sua associação com a redução na expressão do receptor de ABCA-1. Desta forma, foram analisadas em macrófagos tratados com albumina-AGE:

- 1) a participação do sistema NADPH oxidase e mitocondrial na geração de espécies reativas de oxigênio;
- 2) a respiração mitocondrial;
- 3) a expressão do receptor de HDL, ABCA-1;
- 4) a interferência de compostos inibidores de glicação avançada e antioxidantes, como aminoguanidina, benfotiamina, metformina e pioglitazona sobre a geração de espécies reativas de oxigênio e o conteúdo de ABCA-1.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.1. Glicação de albumina

A modificação de albumina por glicação avançada foi realizada por meio da incubação de albumina bovina isenta em ácidos graxos (FAFA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) com aldeídos bifuncionais (40 mg de albumina/ mL de solução de aldeído bifuncional; 50 mM de metilglioxal (MGO; Sigma-Aldrich, Alemanha), 10 mM de glioxal (GO; Sigma-Aldrich, Alemanha) e 10 mM de glicolaldeído (GAD; Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha). Albumina controle (albumina-C) foi preparada na presença de solução fosfato (PBS - 154 mM de NaCl; 21 mM de Na_2HPO_4 ; 14 mM NaH_2PO_4 ; 9,5 mM de NaOH), apenas. As incubações foram realizadas sob condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37°C, com agitação por 4 dias. A seguir, as amostras foram dialisadas contra PBS contendo 0,2 mM de EDTA e esterilizadas em filtro 0,22 μm (Millipore, Billerica, EUA). Todas as amostras foram congeladas a -80 °C até o uso. Albuminas controle e modificadas foram diluídas para concentração final de 2 mg/mL em meio de cultura DMEM (*Low Glucose*, Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e incubadas, por diferentes intervalos de tempo, com as células.

3.2. Determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML) na albumina e mobilidade eletroforética

Quantidades iguais de albumina-C, GO ou GAD (100 μg) foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%. A formação do produto avançado de glicação – carboximetil-lisina (CML) – foi verificada por *imunoblot*, utilizando-se anticorpo anti-CML (1:1000; NBS Biologicals, UK), seguida por incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:10000; *Pierce-Thermo Fisher Scientific Inc.* IL, EUA) e reação com ECL (*Enhanced Chemiluminescence Reaction*; *Pierce-Thermo Fisher*, EUA). A mobilidade eletroforética das albuminas-GO, MGO e GAD (10 μg), em comparação à albumina-C foi determinada após corrida de eletroforese em gel de agarose 1% (100 V, 1 hora), seguindo-se coloração com Comasie Blue.

3.3. Cultura de macrófagos da linhagem J774

Macrófagos da linhagem J774 foram utilizados em parte dos nossos experimentos. As células foram gentilmente doadas 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 meio RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), contendo 10% de soro fetal bovino (FCS; Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina. Após a confluência, as células foram tratadas com albumina-C ou albumina-AGE (GO, MGO ou GAD) na presença ou ausência de compostos inibidores da reação de glicação avançada (20 mM de metformina; 10mM de aminoguanidina; 10 µM de pioglitazona e 150 ou 350 µM de benfotiamina).

3.4. Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Macrófagos J774 foram tratados, por diferentes intervalos de tempo, com albumina-C ou albumina-AGE (GO, MGO ou GAD) na presença ou ausência de compostos inibidores de glicação avançada, dissolvidos em DMEM/FAFA. Após remoção do meio e lavagem das células com PBS/FAFA, as mesmas foram removidas da garrafa de cultura e sedimentadas por centrifugação. O *pellet* celular foi ressuspensionado em RPMI/FCS, seguindo-se incubação com 1 µL do probe DHE (*dihidroetídio*, DHE, Molecular Probes, OR), por 45 minutos. Este composto penetra nas células reagindo com as espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente o ânion superóxido, de modo a emitir uma fluorescência cuja leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, Beckton e Dickson). Os resultados obtidos foram analisados no *software Cellquest* (BD).

A avaliação da participação do sistema NADPH oxidase na geração de ROS foi realizada após a incubação com 10 µM do probe DHE (*dihidroetídio*, DHE, Molecular Probes, OR) e com 10 µM do inibidor da NADPH oxidase, DPI (cloreto de difenileno-iodônio, Sigma) por 50 minutos. A seguir a leitura foi realizada de acordo com os métodos de detecção de ROS descritos anteriormente. O mesmo procedimento foi realizado a fim de avaliar a

contribuição da mitocôndria nesse processo, porém agora incubando-se com probe DHE (10 μ M) (*dihidroetídio*, DHE, Molecular Probes, OR) e 1 μ M do desacoplador das membranas mitocondriais, CCCP (carbonilcianeto 3-clorofenilhidrazona, Sigma) por 45 minutos. A seguir a leitura foi realizada conforme os métodos de detecção de ROS descritos anteriormente.

3.5. Análise de apoptose por citometria de fluxo

Para a análise de apoptose, macrófagos J774 foram tratados com albumina-C ou albumina-AGE (albumina-GO, MGO ou GAD) e a seguir, incubados por 20 min com 0,2 μ g/mL de anexina V marcada com o composto fluorescente FITC (*Invitrogen*, EUA). A anexina V se liga a fosfatidilserina presente no folheto externo da membrana plasmática de células em estado de apoptose. Após a incubação, os macrófagos foram analisados no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, Beckton e Dickson).

3.6. Determinação da expressão do receptor ABCA-1 por citometria de fluxo

Macrófagos J774 foram tratados com albumina-C ou albumina-GAD na presença ou ausência dos compostos inibidores de glicação avançada (5 ou 10 mM de aminoguanidina, 350 μ M de benfotiamina). A concentração celular de 1×10^6 foi fixada em solução de paraformaldeído 4% e incubado posteriormente com anticorpo anti-ABCA-1 (*Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO* – diluição 1:250) por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, incubada com 4 μ g/mL do anticorpo Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*, EUA). A intensidade de fluorescência foi determinada pelo citômetro de fluxo FACS Calibur e pelo *software* Cellquest (B. D., San Jose, CA). Em todos os experimentos, a fluorescência celular foi corrigida pela fluorescência basal obtida por meio das incubações na ausência do anticorpo Alexa Fluor 488.

3.7. Avaliação da respiração mitocondrial

Macrófagos J774 foram tratados, durante 24 h, com meio DMEM contendo 2 mg/mL de albumina-C ou albumina-AGE (albumina-GO, MGO ou GAD). Após cuidadosa remoção do meio e lavagem das células com PBS/FAFA, as mesmas foram removidas da garrafa de cultura e sedimentadas por centrifugação. O *pellet* celular foi ressuspensionado em RPMI/FCS. Foram utilizadas $5,0 \times 10^6$ células para leitura em oxígrafo OROBOROS (*Paar, Innsbruck, Austria*), seguindo a metodologia do fabricante (Huter *et al.*, 2006).

O aparelho, primeiramente, registra o fluxo de oxigênio e a concentração deste no meio contendo as células, determinando assim a respiração celular basal. Após a estabilização da curva, foi adicionado ao meio 2 µg/mL de oligomicina (Sigma, EUA). Esta substância inibe a ATPase, principal enzima envolvida na fosforilação oxidativa, para a conversão de ADP em ATP. Portanto, com sua inibição espera-se que o fluxo de oxigênio seja reduzido.

