Daniele Pereira dos Santos

A menor expressão do RNA mensageiro do receptor 1 de produtos finais de glicação avançada (AGER1) em células linfomononucleares de sangue periférico está associada à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo-
Corrêa Giannella

São Paulo

2015

Daniele Pereira dos Santos

A menor expressão do RNA mensageiro do receptor 1 de produtos finais de glicação avançada (AGER1) em células linfomononucleares de sangue periférico está associada à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo
Correa Giannella

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Daniele Pereira dos

Portadores de diabetes mellitus tipo 1 com doença renal apresentam menor expressão do receptor 1 de produtos finais de glicação (AGER-1) em células linfomononucleares / Daniel Pereira dos Santos. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Lucia Cardillo Correa Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Nefropatias diabéticas 3.Retinopatia diabética 4.Neuropatias diabéticas 5.Expressão gênica 6.Produtos finais de glicosilação 7.Antioxidantes 8.Estresse oxidativo

USP/FM/DBD-186/15

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus.

*Aos meus pais, Ivani e Miguel, e ao meu irmão Gabriel pelo
apoio, amor e dedicação incondicionais.*

*E ao grande amor da minha vida, Marcelo, por fazer meus
dias mais felizes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella, por ter me recebido de braços abertos, acreditado sinceramente e confiado na minha capacidade para a realização deste trabalho. E ainda, por ter compartilhado comigo importantes ensinamentos e por todo carinho dedicado.

À Maria Beatriz, que me muito me ajudou desde a bancada à superação das burocracias e angústias do Mestrado. E mesmo diante de todas as minhas loucuras e ansiedades, tornou-se minha amiga e me deu calma para prosseguir.

A toda a equipe de funcionários do LIM-25 (Grupo de Diabetes), em especial à Ana Mercedes que me ajudou imensamente desde o início e me deu importantes dicas técnicas que facilitaram o meu dia-dia de pesquisadora.

Aos alunos do LIM-25 que contribuíram com a minha formação intelectual e se tornaram muito especiais pra mim, principalmente: Thiago Patente, Sharon Admoni, Ricardo Perez e Karina Thieme.

À Dra. Marisa Passarelli, que foi essencial durante a execução de todo este trabalho de Mestrado, sempre dando contribuições valiosíssimas.

À Dra. Adriana Machado Saldiba de Lima , pela realização do recordatório alimentar para quantificação da ingesta de produtos finais de glicação avançada.

Aos funcionários e alunos do LIM-10, principalmente: Karol, Paula, Diego, Milessa e o Rô que vivenciaram momentos “Mara” no bandeirão e no laboratório.

À Dra. Maria Heloísa Shimizu, do LIM-12, que nos ajudou com as dosagens de TBARS e GSH.

À Dra. Marcia Nery e à Dra. Marcia Queiroz, que me apoiaram e contribuíram na realização do trabalho.

À Dra. Cleide Machado, por ter realizado a avaliação da retinografia dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 para a classificação da retinopatia.

À Dra. Sandra Mara Ferreira Villares, por ter sugerido a realização do recordatório alimentar.

Ao Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado, pela inclusão deste trabalho de Mestrado no seu Projeto Temático.

Ao Prof. Dr. Daniel Giannella-Neto, por me auxiliar com as análises estatísticas e me ensinar a fazê-las.

À Prof. Dra. Suely Marie, que foi de enorme contribuição no exame de qualificação e a sua aluna Isabela, que me auxiliou na análise de alguns dados.

A todos os funcionários, enfermeiras e auxiliares de enfermagem que contribuíram com a coleta de amostras.

Aos Residentes e Preceptores da Disciplina de Endocrinologia, que incentivaram os pacientes a participar da pesquisa.

Aos pacientes e aos controles saudáveis que doaram material para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas da época da graduação na UNESP-Botucatu e também às amigas de república, que mesmo distantes fisicamente se fizeram presentes em momentos de conversa, carinho e descontração, sempre me incentivando a seguir em frente, minhas lindas: Vânia Magalhães, Bruna Lara, Fabiana Zambuzi e Victória Faleiros.

A toda minha grande família que acredita no meu potencial, meus primos lindos, vocês fizeram a diferença.

Aos meus queridos amigos de vida que durante essa etapa me acompanharam e apoiaram: Maíra Sabóia, Denise Ribeiro, Camila Bezerra, Danilo Reis e Vinícia Grams!

Aos meus pais, Ivani e Miguel, e ao meu irmão Gabriel, a quem dedico este trabalho, por serem meu porto seguro.

Ao Marcelo, meu noivo, por me dar a estabilidade emocional necessária e me fazer tão feliz.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a
quem se atreve. E a vida é muito bela para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Esta dissertacao esta de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicacao:

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

Universidade de Sao Paulo. Faculdade de Medicina. Servico de Biblioteca e Documentacao. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragao, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 3a ed. Sao Paulo: Servico de Biblioteca e Documentacao; 2011.

Abreviaturas dos titulos dos periodicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Epidemiologia do Diabetes mellitus.....	26
1.2 Complicações crônicas do diabetes.....	26
1.3 Mecanismos de lesão tecidual desencadeados pela hiperglicemia.....	29
1.5 Receptores de AGEs.....	35
1.5.1 RAGE.....	35
1.5.2 AGER-1.....	38
1.6 Sirtuína-1	41
1.7 Proteína de interação com a tioredoxina (TXNIP).....	43
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1 Caracterização clínica e laboratorial dos portadores de DM1	50
3.2 Obtenção das células linfomononucleares	54
3.3 Avaliação dos marcadores de peroxidação lipídica (TBARS)	55
3.4 Avaliação das concentrações de GSH.....	55
3.5 Extração, avaliação da integridade e quantificação do RNA total das células linfomononucleares	56
3.6 Avaliação quantitativa da expressão dos genes alvo por RT-qPCR:	58
3.7 Dosagem das concentrações plasmáticas de CML:.....	60
3.8 Avaliação do consumo oral de AGEs.....	61
3.9 Análise Estatística	61
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Caracterização clínica e laboratorial dos portadores de DM1	63
4.2 Avaliação da GSH e do TBARS	65
4.3 Avaliação da expressão dos genes-alvo por RT- qPCR	65