Após a inibição da atividade da ATPase é aplicado ao mesmo meio 1,0 µM de FCCP (carbonilcianeto 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona, Sigma, EUA), que é um desacoplador das membranas da mitocôndria. Isto favorece o aumento do fluxo de oxigênio nestas células, pelo livre trânsito do mesmo através das membranas mitocôndriais.

3.8. Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas em macrófagos

Após tratamento celular com albumina-C ou albumina-GAD, o lisado de células foi incubado com 10 mM de dinitrofenilhidrazina (DNTH, Sigma) e 2,5 M de HCl por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de ácido tricloroacético (TCA 20%). O *pellet* celular foi lavado duas vezes com solução etanol/etilacetato absoluto (1:1; v:v) e uma vez com 10% de TCA. O *pellet* celular foi finalmente dissolvido em hidróclorido de guanidina 6 M e a absorbância foi determinada a 370 nm. O conteúdo carbonila foi calculado usando o coeficiente de absorbância molar de hidrazonas ($22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressado como nanomole de carbonila por miligrama de proteína.

3.9. Análise estatística

As comparações estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prism 4 (*GraphPad Software, Inc. 2003*). As comparações entre grupos foram feitas pelo teste t de *Student*, ou quando apropriado por análise de variância de um fator (ANOVA) e pós-teste de *Newman Keuls*. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Em todos os casos, foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5 % ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

Albuminas modificadas por glioxal (GO), metilglioxal (MGO) e glicolaldeído (GAD) apresentaram mobilidade em gel de agarose aumentada em, respectivamente, 8%; 29% e 16% em comparação a com albumina controle (albumina C) (**Figura 4**). Nas albuminas tratadas com GO e GAD observou-se, por *imunoblot*, maior conteúdo de carboximetil-lisina (CML) em comparação à albumina C (**Figura 5**). Embora o tratamento de proteínas com MGO gere, principalmente, carboxietil-lisina (CEL), nosso *imunoblot* com anticorpo anti-CEL não evidenciou modificação da albumina por este AGE.

- 1) Albumina Controle
- 2) Albumina GO
- 3) Albumina MGO
- 4) Albumina-GAD

Figura 4. Mobilidade das albuminas modificadas por glicação. As albuminas glicadas foram submetidas, em concentrações iguais (10 µg), a eletroforese em gel de agarose 1% e coradas com Coomassie blue R.

Figura 5. Conteúdo de carboximetil-lisina (CML) em albumina tratada com glicolaldeído (GAD) ou glioxal (GO). Albumina foi tratada com GO 10 mM ou GAD 10 mM ou apenas com solução fosfato (PBS) como controle. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Após transferência, a membrana foi incubada com anticorpo anti-CML (1:5000), anticorpo conjugado a peroxidase (1:2000) e reagida com ECL.

Macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-AGE, apresentaram maior geração de ROS. Na **figura 6**, observa-se que este aumento, em relação à albumina-C, foi de 24%, 25% e 24%, respectivamente, para os tratamentos com albumina-GO, MGO e GAD.

Figura 6. Geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos J774, após tratamento com albumina-AGE. Macrófagos foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GO, MGO ou GAD, por 24 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 45 min com 10 μ M de DHE

(dihidroetídio, DHE, Molecular Probes, OR) sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Seis experimentos independentes (n = 4); figura representativa de um experimento, teste t de *Student*.

Os principais sistemas geradores de ROS em macrófagos são representados pela NADPH oxidase de membrana e pela mitocôndria. Neste sentido, avaliamos a contribuição dessas vias sobre a produção de ROS, induzida pela albumina-AGE. Macrófagos tratados com albumina-C ou albumina-AGE, por 24 h, foram incubados na presença de inibidor da NADPH oxidase, DPI (cloreto de difenileno-iodônio), seguindo-se a medida da produção de ROS por citometria de fluxo. Na vigência de inibição do sistema NADPH oxidase, observou-se redução na produção de ROS, induzida pelo tratamento com albumina-GO e albumina-GAD isoladamente. Estes achados apontam para participação da via da NADPH oxidase na geração de ROS em células submetidas à glicoxidação por albumina-GO e albumina-GAD. O tratamento celular com DPI não foi capaz de prevenir significativamente a produção de ROS induzida por albumina-MGO (Figura 7).

Figura 7. Produção de ROS em células J774, após tratamento com albumina-AGE e inibidor da NADPH oxidase. Macrófagos J774 foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GO, MGO ou GAD, por 24 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 45 min com 10 µM de DPI (inibidor da NADPH oxidase) na presença de 10 µM de DHE sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Quatro experimentos independentes (n = 6), teste t de *Student*.

O desacoplamento das membranas mitocondriais, promovido pela exposição de células tratadas com albumina-C ou albumina-AGE ao composto CCCP (carbonilcianeto 3-clorofenilhidrazona) foi capaz de prevenir o aumento na produção de ROS induzida por albumina-GO, MGO e GAD. Na **figura 8**, observa-se que não houve diferença na geração de ROS entre células tratadas com albumina-C ou albumina-AGE quando a produção de espécies reativas pela mitocôndria estava inibida. É possível, então, que o aumento de ROS, em células glicoxidadas, seja decorrente da interação entre os sistemas mitocondriais e NADPH oxidase.

Figura 8. Produção de ROS em macrófagos J774, após tratamento com albumina-AGE e desacoplamento mitocondrial. Macrófagos foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GO, MGO ou GAD, por 24 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 45 min com 1 μ M do CCCP (desacoplador mitocondrial) na presença de 10 μ M do probe DHE sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Quatro experimentos independentes (n= 8).

O fluxo mitocondrial basal de oxigênio foi menor em células tratadas com albumina-GO e albumina-GAD em relação à albumina-C (**Figura 9**). Conforme esperado, o tratamento celular com oligomicina (inibidor da ATPase) favoreceu a diminuição do fluxo de oxigênio em células tratadas com albumina-C, sendo o mesmo observado para aquelas expostas à albumina-GO e albumina-MGO. No

entanto, nenhuma queda adicional foi observada nas células tratadas com albumina-GAD, a qual já apresentava respiração mitocondrial bastante reduzida. Mediante incubação com FCCP (desacoplador de membrana mitocondrial), observou-se nas células tratadas albumina-C uma recuperação do fluxo de oxigênio, semelhante àquele obtido na situação basal. Isto, entretanto, não foi evidenciado nas células tratadas com albumina-GO e albumina-GAD, as quais ainda mantiveram menor fluxo de oxigênio em comparação às células tratadas com albumina-C. Nas células expostas à albumina-MGO, o tratamento com FCCP, por sua vez, aumentou o fluxo de oxigênio, em comparação aos demais tratamentos (albumina-C, albumina-GO e albumina-GAD). Estes achados evidenciam que a albumina-GO e a albumina-GAD diminuem a função mitocondrial e podem comprometer o estado energético celular.

Figura 9. Respiração mitocondrial em macrófagos J774, após tratamento com albumina-AGE. Macrófagos J774 foram tratados por 24 h com albumina C e albumina-AGE (GO, MGO e GAD). O fluxo de oxigênio foi determinado em oxígrafo OROBOROS (Huter *et al.*, 2006), utilizando oligomycin e FCCP. Quatro experimentos independentes (n = 4). * p < 0,03 comparado com albumina-C na respectiva condição experimental; # p < 0,05 comparado com a condição basal, análise de variância de um fator one-way ANOVA e pós- teste de *Newman Keuls*.

A modificação de albumina com GAD favorece grande formação de carboximetil-lisina e confere maior prejuízo ao efluxo de colesterol celular, em comparação à albumina GO ou albumina MGO (Machado *et al.*, 2006). Sendo

assim, experimentos acerca da geração de ROS e implicação sobre a expressão dos receptores de HDL, na presença ou ausência de inibidores de AGE, foram realizados apenas com albumina-GAD.

Importante incremento na produção de ROS foi obtido após 4 h de incubação com albumina-GAD (**figura 10**), mantendo-se ao longo do tempo. Isto foi acompanhado por aumento em 41% do conteúdo de proteínas celulares carboniladas em células tratadas com albumina-GAD em relação à albumina-C (**figura 11**).

Figura 10. Curva de tempo da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos J774, após tratamento com albumina-GAD. Macrófagos foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GO, MGO ou GAD, durante 2, 4, 8 e 18 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 45 min com 10 μ M de DHE (*dihidroetídio*, *Molecular Probes*) sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Quatro experimentos independentes (n = 6). *p<0,05 comparado a 2 h de incubação com albumina-GAD, análise de variância de um fator one-way ANOVA e pós- teste de *Newman Keuls*.

Figura 11. Conteúdo total de proteínas carboniladas em macrófagos tratados com albumina-C ou albumina-GAD. Após tratamento com albumina-C ou AGE, o lisado de células foi incubado com 10 mM de dinitrofenilhidrazina (DNTB, Sigma) em meio de 2,5 M de HCl por 1 h a temperatura ambiente. A reação foi bloqueada pela adição de 20 % de ácido tricloroacético (TCA). O *pellet* celular foi finalmente dissolvido em 6 M de hidróclorido de guanidina e a absorbância foi determinada a 370 nm. Quatro experimentos independentes ($n = 4$), teste t de *Student*.

O aumento de ROS foi paralelo à redução na expressão de ABCA-1, observada, por citometria de fluxo, após 8 h (26%) e 18 h (23%) de tratamento com albumina-GAD em comparação à albumina-C (**figura 12**).

Figura 12: Expressão de ABCA-1 em macrófagos, após tratamento com albuminas-GAD, ao longo do tempo. Macrófagos foram incubados com 8Br-AMPC (0,5 mM) por 24 h. Após lavagem, foram tratados, durante 2, 4, 8 ou 18 h, com albumina C ou GAD. Quantidades iguais de células (1×10^6) foram incubadas com anticorpo anti ABCA-1 (1:250) e anticorpo conjugado a um fluoróforo Alexa 488 e realizada a detecção por citometria de fluxo. (* $p < 0.05$ comparado com tempo 0 de incubação, $n=6$).

Em comparação a macrófagos tratados com albumina-GAD apenas, redução de 44% na produção de ROS foi observada naqueles simultaneamente expostos à aminoguanidina (AMG; 10 mM) (**figura 13**). Por outro lado, metformina (MET; 20 mM) elevou a produção de ROS na presença de albumina-GAD e a pioglitazona (PIO; 10 μ M) não apresentou efeito sobre a geração de ROS (**figura 13**).

Figura 13. Geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos J774, após tratamento com albumina-GAD e compostos inibidores de glicação. Macrófagos foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GAD, na presença de 10 μ M, 20 mM ou 10 mM, respectivamente de pioglitazona (PIO), metformina (MET) e aminoguanidina (AMG), por 8 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 45 min com 10 μ M de DHE (*dihidroetídio*, *Molecular Probes*) sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Seis experimentos independentes ($n = 4$), análise de variância de um fator one-way ANOVA e pós-teste de *Newman Keuls*.

Em células tratadas com albumina-GAD, a AMG - que foi o composto eficaz em prevenir a geração de ROS - restaurou a expressão de ABCA-1 na concentração de 10 mM apenas (**figura 14**). Estes achados corroboram o papel do estresse oxidativo, induzido pela albumina-GAD, sobre a redução da expressão de receptores de HDL em macrófagos.

Figura 14. Aminoguanidina recupera a expressão do receptor ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-GAD. A expressão do receptor ABCA-1 foi determinada por citometria de fluxo após macrófagos terem sido tratados com albumina controle ou albumina-AGE na presença de 5 ou 10 mM de aminoguanidina (AMG). Quatro experimentos independentes (n = 6), teste t de Student.

Na presença de benfotiamina (BF), nas concentrações de 150 μ M e 350 μ M, não houve redução na produção de ROS em macrófagos tratados com albumina-GAD, em comparação às células expostas à albumina-C nas mesmas concentrações deste composto (**figura 15**).

Figura 15. Geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos J774, após tratamento com albumina-GAD na presença de benfotiamina. Macrófagos foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GAD, na presença de 150 ou 350 µM de benfotiamina (BF), por 8 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 45 min com 10 µM de DHE (*dihidroetídio*, *Molecular Probes*) sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Quatro experimentos independentes (n = 8), teste t de *Student*.

A benfotiamina também não foi capaz de recuperar a expressão do receptor ABCA-1 (**figura 16**) em macrófagos tratados com albumina-GAD.

Figura 16. Benfotiamina não recupera a expressão do receptor ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-GAD. O conteúdo do receptor ABCA-1 foi determinado por citometria de fluxo após tratamento dos macrófagos com

albumina controle ou albumina-AGE na presença de 350 μ M de benfotiamina (BF). Quatro experimentos independentes (n= 6), teste t de *Student*.

Em todos os experimentos, a morte celular por apoptose - quantificada por citometria de fluxo, como número de células positivas para anexina V-FITC - não variou entre os tratamentos com albumina-C ou albumina-AGE (**Figura 17**). A produção de lactato desidrogenase também não diferiu entre os tratamentos celulares (dados não apresentados).

Figura 17. Apoptose em macrófagos J774 tratados com albumina-AGE. Macrófagos foram tratados com DMEM contendo 2 mg/mL de albumina C, GO, MGO ou GAD, por 24 h a 37°C. As células foram ressuspensas em meio RPMI e incubadas por 20 min com 0,2 μ g/mL de anexina V sendo, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Quatro experimentos independentes; n = 4.

5. DISCUSSÃO

Produtos de glicação avançada contribuem para o estresse oxidativo intracelular e estão associados com o desenvolvimento de aterosclerose no DM. Mesmo após adequação do controle glicêmico, a modificação prévia de proteínas por AGE altera o estado redox e a função celular, atuando como fator de risco independente para as complicações vasculares no DM (Kilhovd *et al.*, 2007).

A albumina glicada corresponde a cerca de 80% do total de proteínas glicadas presentes na circulação (Cohen *et al.*, 2003; Mera *et al.*, 2005) e, embora apresente meia-vida reduzida quando comparada à albumina controle, pode ser formada na parede arterial, graças à geração local de precursores da reação de glicação avançada, formados em processos inflamatórios, típicos da lesão aterosclerótica (Karner & Perktol, 2000; Shao *et al.*, 2005).