4.3.1	Controles x DM1	65
4.3.2	Portadores de DM1.....	69
4.4	Dosagem das concentrações plasmáticas de carboximetil-lisina (CML)	80
4.5	Avaliação do consumo oral de AGE.....	81
5	<i>DISCUSSÃO</i>	82
6	<i>CONCLUSÃO</i>	90
7.	<i>ANEXOS</i>	92
8.	<i>REFERÊNCIAS</i>	122

Lista de Figuras

Figura 1. Estresse oxidativo como elemento unificador das quatro vias bioquímicas deletérias.....	30
Figura 2. Formação dos produtos finais de glicação avançada.	32
Figura 3. Fatores que determinam as concentrações circulantes de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em seres humanos.	34
Figura 4. Sistema antioxidante endógeno da Tiorredoxina. (TXN). TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina..	44
Figura 5. Representação dos critérios para diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). HO, hipotensão ortostática	54
Figura 6. Gel de agarose a 1% representativo de amostras de RNA total extraídas de células linfomononucleares de sangue periférico de portadores de DM1.	57
Figura 7. Amostra de RNA de alta qualidade, conforme evidenciado pelo valor do RNA integrity number = 9,4 e pela ausência de contaminação com DNA genômico após análise no equipamento Bioanalyser.	57
Figura 8. Estabilidade dos genes <i>B2M</i> , <i>ACTB</i> e <i>HPRT1</i> obtida pelo programa Genorm a partir dos resultados de expressão gênica de um experimento piloto em seis portadores de DM1 e em três controles saudáveis não diabéticos.	60
Figura 9. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>DDOST</i> (<i>AGER1</i>) nos portadores de DM1 <i>versus</i> o grupo controle.	66
Figura 10. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>TXNIP</i> nos portadores de DM1 <i>versus</i> o grupo controle.	66
Figura 11. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>TXN</i> nos portadores de DM1 <i>versus</i> o grupo controle.	67
Figura 12. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>AGER</i> (<i>RAGE</i>) nos portadores de DM1 <i>versus</i> o grupo controle.	67
Figura 13. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>SIRT1</i> nos portadores de DM1 <i>versus</i> o grupo controle	67

Figura 14. Curva ROC da expressão relativa dos genes-alvo: <i>DDOST</i> , <i>AGER</i> , <i>SIRT1</i> , <i>TXN</i> e <i>TXNIP</i> no grupo controle versus grupo DM1.....	68
Figura 15. Heatmap da expressão relativa dos genes-alvo: <i>DDOST</i> , <i>AGER</i> , <i>SIRT1</i> , <i>TXNIP</i> e <i>TXN</i> no grupo de portadores de DM 1 e no grupo controle.....	69
Figura 16. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXNIP</i> no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle.....	70
Figura 17. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXN</i> no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle.....	70
Figura 18. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXNIP</i> nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve, no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) e no grupo controle.....	71
Figura 19. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXN</i> nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve, no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) e no grupo controle.....	71
Figura 20. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>TXNIP</i> nos portadores de DM1 com ausência ou presença de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle	72
Figura 21. Expressão relativa do RNA mensageiro de <i>TXN</i> nos portadores de DM1 com ausência ou presença de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle	72
Figura 22. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>DDOST</i> (<i>AGER1</i>) nos portadores de DM1 com ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle.....	73
Figura 23. Curva ROC da expressão relativa do <i>DDOST</i> no grupo ausência de ND versus presença de ND..	74
Figura 24. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXNIP</i> nos portadores de DM1 com ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle.....	74

Figura 25. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXN</i> nos portadores de DM1 com ausência ou presença de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle.....	75
Figura 26. Expressão relativa do gene <i>DDOST</i> (<i>AGER1</i>) nos portadores de DM1 com ausência ou presença de nefropatia diabética (ND; apenas macroalbuminúria e doença renal crônica terminal) e no grupo controle.....	76
Figura 27. Expressão relativa do gene <i>TXNIP</i> nos portadores de DM1 com ausência ou presença de nefropatia diabética (ND; apenas macroalbuminúria e doença renal crônica terminal) e no grupo controle.	76
Figura 28. Expressão relativa do gene <i>TXN</i> nos portadores de DM1 com ausência ou presença de nefropatia diabética (ND; apenas macroalbuminúria e doença renal crônica terminal) e no grupo controle	76
Figura 29. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>DDOST</i> (<i>AGER1</i>) nos portadores de DM1 estratificados de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e no grupo controle.....	77
Figura 30. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXNIP</i> nos portadores de DM1 estratificados de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e no grupo controle.....	77
Figura 31. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene <i>TXN</i> nos portadores de DM1 estratificados de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e no grupo controle.....	78
Figura 32. Expressão relativa do gene <i>AGER</i> de acordo com o consumo de AGEs nos três dias anteriores à coleta de sangue	81

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Correlação entre os valores das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticos e de glutathiona (GSH) sanguíneos nos pacientes portadores de DM1.....	65
Gráfico 2. Correlação entre a expressão relativa dos genes <i>SIRT1</i> e <i>DDOST</i>	78
Gráfico 3. Correlação entre a expressão relativa dos genes <i>SIRT1</i> e <i>AGER</i>	79
Gráfico 4. Correlação entre a expressão relativa dos genes <i>TXN</i> e <i>TXNIP</i>	79
Gráfico 5. Correlação entre a expressão relativa dos genes <i>TXN</i> e <i>SIRT1</i>	80
Gráfico 6. Correlação entre a expressão relativa dos genes <i>TXN</i> e <i>DDOST</i>	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização clínica e laboratorial dos portadores de DM1 incluídos no estudo.....	64

Lista de Abreviaturas

AGE	produtos finais de glicação avançada (do inglês: <i>advanced glycation end products</i>)
Apo	Apolipoproteína
AKT/PKB	Proteína cinase B
CD	grupamento de diferenciação (do inglês: <i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	DNA complementar
CML	carboximetil-lisina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Cicloxigenase
DAG	Diacilglicerol
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DG	Deoxiglicosona
DM	diabetes mellitus
DM1	diabetes mellitus tipo 1
DNA	ácido desoxirribonucleico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DRC	doença renal crônica
DRCT	doença renal crônica terminal
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EGF	fator de crescimento epitelial (do inglês: <i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>

ERK	proteína cinase regulada por sinais extracelulares (do inglês: <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
EROs	espécies reativas de oxigênio
EURODIAB	<i>European Diabetes Prospective Complications Study Group</i>
FKHRL	membros homólogos da família <i>forkhead</i> (do inglês: <i>homologue of forkhead family members</i>)
FOXO	fator de transcrição <i>forkhead</i> (do inglês: <i>forkhead transcription factor</i>)
GAD	Glicolaldeído
GFAT	glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase
GLUT	transportador de glicose (do inglês: <i>glucose transporter</i>)
GO	Glioxal
GSH	Glutationa
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	hemoglobina glicada
HDL	lipoproteína de alta densidade (do inglês: <i>high density lipoprotein</i>)
HF	alta frequência (do inglês: <i>high frequency</i>)
HO	hipotensão ortostática
HOMA	modelo de avaliação da homeostase (do inglês: <i>homeostatic model assessment</i>)
HOMA- IR	modelo de avaliação da homeostase da resistência a insulina (do inglês: <i>homeostatic model assessment insulin resistance</i>)
HPLC	cromatografia líquida de alta performance (do inglês: <i>high-performance liquid chromatography</i>)
ICAM	molécula de adesão intercelular (do inglês: <i>intercellular adhesion</i>)

	<i>molecule</i>)
IL	Interleucina
IMC	índice de massa corpórea
Km	constante de Michaelis–Menten
KO	<i>Knockout</i>
LDL	lipoproteína de baixa densidade (do inglês: <i>low density lipoprotein</i>)
LF	baixa frequência (do inglês: <i>low frequency</i>)
MAP	proteínas ativadas por mitógenos (do inglês: <i>mitogen activated protein</i>)
MCP	proteína quimioatraente de monócitos (do inglês: <i>monocyte chemoattractant protein</i>)
MDA	malonildialdeído
MGO	metilglioxal
NAC	neuropatia autonômica cardiovascular
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina difosfato (do inglês: <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAMPT	nicotinamida fosforibosiltransferase
ND	nefropatia diabética
NF-κB	fator nuclear κB (do inglês: <i>factor nuclear kappa B</i>)
NO	óxido nítrico (do inglês: <i>nitric oxide</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OST	oligosacariltransferase
PAI1	plasminogênio-tipo 1 (do inglês: <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)

PBS	tampão salino fosfatado (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reação em cadeia polimerase (do inglês: <i>polymerase chain reaction</i>)
PI	fosfatidilinositol
PKC	proteína cinase C
RAGE	receptores para produtos finais de glicação avançada
RCF	força centrífuga relativa (do inglês: <i>relative centrifugal force</i>)
RD	retinopatia diabética
RIN	RNA <i>integrity number</i>
ROC	característica de operação do receptor (do inglês: <i>receiver operating characteristic</i>)
RNA	ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa (do inglês: <i>reverse transcription</i>)
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SIRT	sirtuína
SR	receptor <i>scavenger</i> (do inglês: <i>scavenger receptor</i>)
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês: <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TCA	ácido tricloroacético
TFGe	taxa de filtração glomerular estimada
TGF- β	fator de crescimento transformante beta (do inglês: <i>transforming growth factor beta</i>)
TLR	receptor do tipo <i>toll</i> (do inglês: <i>toll-like receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>tumor necrosis factor alfa</i>)

Tris	tris-hidroximetilaminometano
TXN	Tiorredoxina
TXNIP	proteína de interação com a tiorredoxina (do inglês: <i>TXN interacting protein</i>)
VCAM	molécula de adesão vascular celular (do inglês: <i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)
VLf	frequência muito baixa (do inglês: <i>very low frequency</i>)

Resumo

Santos DP. *Portadores de diabetes mellitus tipo 1 com doença renal apresentam menor expressão do receptor 1 de produtos finais de glicação (AGER-1) em células linfomononucleares* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O papel da hiperglicemia na patogênese das complicações crônicas do diabetes mellitus tipo 1 (DM1) está bem estabelecido; um dos mecanismos propostos para explicar seus efeitos deletérios é o aumento da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs alteram irreversivelmente a estrutura de macromoléculas, comprometendo sua função biológica. Além disso, a interação com receptores para AGE (RAGEs) favorece vias de transdução de sinal que culminam na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Um segundo tipo de receptor de AGEs, o AGER1 contrapõe-se à toxicidade dos AGEs, graças ao estímulo à atividade antioxidante e à redução do estresse inflamatório. Uma enzima de potencial interesse é a sirtuína 1, uma desacetilase que desempenha importante papel na resposta ao estresse e a compostos tóxicos e que parece ter sua atividade diminuída no DM, sendo negativamente modulada pelos AGEs. O sistema tioredoxina (TXN) é um dos principais sistemas antioxidantes endógenos; a TXN é capaz de interagir com várias proteínas, tal como a *TXN interacting protein* (TXNIP), implicada na patogênese do DM e de suas complicações. Há poucos estudos na literatura abordando a expressão de receptores de AGEs e sua associação com complicações crônicas microvasculares no DM1. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão do mRNA dos genes que codificam o RAGE (*AGER*), o AGER1 (*DDOST*), a sirtuína 1 (*SIRT1*) e a TXNIP (*TXNIP*) pela técnica de reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) em células linfomononucleares de sangue periférico de portadores de DM1 com diferentes graus de comprometimento microvascular (retinopatia diabética [RD], neuropatia autonômica cardiovascular [NAC] e nefropatia diabética [ND]). Os resultados dos genes-alvo foram normalizados pela média da expressão de dois genes controles endógenos (beta 2 microglobulina e beta actina). A expressão dos genes-alvo também foi quantificada em uma população de indivíduos controles não diabéticos (n=26, 80% do sexo feminino, idade mediana de 30 anos). Um total de 150 portadores de DM1 foi classificado em dois grupos distintos: Grupo A: pacientes sem complicações crônicas microvasculares e/ou com RD não proliferativa leve (n=68; 61,7% do sexo feminino; idade de 33 anos; idade ao diagnóstico de 12 anos; duração do DM1 de 19 anos; HbA1c de 8,1%; dados expressos em mediana) e Grupo B: pacientes com pelo menos uma das complicações microvasculares (RD não proliferativa moderada/ grave ou RD proliferativa e/ou NAC e/ou ND; n=82; 66% do sexo feminino; idade de 33 anos; idade ao diagnóstico de 11 anos; duração do DM1 de 21 anos; HbA1c de 8,2%). Fumantes não foram incluídos no estudo. As diferenças entre os grupos foram analisadas por Teste de Mann-Whitney e as correlações entre as variáveis contínuas