No presente estudo, observamos aumento na produção de ROS em macrófagos tratados com albumina-GO, albumina-MGO e albumina-GAD. Os resultados obtidos, a partir das incubações com DPI, apontaram para contribuição da NADPH oxidase na produção de ROS, induzida por albumina-GO e albumina-GAD, em concordância com os achados de outros autores em tipos celulares distintos (Schupp *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que a albumina-AGE regula a expressão genética da NADPH oxidase (Rodiño-Janeiro *et al.* 2010). Por sua vez, os experimentos com CCCP evidenciaram contribuição da mitocôndria para o estresse oxidativo celular, induzido por albumina-AGE. Embora não tenhamos avaliado os efeitos dos AGE sobre outras vias geradoras de estresse oxidativo, como xantina oxidase e citocromo P450, é possível que estes sistemas possam também contribuir para o estresse oxidativo em macrófagos em estados de hiperglicemia crônica.

Vale ressaltar que a produção de ROS evidenciada em nosso estudo foi bastante inferior aos demais relatos da literatura (Basta *et al.*, 2005, Hayek *et al.*, 2007), o que pode ser resultante dos diferentes estímulos utilizados por esses autores, concentração de glicose ou macromoléculas modificadas por AGE, bem como os agentes distintos utilizados para induzir glicação avançada.

Alterações na função mitocondrial e falência dos sistemas bioenergéticos, associados ao estresse oxidativo estão relacionados com a progressão das

complicações diabéticas (Rabol *et al.*, 2006; Hojlund *et al.*, 2003). Proteínas mitocondriais são, por si, alvo de modificações de estresse oxidativo e carbonila que prejudicam sua função biológica (Rosca *et al.*, 2005).

No presente estudo, a funcionalidade da mitocôndria foi diminuída, uma vez que o consumo basal de oxigênio foi reduzido nos macrófagos tratados com albumina-AGE, o que pode, segundo alguns autores, contribuir para a geração de ROS pela mitocôndria, como consequência do estado de intensa redução dos componentes da cadeia respiratória (Cadenas & Davies, 2000; Kowaltowski *et al.*, 2009). Além disso, pode comprometer a funcionalidade dos transportadores ABC, os quais se utilizam da energia liberada pela hidrólise do ATP para a transferência de colesterol entre os folhetos interno e externo da membrana plasmática e, a seguir, para as partículas de apo A-I e HDL (Tang & Oram, 2009).

Nenhum efeito da oligomicina foi encontrado nas células tratadas com albumina-GAD, e isto pode ser relacionado à baixa taxa de consumo de oxigênio encontrado nas condições basais. Mesmo com o favorecimento do consumo de oxigênio pelo FCCP - por desacoplamento das membranas mitocondriais - este composto foi incapaz de restaurar a respiração mitocondrial em macrófagos tratados com albumina-GO e albumina-GAD. Exceção foi observada nas células tratadas com albumina-MGO, nas quais se obteve aumento da respiração mitocondrial. Este achado pode ser resultante das diferentes vias de geração e metabolização dos oxoaldeídos, as quais podem condicionar efeitos biológicos distintos. Neste aspecto, vale considerar que GO e GAD produzem carboximetil-lisina, enquanto que MGO gera carboxietil-lisina (Degenhardt *et al.*, 1998, Valencia *et al.*, 2004). As células apresentam sistemas eficientes para destoxificação do MGO, representados pelos complexos glioxalase e aldose redutase que convertem MGO em D-lactato (Thornalley *et al.*, 1990). De fato, as ações do MGO sobre o fluxo de lípidos celulares são muito modestas (Passarelli *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2006), enquanto o tratamento com concentrações maiores, que sobrepujam a capacidade de destoxificação, induz morte celular por apoptose (Okado *et al.*, 1996).

Kishikawa *et al.* (2006) demonstraram que a albumina glicada induz a expressão de receptores *scavenger* e a captação de LDL oxidada em monócitos humanos. Castilho *et al.* (2007) demonstraram que a albumina-AGE induz maior

captação de LDL nativas por macrófagos, contribuindo para o enriquecimento de colesterol nestas células. O mesmo foi recentemente observado com albuminas isoladas de animais com diabetes melito induzido por estreptozotocina ou com doença renal crônica, induzida por nefrectomia 5/6 (Carreiro *et al.*, 2010). Embora os mecanismos relacionados não estejam totalmente esclarecidos, é possível que a albumina-AGE induza maior estresse oxidativo em macrófagos, os quais ao liberarem O_2^- ao meio de cultura promovem oxidação e maior remoção das LDL. Neste sentido, demonstrou-se que a albumina-AGE induz aumento na expressão dos receptores CD-36 e RAGE, os quais favorecem a captação de LDL modificadas pelos macrófagos (Pinto *et al.*, 2007). O acúmulo de colesterol resultante reflete-se, na menor biossíntese de colesterol e estímulo à esterificação de colesterol livre pela acilcolesterol aciltransferase em macrófagos submetidos à glicoxidação (Castilho *et al.*, 2007). Dados divergentes foram, entretanto, encontrados por Hayek *et al.* (2007) após incubação de macrófagos J774 com elevadas concentrações de glucose. Neste caso, apesar do aumento na geração de ROS pela atividade da NAPH oxidase e maior expressão de CD-36, um aumento inesperado na atividade da HMG-CoA redutase foi observado.

Ligantes de RAGE, incluindo as calgranulinas/S100B e macromoléculas glicoxidadas geram estresse oxidativo, o qual pode ser prevenido por anticorpos anti-RAGE (Ding *et al.*, 2007), bem como por compostos antioxidantes e inibidores da glicação avançada, tais como metformina e aminoguanidina.

Pioglitazona, metformina, aminoguanidina e benfotiamina foram utilizadas em incubações com albumina-AGE para avaliar a geração de ROS por macrófagos. Apenas a aminoguanidina foi capaz de prevenir o aumento na produção de ROS, induzido por albumina-GAD, em concentração semelhante àquela descrita como capaz de prevenir alterações no efluxo de colesterol celular (Machado *et al.*, 2006). A aminoguanidina é um importante inibidor da formação de AGE *in vivo* e *in vitro*, além de apresentar propriedades antioxidantes. Deng *et al.* (2008) demonstraram que a aminoguanidina inibe a produção de O_2^- em macrófagos derivados de monócitos humanos incubados com LDL oxidada, o que corrobora nossos achados.

A metformina, embora utilizada em concentração que reverte alterações no efluxo de colesterol mediado por HDL, elevou a produção de ROS. Estas

discrepâncias podem estar relacionadas à adição direta dos fármacos nas células em cultura, diferentemente da maior parte dos estudos na qual a albumina é previamente tratada com oxoaldeídos na presença ou ausência de fármacos e, a seguir incubada com as células (Machado *et al.*, 2006; Matsuki *et al.*, 2009). Além disso, em nossos experimentos, a solubilidade dos fármacos no meio de cultura e difusão para a célula, bem como a variação em seu potencial anti-AGE e antioxidante podem ter interferido nos resultados obtidos. Ouslimani *et al.* (2007) demonstraram importante ação antioxidante da metformina, capaz de reduzir o estresse oxidativo celular induzido por AGE, graças à redução na expressão dos receptores RAGE e LOX-1. De fato, a metformina ativa a proteína quinase dependente de AMP cíclico (AMPK) e diminui a geração de ROS mitocondrial, além de promover aumento na biogênese de mitocôndrias e enzimas antioxidantes, como a manganês superóxido dismutase (MnSOD) (Kukidome *et al.*, 2006). Owen *et al.* (2000), demonstraram que a metformina inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial podendo, desta forma, causar um prejuízo no suprimento energético, o qual levaria ao aumento na relação AMP/ATP e concomitante ativação de AMPK. Porém, em concordância com nossos achados, a metformina por diminuir a respiração mitocondrial, aumentou a produção de ROS em adipócitos em cultura (Anneda *et al.*, 2008; Turrens, 2003). Interessante comentar que aumento na geração de ROS também foi encontrado em macrófagos tratados com albumina-C e metformina (dado não mostrado). Estudos envolvendo a ação da metformina sobre o efluxo de colesterol não demonstram ação direta sobre a correção do prejuízo do efluxo de colesterol causado pela glicação, porém, indicam uma atuação prévia na prevenção da formação dos AGE, tanto na HDL como na albumina (Machado *et al.*, 2006; Matsuki *et al.*, 2009).

Agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR), como a pioglitazona, diminuem os danos causados pela hiperglicemia em células endoteliais, reduzindo a geração de ROS, tanto no citosol como na mitocôndria, pelo aumento da enzima MnSOD e da biogênese mitocondrial, por meio da ação do coativador de PPAR γ (PGC-1 α) (Fujisawa *et al.*, 2009). Apesar de usarmos uma concentração 10 vezes maior do que a utilizada no estudo citado acima,

nenhuma diferença na produção de ROS foi encontrada em células submetidas à glicoxidação e ao tratamento conjunto com pioglitazona.

Ação antioxidante direta da BF tem sido demonstrada (Schmid *et al.* 2008), aliada à menor formação de AGE por sua ação em ativar a via transcetolase (Karachalias *et al.*, 2010; Stirban *et al.*, 2006; Berrone *et al.*, 2006). No entanto, na presente investigação a BF não reduziu a geração de ROS em células expostas à albumina-GAD.

Os efeitos da glicação avançada em macrófagos parecem sobrepujar o estímulo à transcrição dos genes do ABCA-1 e ABCG-1, induzido pelo acúmulo de colesterol celular. Neste sentido, demonstrou-se que a redução no conteúdo de ABCA-1, em fibroblastos e macrófagos submetidos à glicoxidação pelo tratamento direto com oxoaldeídos, ocorre independentemente de variação no mRNA e taxa inicial de tradução protéica, caracterizando área de lesão aterosclerótica de suínos tratados com estreptozotocina (Passarelli *et al.*, 2005). Por outro lado, a redução descrita para ABCG-1, em células tratadas com albumina-AGE, sucede a intensa redução no seu mRNA (Isoda *et al.*, 2007). Desta maneira, parece haver mecanismos distintos para a regulação da concentração dos receptores de HDL, em macrófagos tratados com albumina-AGE. É possível que o ABCA-1 já formado seja alvo de oxidação e/ou glicoxidação. Isto favoreceria a rápida redução do conteúdo proteico, concomitantemente ao aumento do estresse oxidativo, por degradação intracelular do receptor.

A aminoguanidina foi capaz de reverter a redução da expressão de ABCA-1 obtida após tratamento celular com albumina-AGE. Por outro lado, a benfotiamina que não preveniu a geração de ROS, não conseguiu restabelecer a expressão do receptor ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-AGE, refletindo a associação entre o estresse oxidativo e o prejuízo na concentração deste receptor.

O estresse oxidativo, associado ao acúmulo de lípidos intracelulares e indução inflamatória, pode deflagrar vias do estresse do retículo endoplasmático (RE). Castilho *et al.* (2010) demonstraram que a albumina-GAD induz o estresse do RE em macrófagos, com aumento da expressão de marcadores da via adaptativa a proteínas mal enoveladas. Interessantemente, o bloqueio do

estresse do RE foi capaz de prevenir a redução do conteúdo de ABCA-1 em macrófagos glicosidados, bem como o prejuízo no efluxo de colesterol celular. Até o momento, não se sabe se o tratamento com aminoguanidina, neste mesmo modelo celular, seria capaz de prevenir o estresse do RE e danos no fluxo de lípides celulares, o que reforçaria a associação entre estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e prejuízo no transporte reverso de colesterol.

Em adição, demonstra-se que a albumina-AGE é capaz de sensibilizar macrófagos à estimulação inflamatória por lipopolissacarídeos, o que agrava o insulto inflamatório aliado ao acúmulo intracelular de lípidos (Okuda *et al.* 2010).

6. CONCLUSÃO

A redução no conteúdo do receptor de HDL, ABCA-1 em macrófagos, vincula-se ao estresse oxidativo induzido pela albumina-AGE. Compostos, como aminoguanidina, que reduzem a formação de espécies reativas de oxigênio são capazes de prevenir a redução no conteúdo de ABCA-1 e as ações deletérias dos AGE sobre o transporte reverso de colesterol de macrófagos no diabetes melito.

REFERÊNCIAS

- ADROVER M., VILANOVA B., MUÑOZ F., DONOSO J. Inhibition of Glycosylation Processes: the Reaction between Pyridoxamine and Glucose. *Chem Biodivers.* Jul;2(7):964-75 (2005).
- AHMAD W., LI L., DENG Y. Identification of AGE-precursors and AGE formation in glycation-induced BSA peptides. *BMB Rep.* 31;41(7):516-22 (2008).
- AHMED N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 67(1):3-21 (2005).
- ALDERSON N. L., CHACHICH M. E., YOUSSEF N. N., BEATTIE R. J., NACHTIGAL M., THORPE S. R., BAYNES J. W. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int.* 63(6):2123-33 (2003).

- ANEDDA A., RIAL E., GONZÁLEZ-BARROSO MM. Metformin induces oxidative stress in white adipocytes and raises uncoupling protein 2 levels. *J Endocrinol.* 199(1):33-40 (2008).
- BASTA G., LAZZERINI G., DEL TURCO S., RATTO G. M., SCHMIDT A. M., DE CATERINA R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jul;25(7):1401-7, (2005).
- BEISSWENGER P. J., HOWELL S. K., O'DELL R. M., WOOD, M. R., TOUCHETTE A. D., SZWERGOLD B. S. α -Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care.* 24(4): 726-732, (2001).
- BERRONE E., BELTRAMO E., SOLIMINE C., APE A. U., PORTA M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem.* 281(14):9307-13, (2006)
- BIRD D. A., TANGIRALA R. K., FRUEBIS J., STEINBERG D., WITZTUM J. L., PALINSKI W. Effect of probucol on LDL oxidation and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Lipid Research.* 39: 1079-1090, (1998).
- BO S., CICCONE G., GANCIA R., ROSATO R., GRASSI G., MERLETTI F., PAGANO G. F. Mortality within the first 10 years of the disease in type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 16(1):8-12 (2006).
- BROWLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 414: 813-820, (2001).
- CADENAS E., DAVIES K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4):222-30 (2000).
- CAI W., HE J. C., ZHU L., PEPPA M., LU C., URIBARRI J., VLASSARA H. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients. *Circulation.* 20;110(3):285-91 (2004).
- CALCUTT N. A., COOPER M. E., KERN T. S., SCHMIDT A. M. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov.* 8(5):417-29 (2009).
- CANDIDO R., FORBES J. M., THOMAS M. C., THALAS V., DEAN R. G., BURNS W. C., TIKELLIS C., RITCHIE R. H., TWIGG S. M., COOPER M. E., BURRELL L. M. A

- breaker of advanced glycation end products attenuates diabetes-induced myocardial structural changes. *Circ Res.* 92(7): 785-92, (2003).
- CARREIRO, A. B., MACHADO-LIMA, A., IBORRA, R. T., PINTO, R. S., CASTILHO, G., ROCHA, J. C., MACHADO, J. T., FUSCO, F. B., NAKANDAKARE, E. R., CATANOZI, S., PASSARELLI, M. Enhanced LDL uptake by mouse peritoneal macrophages induced by serum albumin isolated from diabetic or uremic rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2010. v. 54. p. S119-S120.
- CASTILHO G., PHILIPSON P. BRAVOS., PINTO R. S., NAKANDAKARE, E. R., QUINTÃO E. C. R., PASSARELLI M. Glycooxidation Reduces Cholesterol Biosynthesis and Increases Cholesterol Esterification in J-774 Macrophages. In: 67th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2007, Chicago-IL-USA. *DIABETES*, 2007. v. 56. p. 728-P.
- CASTILHO G., SARTORI C. H., MACHADO-LIMA A., NAKANDAKARE E. R., SANTOS C. X., LAURINDO F. R. M., PASSARELLI M. Endoplasmic reticulum stress inhibition prevents the ABCA-1 reduction in glycated albumin-treated macrophages. In: 78th Congress of the European Atherosclerosis Society, 2010, Hamburgo. *Atherosclerosis Supplements*, 2010. v. 11. p. 136-136.
- COHEN M. P. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys.* 419(1):25-30 (2003).
- D'APOLITO M., DU X., ZONG H., CATUCCI A., MAIURI L., TRIVISANO T., PETTOELLO-MANTOVANI M., CAMPANOZZI A., RAIA V., PESSIN J.E., BROWNLEE M., GIARDINO I. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *J Clin Invest.* 120(1):203-13 (2010).
- DEGENHARDT T. P., THORPE S. R., BAYNES J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol*, 44: 1139-1145, (1998).
- DENG T, XU K, ZHANG L, ZHENG X. Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes. *Cell Biol Int.* 32(11):1425-32 (2008).
- DING Y., KANTARCI A., HASTURK H., TRACKMAN P. C., MALABANAN A., VAN DYKE T. E. Activation of RAGE induces elevated O₂⁻ generation by mononuclear phagocytes in diabetes. *J Leukoc Biol.* 81(2):520-7, (2007).

- FERNYHOUGH P., HUANG T. J., VERKHRATSKY A. Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 8(4):227-35; (2003).
- FREEDMAN B. I., WUERTH J. P., CARTWRIGHT K., BAIN R. P., DIPPE S., HERSHON K., MOORADIAN A. D., SPINOWITZ B. S. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II). *Control Clin Trials.* 20(5):493-510 (1999).
- FUJISAWA K., NISHIKAWA T., KUKIDOME D., IMOTO K., YAMASHIRO T., MOTOSHIMA H., MATSUMURA T., ARAKI E. TZDs reduce mitochondrial ROS production and enhance mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 379(1):43-8 (2009).
- GLOMB M. A., MONNIER V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem*, 270 (17): 10017-10026, (1995).
- GOLDBERG T., CAI W., PEPPA M., DARDAINE V., BALIGA B. S., URIBARRI J., VLASSARA H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 104(8):1287-91 (2004).
- HAMMES H. P., DU X., EDELSTEIN D., TAGUCHI T., MATSUMURA T., JU Q., LIN J., BIERHAUS A., NAWROTH P., HANNAK D., NEUMAIER M., BERGFELD R., GIARDINO I., BROWNLEE M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med.* 9(3):294-299 (2003).
- HAYEK T., KAPLAN M., KERRY R., AVIRAM M. Macrophage NADPH oxidase activation, impaired cholesterol fluxes, and increased cholesterol biosynthesis in diabetic mice: a stimulatory role for D-glucose. *Atherosclerosis.* 195(2):277-86 (2007).
- HE C. J., KOSCHINSKY T., BUENTING C., VLASSARA H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol Med.* 7(3):159-68 (2001).
- HIGAI K., SHIMAMURA A., MATSUMOTO K. Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. *Clin Chim Acta.* May;367(1-2):137-43, (2006).

- HOANG A., MURPHY A. J., COUGHLAN M. T., THOMAS M. C., FORBES J. M., O'BRIEN R., COOPER M. E., CHIN-DUSTING J. P., SVIRIDOV D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia*. 50(8):1770-9 (2007).
- HØJLUND K., WRZESINSKI K., LARSEN P. M., FEY S. J., ROEPSTORFF P., HANDBERG A., DELA F., VINTEN J., MCCORMACK J. G., REYNET C., BECK-NIELSEN H. Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta - subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem*. 278(12):10436-42 (2003).
- HORIUCHI S., SAKAMOTO Y., SAKAI M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids* 25: 283-292; (2003).
- HUTTER, E., UNTERLUGGAUER, H., GAREDEW, A., JANSEN-DURR, P., GNAIGER, E. (2006) High-resolution respirometry-a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology*, 41, 103-109, (2006).
- HYOGO H., YAMAGISHI S. Advanced glycation end products (AGEs) and their involvement in liver disease. *Curr Pharm Des*. 14(10):969-72 (2008).
- ISODA K., FOLCO E. J., SHIMIZU K., LIBBY P. AGE-BSA decreases ABCG1 expression and reduces macrophage cholesterol efflux to HDL. *Atherosclerosis*. 192:298-304 (2007).
- KARACHALIAS N., BABAEI-JADIDI R., RABBANI N., THORNALLEY P.J. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia*. 2010 Jul;53(7):1506-16 (2010).
- KARNER G., PERKTOLD K. Effect of endothelial injury and increased blood pressure on albumin accumulation in the arterial wall: a numerical study. *J Biomech*. 33(6):709-15 (2000).
- KILHOVD B. K., JUUTILAINEN A., LEHTO S., RÖNNEMAA T., TORJESSEN P. A., HANSEN K. F., LAAKSO M. Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*. 50(7):1409-17 (2007).
- KISHIKAWA H., MINE S., KAWAHARA C., TABATA T., HIROSE A., OKADA Y., TANAKA Y. Glycated albumin and cross-linking of CD44 induce scavenger receptor

- expression and uptake of oxidized LDL in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 339(3):846-51 (2006).
- KOWALTOWSKI A. J., DE SOUZA-PINTO N. C., CASTILHO R. F., VERCESI A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 15;47(4):333-43 (2009).
- KRIEGER M. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest,* 108: 793-797, (2001).
- KUKIDOME D., NISHIKAWA T., SONODA K., IMOTO K., FUJISAWA K., YANO M., MOTOSHIMA H., TAGUCHI T., MATSUMURA T., ARAKI E. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes.* 55(1):120-7, (2006).
- LAM M. C., TAN K. C., LAM K. S. Glycoxidized low-density lipoprotein regulates the expression of scavenger receptors in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis Dec;177(2):313-20,* (2004).
- LAMHARZI N., RENARD C.B., KRAMER F., PENNATHUR S., HEINECKE J.W., CHAIR A., BORNFELDT K. Hypelipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophage in atherosclerotic lesions. *Diabetes,* 53:3217-3225, (2004).
- LAPOLLA A., FLAMINI R., DALLA VEDOVA A., SENESI A., REITANO R., FEDELE D., BASSO E., SERAGLIA R., TRALDI P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med,* 41(9): 1166-73, (2003).
- LIMA A. M. S. Albumina modificada por glicação avançada no diabetes melito 1 e 2 prejudica o transporte reverse de colesterol e favorece o acúmulo de lipídeos em macrófagos [tese]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.
- LIN L. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol.* 3(5):351-8 (2006).
- MACHADO A. P., PINTO R. S., MOYSES Z. P., NAKANDAKARE E. R., QUINTAO E. C., 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 Mar;* 38(3):392-403, (2006).