foram avaliadas pelo teste de Spearman. Comparando-se o grupo de portadores de DM1 com o grupo controle, observou-se uma diminuição na expressão de *DDOST* ($p=0,01$) e um aumento na expressão de *TXNIP* ($p<0,001$) no grupo DM1. Nas análises da diferença de expressão por complicação microvascular, a expressão relativa de *TXNIP* foi maior nos grupos A e B *versus* o grupo controle ($p=0,01$ e $p=0,04$, respectivamente); nos pacientes com a presença de RD não proliferativa moderada/grave e proliferativa ($n=44$) e naqueles com ausência de RD ou com RD não proliferativa leve ($n=86$) ($p=0,0012$ e $p=0,01$, respectivamente) em relação ao grupo controle; nos pacientes sem NAC ($n=104$) e com NAC ($n=46$) ($p=0,03$ e $p=0,04$, respectivamente) *versus* o grupo controle e por fim, em relação à taxa de filtração glomerular (TFGe) estimada, tanto os pacientes com valores <60 mL/min como aqueles com valores ≥ 60 mL/min apresentaram maior expressão de *TXNIP* em relação ao grupo controle ($p=0,01$ e $p=0,005$, respectivamente). Os pacientes com ND ($n=44$) também apresentaram menor expressão relativa do gene *DDOST* ($p=0,031$) quando comparados aos pacientes sem ND (normoalbuminúricos, $n=107$) e ao grupo controle ($p=0,011$); os pacientes com TFGe <60 mL/min também apresentaram menor expressão de *DDOST* em relação ao grupo controle ($p=0,03$). Observou-se ainda uma correlação positiva da expressão de *SIRT1* com a do *AGER* (ρ Spearman= $0,51$; $p<0,0001$) e do *DDOST* (ρ Spearman= $0,51$; $p<0,0001$). A expressão de *TXN* correlacionou-se positivamente com a expressão de *TXNIP* (ρ Spearman= $0,65$; $p<0,0001$), de *SIRT1* (ρ Spearman= $0,41$; $p<0,0001$) e de *DDOST* (ρ Spearman= $0,23$; $p=0,004$). Em um subgrupo de 30 portadores de DM1, observou-se que aqueles que consomem uma dieta rica em AGE têm maior expressão relativa de *AGER* (RAGE) ($p=0,03$). A expressão aumentada de *TXNIP* nas células linfomononucleares é afetada pelas anormalidades metabólicas que cursam com o DM1, mas não refletem a presença das complicações microvasculares. Por outro lado, a expressão do gene que codifica o AGER1 parece refletir o acometimento renal, já que está diminuída nos pacientes com ND e naqueles com TFGe <60 mL/min/ $1,73\text{m}^2$.

Descritores: diabetes mellitus tipo 1; nefropatias diabéticas; retinopatia diabética; neuropatias diabéticas; expressão gênica; produtos finais de glicosilação; antioxidantes; estresse oxidativo.

Abstract

Santos DP. *Lower expression of advanced glycation endproducts receptor-1 (AGER1) in peripheral blood mononuclear cells is associated with renal disease in type 1 diabetes patients* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

The role of hyperglycemia in the pathogenesis of chronic complications of type 1 diabetes (T1D) is well established; one of the mechanisms proposed to explain its deleterious effects is the increased formation of advanced glycation end products (AGEs). AGEs irreversibly alter macromolecule structure, compromising its biological function. In addition, AGEs interact with its specific receptor RAGE (encoded by *AGER*) leading to the generation of reactive oxygen species (ROS). The AGER1 receptor (encoded by *DDOST*) counteracts RAGE signaling by stimulating cellular antioxidants and reducing inflammatory stress. An enzyme of potential interest is sirtuin 1, a deacetylase that plays an important role in the response to stress and to toxic compounds that may have their activity decreased in diabetes, being negatively modulated by AGEs. The Thioredoxin (TXN) system is a major endogenous antioxidant system; TXN is able to interact with several proteins, such as TXN interacting protein (TXNIP), implicated in the pathogenesis of diabetes and its complications. There are few studies addressing the expression of AGEs receptor and its association with microvascular chronic complications in T1D. The objectives of this study were to evaluate mRNA expression of the genes encoding RAGE (*AGER*), AGER1 (*DDOST*), sirtuin 1 (*SIRT1*) and TXNIP (*TXNIP*) (quantitative RT-PCR with the use of TaqMan probes) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of T1D patients with different degrees of microvascular complications (retinopathy [DR], cardiovascular autonomic neuropathy [CAN] and nephropathy [DN]). The results of the target genes were normalized by the mean expression of two housekeeping genes (beta 2-microglobulin and beta actin). A total of 130 patients with T1D was sorted into two groups: Group A: patients without microvascular chronic complications or presenting mild non-proliferative DR (n = 68; 61.7% female; age 33; age at diagnostic 12; DM1 duration of 19 years, HbA1c 8.1%, data expressed as median), and Group B: patients with at least one of microvascular complication (moderate/severe non-proliferative DR or proliferative DR or CAN or ND; n = 82; 66% female; age 33 years; age at diagnosis of 11 years; duration of T1D of 21 years, HbA1c 8.2%; data expressed as median). Smokers were excluded from the study. Differences between groups were analyzed by Mann-Whitney test and correlations between continuous variables were assessed using Spearman's test. T1D patients presented, respectively, higher and lower relative expression of *TXNIP* (p<0.001) and *DDOST* (p=0.01) in comparison to the control group. In the analyses considering diabetes complications, *TXNIP* expression was higher in Groups A and B (p=0.01 and p=0.04, respectively) *versus* the control group. Patients with proliferative or moderate/severe non-proliferative DR (n=44) and also patients with mild non-proliferative DR or without DR (n=86) presented higher *TXNIP* expression *versus* the control group (p=0.0012 and p=0.01, respectively). Patients without (n=104) and with (n=46) CAN presented higher *TXNIP* expression than the control group (p=0.03 and p=0.04, respectively); finally, concerning estimated glomerular filtration rate (eGFR), both the group of patients with values <60 mL/min and ≥ 60 mL/min presented higher *TXNIP* expression *versus* the control group (p=0.01 and p=0.005, respectively). Patients presenting DN (n=44) had a lower *DDOST*