- MACZUREK A., SHANMUGAM K., MUNCH G. Inflammation and the redox-sensitive AGE-RAGE pathway as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1126:147-51 (2008).
- MARMILLOT P., PATEL S., LAKSHMAN M. R. Reverse cholesterol transport is regulated by varying fatty acyl chain saturation and sphingomyelin content in reconstituted high-density lipoproteins. *Metabolism Feb;56(2):251-9* (2007).
- MATSUKI K., TAMASAWA N., YAMASHITA M., TANABE J., MURAKAMI H., MATSUI J., IMAIZUMI T., SATOH K., SUDA T. Metformin restores impaired HDL-mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis.* 206(2):434-8 (2009).
- MEERWALDT R., LINKS T., ZEEBREGTS C., TIO R., HILLEBRANDS J. L., SMIT A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 7;7:29 (2008).
- MERA K., ANRAKU M., KITAMURA K., NAKAJOU K., MARUYAMA T., TOMITA K., OTAGIRI M. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens Res Dec;28(12):973-80,* (2005).
- METZ T. O., ALDERSON N. L., CHACHICH M. E., THORPE S. R., BAYNES J. W. Pyridoxamine traps intermediates in lipid peroxidation reactions in vivo: evidence on the role of lipids in chemical modification of protein and development of diabetic complications. *J Biol Chem.* 278(43): 42012-9, (2003).
- MIYATA T., ISHIGURO N., YASUDA Y., ITO T., NANGAKU M., IWATA H., KUOKAWA K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun.* 6;244(1):45-9 (1998).
- MOGHADASIAN M.H., MCMANUS B.M, GODIN D.V., RODRIGUES B., FROHLICH J.F. Proatherogenic and Antiatherogenic Effects of Probucol and Phytosterols in Apolipoprotein E–Deficient Mice: Possible Mechanisms of Action. *Circulation* 99;1733-1739, (1999).
- MUKHERJEE T. K., MUKHOPADHYAY S., HOIDAL J. R. The role of reactive oxygen species in TNFalpha-dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta Jun 30;1744(2):213-23,* (2005).

- NAGAI R., MERA K., NAKAJOU K., FUJIWARA Y., IWAO Y., IMAI H., MURATA T., OTAGIRI M. The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772:1192-1198; (2007).
- NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL, YAMAGISHI S, MATSUMURA T, KANEDA Y, YOREK MA, BEEBE D, OATES PJ, HAMMES HP, GIARDINO I, BROWNLEE M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000 Apr 13;404(6779):787-90, (2000).
- ODANI H., SHINZATO T., MATSUMOTO Y., USAMI J., MAEDA K. Increase in three alpha, beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Comm*, 256: 89-93, (1999).
- OKADO A., KAWASAKI Y., HASUIKE Y., TAKAHASHI M., TESHIMA T., FUJII J., TANIGUCHI N. Induction of apoptotic cell death by methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in macrophage-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 225(1):219-24 (1996).
- OKUDA L. S., ROCCO D. D. F. M., NAKANDAKARE E. R., CATANOZI S., PASSARELLI M. The reverse cholesterol transport is impaired by the S100B calgranulin and LPS inflammatory response elicited by macrophage advanced glycated-albumin priming. In: 70th Scientific Sessions of the American Diabetes Association, 2010, Orlando. *Diabetes*, 2010. v. 59. p. A245-A246.
- ORAM J. F. ATP-binding cassette transporter A1 and cholesterol trafficking. *Current Opinion in Lipidology.* 13(4):373-381, (2002a).
- ORAM J. F., Molecular basis of cholesterol homeostasis: lessons from Tangier disease and ABCA1. *Trends Mol Med.* Apr;8(4):168-73 (2002b).
- ORAM J. F., Vaughan A. M., ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 99;1031-104, (2006).
- OUSLIMANI N., MAHROUF M., PEYNET J., BONNEFONT-ROUSSELOT D., COSSON C., LEGRAND A., BEAUDEUX J. L. Metformin reduces endothelial cell expression of both the receptor for advanced glycation end products and lectin-like oxidized receptor 1. *Metabolism.* Mar;56(3):308-13 (2007).
- OWEN M. R., DORAN E., HALESTRAP A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 15;348 Pt 3:607-14 (2000).

- PARK J. S., SVETKAUSKAITE D., HE Q., KIM J. Y., STRASSHEIM D., ISHIZAKA A., ABRAHAM E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* 279:7370-7377; (2004).
- PASSARELLI M., SHIMABUKURO A. F., CATANOZI S., NAKANDAKARE E. R., ROCHA J. C., CARRILHO A. J., QUINTAO E. C. Diminished rate of mouse peritoneal macrophage cholesterol efflux is not related to the degree of HDL glycation in diabetes mellitus. *Clin Chim Acta. Nov*;301(1-2):119-34, (2000).
- PASSARELLI M., TANG C., MCDONALD T. O., O'BRIEN K. D., GERRITY R. G., HEINECKE J. W., ORAM J. F. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes.* 54(7):2198-205, (2005).
- PINTO, RAPHAEL DE SOUZA ; PAIM, BRUNO ALVES ; VERCESI, ANÍBAL EUGENIO ; QUINTÃO, EDER CARLOS R ; PASSARELLI, MARISA . Intracellular Oxidative Stress Induced by Advanced Glycated Albumin Reduces ABCA-1, ABCG-1 and Increases RAGE and CD-36 Expression. In: 67th Scientific Sessions of American Diabetes Association, 2007, Chicago-IL-USA. DIABETES, 2007. v. 56. p. 724-P.
- RABØL R., BOUSHEL R., DELA F. Mitochondrial oxidative function and type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab.* 31(6):675-83 (2006).
- RAHBAR S., FIGAROLA J. L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 419: 63-79, (2003).
- RAHBAR S., NATARAJAN R., YERNENI K., SCOTT S., GONZALES N., NADLER J. L. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin Chim Acta*, 301: 65-77, (2000).
- RASHDUNI D. L., RIFICI V. A., SCHNEIDER S. H., KHACHADURIAN A. K. Glycation of high-density lipoprotein does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity. *Metabolism. Feb*;48(2):139-43, (1999).
- RODIÑO-JANEIRO B.K., GONZÁLEZ-PETEIRO M., UCIEDA-SOMOZA R., GONZÁLEZ-JUANATEY J.R., ALVAREZ E. Glycated albumin, a precursor of advanced glycation end-products, up-regulates NADPH oxidase and enhances oxidative stress in human endothelial cells: molecular correlate of diabetic vasculopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 26: 550–558 (2010).
- ROSCA M. G., MUSTATA T. G., KINTER M. T., OZDEMIR A. M., KERN T. S., SZWEDA L. I., BROWNLEE M., MONNIER V. M., WEISS M. F. Glycation of mitochondrial

proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(2):F420-30 (2005).