expression in comparison to patients without DN (n=107) (p=0.031) and to the control group (p=0.011); patients with eGFR <60 mL/min also presented a lower expression of *DDOST* in comparison to the control group (p=0.03). A positive correlation was observed between expression of *SIRT1* and *AGER* (ρ Spearman=0.51; p<0.0001) and between expression of *SIRT1* and *DDOST* (ρ Spearman=0.51; p<0.0001). The expression of *TXN* positively correlated with the expression of *TXNIP* (ρ Spearman=0.65; p<0.0001), *SIRT1* (ρ Spearman=0.41; p<0.0001) and *DDOST* (ρ Spearman=0.23; p 0.004). In a subgroup of 30 T1D patients, a higher expression of the gene encoding RAGE was observed in those patients consuming a diet enriched in AGEs (p=0.03). Expression of *TXNIP* in PBMC is affected by the metabolic abnormalities of T1D but does not reflect the presence of microvascular complications while expression of the gene encoding *AGER1* seems to reflect diabetic kidney impairment since it is decreased in patients with DN and in patients with an eGFR < 60 mL/min/1.73m².

Descriptors: diabetes mellitus, type 1; diabetic nephropathies; diabetic retinopathy; diabetic neuropathies; gene expression; glycosylation end products, advanced; antioxidants; oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 **Epidemiologia do Diabetes mellitus**

Estima-se que, em 2014, foram gastos no mundo 612 bilhões de dólares com o Diabetes mellitus (DM) (1). A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que no ano de 2012, o DM causou 1,5 milhões de mortes, equivalente a 2,7% da mortalidade total. De acordo com a OMS, existem cerca de 387 milhões de pessoas no mundo portadoras de DM, sendo que em 2030 ela afetará aproximadamente 592 milhões de pessoas e será considerada a sétima causa de morte mundial (2, 3).

No Brasil, de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), há 12 milhões de indivíduos portadores de DM, número que corresponde a 6,2% da população (1). Em 2011, dados do Ministério da Saúde revelaram que a cada 100.000 brasileiros, 30 morriam especificamente pelo DM (1). Em relação ao DM tipo 1 (DM1), um estudo publicado em 2000 estimou a incidência no Brasil na população de zero a 14 anos de 8 casos por 100.000 habitantes no período entre 1990 a 1992 (4).

1.2 **Complicações crônicas do diabetes**

As complicações crônicas do DM estão associadas à morte prematura e a gastos que chegam a 10% do orçamento total com saúde em alguns países. O DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) revolucionou o tratamento para portadores de DM1 demonstrando a eficácia de um tratamento intensivo na diminuição da incidência das complicações crônicas microvasculares (5).

Praticamente, todas as formas de DM são caracterizadas por hiperglicemia e acometimento da microvasculatura da retina (retinopatia), do glomérulo renal (nefropatia) e dos nervos (neuropatia). A incapacidade das células endoteliais dos capilares da retina, das células mesangiais do glomérulo renal, dos neurônios e das

células de Schwann dos nervos periféricos de evitarem a excessiva captação de glicose para o meio intracelular durante a hiperglicemia prolongada as tornam susceptíveis às altas concentrações de glicose durante a hiperglicemia prolongada, resultando, posteriormente, nas complicações crônicas microvasculares diabéticas (6). A retinopatia diabética (RD) é caracterizada pela quebra na barreira hemato-retiniana, perda de pericitos capilares, formação de microaneurismas, disfunção neuronal e isquemia progressiva (7). A RD é diagnosticada pelo aparecimento de lesões na vasculatura da retina que, em alguns casos, levam a uma perda irreversível da visão por hemorragias no humor vítreo ou por descolamento da retina resultante da retração secundária à fibrose (8). Entretanto, há evidências na literatura de que a presença de microaneurismas na retina não seja exclusiva de pacientes com RD, uma vez que de 5-10% da população não diabética apresenta esse achado ao fundo de olho (9).

Clinicamente, a RD é dividida em não proliferativa e proliferativa. Ambas são caracterizadas por um amplo espectro de lesões na retina, incluindo mudanças na permeabilidade, microaneurismas capilares, degeneração capilar, hemorragias e a formação de neovasos, esse último específico da RD proliferativa (10).

A nefropatia diabética (ND) está entre as causas mais comuns de doença renal crônica terminal (DRCT) na população, sendo que o primeiro estágio é composto por anormalidades na hemodinâmica glomerular resultando em hiperfiltração glomerular e, posteriormente, em microalbuminúria. A função glomerular tende a declinar e, na maioria dos casos, ocorre a perda concomitante de albumina na urina. Em uma parcela dos pacientes, a diminuição da taxa de filtração glomerular pode progredir até a perda total da função renal (8).

A neuropatia diabética é definida como a presença de sinais e sintomas de disfunção dos nervos periféricos em pacientes com DM, desde que sejam excluídas

outras causas de neuropatia (11). Aproximadamente 50% dos portadores de DM são acometidos por algum grau de neuropatia diabética, podendo ser uma poli ou uma mononeuropatia (8).

A neuropatia também pode afetar o sistema nervoso autônomo de diferentes sistemas. Apesar do seu impacto significativo sobre a sobrevida e a qualidade de vida dos portadores de DM, a neuropatia autonômica no sistema cardiovascular está entre as neuropatias menos diagnosticadas. Aqueles pacientes acometidos sofrem primeiramente a perda do sistema parassimpático e em estágios mais graves, ocorre a falência do sistema nervoso autonômico simpático (12).

O DM também está associado à doença macrovascular aterosclerótica acelerada, a qual afeta as coronárias e as artérias que suprem o cérebro e os membros inferiores (macroangiopatia) (13).

A epidemiologia das complicações diabéticas varia de acordo com a população estudada e com o tempo de acompanhamento; por exemplo, a incidência cumulativa de microalbuminúria em pacientes com DM1 foi de 12,6% em 7,3 anos, de acordo com o estudo *European Diabetes Prospective Complications Study Group* (EURODIAB) (14), enquanto em um estudo com seguimento de 18 anos de pacientes DM1 dinamarqueses observou-se uma incidência cumulativa de 33% (15).

Em relação à RD, em países desenvolvidos, sua incidência em portadores de DM1 com pelo menos 10 anos de doença é de 80% e aumenta para aproximadamente 95% após 20 anos de doença (16).

No Brasil, o estudo “Estratégias de Rastreamento e Diagnóstico da Retinopatia e Neuropatia Diabética e Identificação de Biomarcadores de Complicações Crônicas em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1 Associado à Análise Econômica do Tratamento” está sendo realizado com o apoio do CNPq e tem como objetivos avaliar a

prevalência das complicações crônicas micro e macrovasculares nos portadores de DM1 brasileiros.

O papel da hiperglicemia na patogênese das complicações crônicas do DM foi bem estabelecido tanto no DM1 (17) quanto no DM tipo 2 (DM2) (18). Acredita-se que o risco de complicações seja modulado por determinantes como idade de início e duração do DM, presença de outros fatores de risco (hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e consumo de álcool), bem como pela susceptibilidade genética do indivíduo à lesão induzida pelas anormalidades metabólicas desencadeadas pela hiperglicemia crônica (19).

1.3 Mecanismos de lesão tecidual desencadeados pela hiperglicemia

Vários mecanismos são propostos para explicar o dano celular induzido pela alta concentração de glicose (glicotoxicidade). Os principais são: aumento da ativação da via dos polióis, da ativação da proteína cinase C (PKC) e da via da hexosamina e a formação dos produtos finais de glicação avançada. Em 2001, Brownlee propôs que existia um elemento unificador para as quatro vias deletérias acima citadas: maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (6) (Figura 1).

Figura 1. Estresse oxidativo como elemento unificador das quatro vias bioquímicas deletérias. Adaptado de Brownlee M, 2001 (6).

Na via dos polióis, o aumento da glicose intracelular resulta em sua conversão ao sorbitol pela aldose redutase. Essa enzima apresenta uma baixa afinidade (alto K_m) para a glicose e, em situações de normoglicemia, a metabolização da glicose por essa via corresponde a uma porcentagem muito pequena do uso global da glicose. Em condições de hiperglicemia, entretanto, o aumento da glicose intracelular resulta em sua conversão enzimática para sorbitol que, por sua vez, é oxidado à frutose pela enzima sorbitol desidrogenase. A redução da glicose ao sorbitol consome nicotinamida adenina difosfato (NADPH), um composto necessário para regeneração da glutathiona reduzida (GSH) pela enzima glutathiona redutase. Em consequência da diminuição das concentrações intracelulares de GSH, pode haver exacerbação do estresse oxidativo intracelular, mecanismo atualmente considerado o mais importante para explicar os efeitos deletérios associados à ativação da via dos polióis (6).

Já a ativação da PKC, que consiste em pelo menos onze isoformas, das quais nove são ativadas pelo segundo mensageiro diacilglicerol (DAG) resulta principalmente na alteração do fluxo sanguíneo secundário à diminuição da produção de óxido nítrico (NO) e aumento a atividade da endotelina-1; a alteração na permeabilidade vascular também ocorre secundariamente ao aumento da expressão de fatores de crescimento,

tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Esta via também aumenta a expressão do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI1), contribuindo para oclusão vascular e ativa o fator de transcrição NF-kB e a enzima NADPH oxidase, aumentando a resposta pró-inflamatória e o estresse oxidativo (6).

A glicose intracelular em excesso também é desviada para a via da hexosamina, onde é convertida à frutose-6-fosfato, que por sua vez é transformada a N-acetilglicosamina-6-fosfato pela enzima glutamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT). A N-acetilglicosamina-6-fosfato é, posteriormente, convertida a UDP-N-acetilglicosamina que modula a expressão de proteínas que funcionam como fatores de transcrição e que acabam por alterar a expressão de várias proteínas, tais como o PAI1 e o TGF- β , envolvidos na vasculopatia diabética (6).

A via de formação dos produtos finais de glicação avançada também está associada à geração de EROs e a efeitos deletérios que serão abordados a seguir.

1.4 Produtos finais de glicação avançada

A reação de glicação, Maillard ou de escurecimento é caracterizada pela ligação covalente não enzimática entre aldeídos redutores e grupos amino-terminais de cadeias polipeptídicas, fosfolípidos, ácidos nucleicos e resíduos de lisina e arginina das proteínas (20), resultando na formação de uma base de Schiff. Esta, por meio de rearranjos moleculares, converte-se a produto Amadori, uma cetoamina mais estável. A autooxidação da glicose e a degradação da base de Schiff e do produto Amadori geram oxoaldeídos, como metilglioxal (MGO), glioxal (GO), glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona (3-DG) (21). Estes oxoaldeídos são muito reativos e propagam

rapidamente a reação de glicação (Figura 2). Em consequência, forma-se uma gama de compostos heterogêneos, denominados produtos finais de glicação avançada (do inglês, *advanced glycation endproducts*, ou AGEs) que alteram irreversivelmente a estrutura de macromoléculas, comprometendo a sua função biológica (22).

Figura 2. Formação dos produtos finais de glicação avançada. Adaptado de Frye EB e cols., 1998 (21).

Os oxoaldeídos (também chamados aldeídos bifuncionais) podem ser gerados a partir da via glicolítica (23, 24), no metabolismo da frutose pela via do sorbitol (25) e também pela oxidação de certos aminoácidos como serina e treonina, de ácidos graxos poliinsaturados (26), metabolização de corpos cetônicos e reações inflamatórias que envolvem a ativação de mieloperoxidase (27).