RUGGIERO-LOPEZ D., LECOMTE M., MOINET G., PATEREAU G., LAGARDE M., WIERNSPERGER N. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation. *Biochem Pharmacol.* 1;58(11):1765-73 (1999).

SANDU O., SONG K., CAI W., ZHENG F., URIBARRI J., VLASSARA H. Insulin resistance and type 2 diabetes in high-fat-fed mice are linked to high glycotoxin intake. *Diabetes.* 54(8):2314-9 (2005).

SCHMID U., STOPPER H., HEIDLAND A., SCHUPP N. Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev;* 24: 371–377 (2008).

SCHMIDT A. M., HORI O., CHEN J. X., LI J. F., CRANDALL J., ZHANG J., CAO R., YAN S. D., BRETT J., STERN D. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest. Sep;*96(3):1395-403 (1995).

SCHUPP N., SCHINZEL R., HEIDLAND A., STOPPER H. Genotoxicity of advanced glycation end products: involvement of oxidative stress and of angiotensin II type 1 receptors. *Ann N Y Acad Sci. Jun;*1043:685-95, (2005).

SEVILLANO N., GIRÓN M. D., SALIDO M., VARGAS A. M., VILCHES J., SALTO R. Internalization of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is required to mediate intracellular responses. *J Biochem.* 145(1):21-30 (2009).

SHAO B., FU X., MCDONALD T. O., GREEN P. S., UCHIDA K., O'BRIEN K. D., ORAM J. F., HEINECKE J. W. Acrolein Impairs ATP Binding Cassette Transporter A1-dependent Cholesterol Export from Cells through Site-specific Modification of Apolipoprotein A-I. *J Biol Chem. Oct 28;*280(43):36386-96, (2005).

STIRBAN A., NEGREAN M., GÖTTING C., URIBARRI J., GAWLOWSKI T., STRATMANN B., KLEESIEK K., KOSCHINSKY T., VLASSARA H., TSCHOEPE D. Dietary advanced glycation endproducts and oxidative stress: in vivo effects on endothelial function and adipokines. *Ann N Y Acad Sci.* 1126:276-9 (2008).

STIRBAN A., NEGREAN M., STRATMANN B., GAWLOWSKI T., HORSTMANN T., GOTTING C., KLEESIEK K., MUELLER-ROESEL M., KOSCHINSKY T.,

- URIBARRI J., VLASSARA H., TSCHOEPE D.. Benfotiamine prevents macro- and microvascular endothelial dysfunction and oxidative stress following a meal rich in advanced glycation end products in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Sep;29(9):2064-71, (2006).
- SUN L., ISHIDA T., YASUDA T., KOJIMA Y., HONJO T., YAMAMOTO Y., YAMAMOTO H., ISHIBASHI S., HIRATA K., HAYASHI Y. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 1;82(2):371-81 (2009).
- SVIRIDOV D., NESTEL P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 161(2):245-54, (2002).
- TAMURA Y., ADACHI H., OSUGA J., OHASHI K., YAHAGI N., SEKIYA M., OKAZAKI H., TOMITA S., IIZUKA Y., SHIMANO H., NAGAI R., KIMURA S., TSUJIMOTO M., ISHIBASHI S. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 278(15):12613-7 (2003).
- TAN KC. Reverse cholesterol transport in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2009 Jun;11(6):534-43, (2009).
- TANG C., ORAM J. F. The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1791(7):563-72, (2009).
- TANG C., VAUGHAN AM, ANANTHARAMAIAH GM, ORAM JF. Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1. *J Lipid Res*. 47(1):107-14 (2006).
- THORNALLEY PJ, YUREK-GEORGE A, ARGIROV OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem Pharmacol*, 60(1):55-65, (2000).
- THORNALLEY PJ. The glyoxalase system: new developments toward functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J*, 269:1-11, (1990)
- TRIGATTI B. L, KRIEGER M., RIGOTTI A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 1;23(10):1732-8 (2003).

- TURRENS J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552.2:335-344 (2003).
- VALENCIA J. V., WELDON S. C., QUINN D., KIERS G. H., DEGROOT J., TEKOPPELE J. M., HUGHES T. E. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry*, 324: 68-78 (2004).
- VAUGHAN A. M., ORAM J. F. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res* Nov;47(11):2433-43 (2006).
- VAVERKOVA H., KARASEK D., NOVOTNY D., JACKULIAKOVA D., LUKES J., HALENKA M., FROHLICH J. Apolipoprotein B versus LDL-cholesterol: Association with other risk factors for atherosclerosis. *Clin Biochem.* [Epub ahead of print] (2009).
- VERGÈS B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 Dec;23(6):681-5 (2009).
- WANG X, COLLINS HL, RANALLETTA M, FUKI IV, BILLHEIMER JT, ROTHBLAT GH, TALL AR, RADER DJ. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 117: 2216-24 (2007).
- WANG X. Q., YANG K., HE Y. S., LU L., SHEN W. F. Receptor mediated elevation in FABP4 levels by Advanced Glycation End Products induces Cholesterol and Triacylglycerol accumulation in THP-1 macrophages. *Lipids.* 46: 479-486 (2011).
- WAUTIER J. L., ZOUKOURIAN C., CHAPPEY O., WAUTIER M. P., GUILLAUSSÉAU P. J., CAO R., HORI O., STERN D., SCHMIDT A. M. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* Jan 1;97(1):238-43 (1996)
- WELLS-KNECHT K. J., BRINKMANN E., WELLS-KNECHT M. C., LITCH-FIELD J. E., AHMED M. U., REDDY S., ZYZAK D. V., THORPE S. R., BAYNES J. W. New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrolo Dial Transplant*, 11(Suppl. 5): 41-47 (1996).
- YU P.H., WRIGHT S., FAN E.H., LUN Z.R., GUBISNE-HARBERLE D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 11;1647(1-2):193-199 (2003).

- ZANNIS V.I., CHRONI A., KRIEGER M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. *J Mol Med.* 2006;84(4):276-94 (2006).
- ZHANG Z., DMITRIEVA N.I., PARK J.H., LEVINE R.L., BURG M.B. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 22;101(25):9177-8, (2004).
- ZHAO Y., MARCEL Y. L. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. *Biochemistry.* 35(22):7174-80 (1996).

APÊNDICE

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0807/07**, intitulado: **"ESTRESSE GLICOXIDATIVO E FLUXO DE LÍPIDES EM MACRÓFAGOS - PAPEL DOS INIBIDORES DE GLICAÇÃO AVANÇADA"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

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

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. EDER CARLOS ROCHA QUINTÃO**

Pesquisador (a) Executante: **RAPHAEL DE SOUZA PINTO**

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

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

Ao

Departamento de Clínica Médica

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15.04.09, tomou conhecimento do **relatório parcial** e da **inclusão da pesquisadora responsável Dra. Marisa Passarelli** no Protocolo de Pesquisa nº **0807/07**, intitulado: **"ESTRESSE GLICOXIDATIVO E FLUXO DE LÍPIDES EM MACRÓFAGOS - PAPEL DOS INIBIDORES DE GLICAÇÃO AVANÇADA"**

Pesquisador Responsável: Dr. Eder Carlos Rocha Quintão

CAPPesq, 15 de abril de 2009

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

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