A reação do GO e do MGO com arginina e lisina dá origem a resíduos protéicos bem caracterizados como carboximetil-lisina (CML) e o carboxietil-lisina. Tanto esses compostos quanto a pentosidina e a pirralina são os AGEs mais comumente encontrados em associação a proteínas circulantes e intracelulares, estando em maiores concentrações plasmáticas em portadores de complicações crônicas do DM (28), (29),

(30), (31). Não obstante, a grande heterogeneidade destes compostos torna difícil sua exata mensuração e, portanto, a determinação precisa de sua atuação na patogênese das complicações crônicas microvasculares do DM.

A formação da CML é irreversível, sendo este composto considerado um importante biomarcador do acúmulo do estresse oxidativo sofrido em determinado tecido (28). Estudos experimentais demonstram a maior concentração de CML na RD (32, 33). Entretanto, pouquíssimos estudos correlacionam a presença de complicações crônicas microvasculares do DM1 com as concentrações plasmáticas de CML.

Em um estudo em portadores de DM1, Miura e cols. não encontraram diferenças nas concentrações plasmáticas de CML quando foram comparados pacientes com diferentes graus de ND, exceto naqueles pacientes já em hemodiálise, que apresentavam maiores concentrações plasmáticas deste composto. No mesmo trabalho, também não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de pentosidina em pacientes com diferentes graus de RD (34).

Além da formação endógena, o tabaco é uma importante fonte exógena de produtos capazes de gerar AGEs. Trabalhos mostram maior quantidade de AGEs plasmático em fumantes quando comparados a não fumantes, independentemente do DM (35). Esses AGEs do tabaco acumulam-se principalmente nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), elevando o risco de complicações crônicas do DM (36).

Alimentos preparados em altas temperaturas e com grandes concentrações de açúcar são tidos como uma importante fonte exógena de AGEs (37). Apenas 10% dos AGEs consumidos são absorvidos no intestino, sendo que dois terços desses encontram-se na forma bioativa e o um terço restante é excretado em até 48 horas em pacientes com a função renal normal (38). Assim, a quantidade de AGEs circulantes é um balanço

entre a formação endógena e o consumo oral exógeno *versus* o catabolismo, incluindo a degradação tecidual e a eliminação renal (Figura 3) (39).

A detoxificação dos AGEs nos tecidos ocorre principalmente pelos sistemas antioxidantes endógenos, catalizada por enzimas como a glioxalase, a aldose redutase e a aldeído-desidrogenase (40). O tecido renal é um importante sítio de acúmulo de AGEs, uma vez que esse tecido é responsável pela depuração dos mesmos (10). Sabe-se que as células do túbulo proximal são as responsáveis por absorver e metabolizar os AGEs do filtrado glomerular (41).

Figura 3. Fatores que determinam as concentrações circulantes de produtos finais de glicação avançada (AGEs) em seres humanos. Adaptado de Uribarri J. e cols, 2005 (39).

Muitos estudos demonstram uma correlação positiva entre o consumo de AGEs na dieta e as concentrações plasmáticas desses compostos (38, 39). O índice de massa corpórea (IMC) também pode influenciar a quantidade de AGEs circulantes, já que o tecido adiposo também é responsável pelo catabolismo e degradação dos AGEs. Existe na literatura a descrição de uma correlação inversa entre o IMC e as concentrações

plasmáticas de CML (42, 43), já quando se leva em consideração a idade, a correlação é positiva (44).

A concentração de oxoaldeídos encontra-se aumentada na circulação de portadores de DM1 e de DM2, especialmente no período pós-prandial (22, 45-47). Além disso, esses oxoaldeídos também estão elevados em indivíduos urêmicos não diabéticos, em decorrência de falência na depuração renal de intermediários reativos da reação de glicação (48-50).

O acúmulo de AGEs nos tecidos está associado com o aparecimento das complicações vasculares diabéticas, tanto as microvasculares quanto as macrovasculares, e pelo menos três mecanismos explicariam essa associação: a glicação de proteínas da matriz extracelular, levando a alterações estruturais das proteínas com consequências tais como a diminuição na elasticidade dos vasos; a glicação de proteínas intracelulares, prejudicando a função celular e finalmente a interação dos AGEs com seus receptores, ativando vias de sinalização intracelular e, consequentemente, modulando a expressão gênica (51).

1.5 Receptores de AGEs

1.5.1 RAGE

Os AGEs interagem com os receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGEs), que são receptores multiligantes de superfície da família das imunoglobulinas. Esses receptores apresentam peso molecular de 35kDa, são expressos em inúmeros tipos celulares, como macrófagos, células mesangiais e endoteliais (52) e são codificados pelo gene *AGER*, que possui 11 éxons intercalados por 10 íntrons e está

localizado no cromossomo 6. O receptor RAGE possui três domínios extracelulares: um domínio tipo V, que é o sítio de ligação aos AGEs, e dois domínios tipo C. Além dos domínios extracelulares, o RAGE possui um domínio transmembrânico e outro citosólico C-terminal (3).

A internalização do complexo AGE/RAGE favorece vias de transdução de sinal que culminam com a geração de EROs (53). A consequente ativação do NF- κ B promove a transcrição de genes pró-inflamatórios e relacionados ao dano vascular, bem como o aumento da expressão do próprio RAGE (54-57). A cronicidade e a intensidade do estímulo podem favorecer diferentes vias de sinalização, envolvendo múltiplos efetores como p21ras, MAP cinases, PI3 cinase, cdc42/rac, Jak/STAT, NAD(P)H oxidase, entre outros (58). Em conjunto, há estímulos para uma resposta inflamatória crônica e vasoconstritora, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão (55), citocinas (interleucina [IL]-1, IL-6, fator de necrose tumoral- α [TNF- α]) (59-61) e endotelina-1 (62).

Sabe-se que a expressão de RAGE não é modulada apenas pelas concentrações de AGEs, mas também pela hiperlipidemia (63) e está aumentada no DM e na uremia (64). Em biópsia renal de portadores de DM2, encontrou-se maior expressão de RAGE nos podócitos de pacientes com ND (65). Ainda em portadores de DM2, observou-se que a expressão gênica do RAGE em células linfomononucleares correlaciona-se com as concentrações plasmáticas de AGEs (66).

O RAGE é expresso em praticamente todas as células da retina, mas sua maior expressão é nas células Müller, relacionadas principalmente com a sustentação. Acredita-se que hiperglicemia determine um aumento dos ligantes de RAGEs que, quando ativados, aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para o desenvolvimento da RD (67).

Em 2013, Juranek e cols. mostraram que portadores de DM2 com neuropatia diabética apresentavam maior expressão da proteína RAGE em biópsia de nervo periférico em comparação a com controles saudáveis não portadores de DM, achados que sugerem a participação desse receptor no desenvolvimento desta complicação microvascular (68). Outro grupo publicado em 2014 encontrou, em biópsia de pele de portadores de DM2, maior expressão gênica de RAGE nos pacientes acometidos pela forma grave de neuropatia periférica quando comparados aos acometidos pela forma leve ou sem neuropatia diabética (69).

Formas solúveis do RAGE podem ser encontradas na circulação: uma originada da clivagem do receptor total (sRAGE) e a outra originada do truncamento da porção C-terminal do domínio citosólico, dando origem ao RAGE solúvel secretado endogenamente (esRAGE). Ambos apresentam o domínio extracelular do receptor nativo, embora sejam desprovidos da porção transmembrânica e citoplasmática (70). Em decorrência, embora se liguem aos AGEs, são incapazes de transduzir sinal e, por isso mesmo, se contrapõem à ação do RAGE nativo, razão pela qual alguns autores acreditam que as forma solúveis do RAGE exercem um importante papel protetor no surgimento das complicações vasculares diabéticas (71).

De fato, a expressão de RAGE solúvel já foi descrita como diminuída em portadores de DM com complicações, hipertensão e doença arterial coronariana. Na doença renal crônica (DRC), a forma solúvel do RAGE encontra-se reduzida, o que teve valor preditivo para a doença cardiovascular nestes indivíduos (72).

Em portadores de DM tipo 2, observou-se uma maior expressão de RAGEs em células linfomononucleares e menores concentrações de RAGE solúvel no plasma em comparação a indivíduos controle não diabéticos (73). Em pacientes DM tipo 2,

também se observou que aqueles que tinham menores concentrações plasmáticas de sRAGE tinham maior tendência a formação de placas ateroscleróticas (74).

Entretanto, em 2015, Bakker e cols. verificaram que pacientes DM tipo 1 tinham maiores concentrações de sRAGE quando comparados a controles saudáveis (75). Ainda, pacientes portadores de DM1 sem história de doença cardiovascular foram acompanhados por 12 anos e aqueles que tinham maiores concentrações de RAGE solúvel tiveram maior incidência de evento cardiovascular. Além disso, o aumento do sRAGE correlacionou-se com a presença de ND (76). Deste modo, ainda não está totalmente esclarecido se as formas solúveis de RAGE de fato desempenham um papel protetor contra as complicações crônicas do DM.

Em fagócitos mononucleares isolados de pacientes portadores de DM, observou-se maior geração de ânion superóxido 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 deste receptor suprimiu o aumento de EROs (77).

Em 2014, Tripathi e cols. demonstraram que o acúmulo de AGEs e o aumento da expressão de RAGEs em células mononucleares está diretamente relacionado com o aparecimento de complicações diabéticas vasculares em portadores de DM tipo 2 (66).

1.5.2 AGER-1

A via de sinalização do RAGE é contraposta pelo receptor AGER-1, codificado pelo gene *DDOST*. O AGER-1 apresenta um peso molecular de 48 kDa e caracteriza-se por ser um receptor de membrana com um segmento simples transmembrânico e uma

longa cauda intracelular; esse receptor também é conhecido como oligosacariltransferase-48 (OST-48) (78).

O AGER-1 é considerado um receptor protetor, tendo em vista que suas principais funções são a de catabolismo dos AGEs para posterior excreção e a ativação de vias anti-inflamatórias. Em muitos estudos, ele é tido como o receptor responsável por manter a homeostase oxidativa intracelular (79).

A expressão de AGER-1 encontra-se diminuída em modelos animais de DM. A elevação de EROs, induzida pela hiperglicemia e pelos AGEs, favorece a ativação da via da AKT/proteína cinase B, a qual promove fosforilação do fator de transcrição FKHRL1 (*homologue of forkhead family members*) inativando-o. Isto culmina com uma redução na expressão de antioxidantes celulares, como a superóxido dismutase e a catalase, e no aumento da expressão de mediadores inflamatórios. A expressão de AGER-1 correlaciona-se inversamente com a toxicidade dos AGEs, graças à inibição da fosforilação do FKHRL1 e, portanto, estímulo à atividade antioxidante celular e redução de estresse inflamatório (80, 81).

A diminuição na expressão de AGER-1 em células mesangiais do córtex renal de modelos animais de DM contribui para um atraso na depuração de AGEs e uma deposição precoce desses produtos nos tecidos renais (82). Já o aumento da expressão de AGER-1 nessas mesmas células leva à inibição de vias estimuladas pela ligação de AGE-RAGE, como a fosforilação da MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) e a ativação do NF-kB, sugerindo que este receptor seja capaz de atenuar a toxicidade celular induzida pelos AGEs (78).

O AGER-1 bloqueia outras vias de sinalização, como as do receptor do fator de crescimento epitelial (EGF) e da ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), a expressão de p66, assim como seus efeitos oxidantes tanto *in vitro*, quanto *in vivo*,

sugerindo que há um mecanismo de interação entre o AGER-1 e a regulação de genes pró-oxidantes (83).

Outros receptores para AGEs incluem os da família *scavenger*, como SR-A e SR-BI, CD-36, FEEL-1 e 2, LOX-1, galectina e *receptor toll símile* (TLR) (84-86). As vias de sinalização suscitadas por tais receptores de superfície, após interação com os AGEs, não estão totalmente elucidadas. Não obstante, os AGEs aumentam a expressão de CD-36 e SR-A, os quais favorecem a captação de lipoproteínas modificadas por macrófagos arteriais e por células mesangiais.

Há poucos estudos na literatura abordando a expressão de receptores de AGEs em células de portadores de DM e sua correlação com as complicações crônicas. He e cols. demonstraram que portadores de DM1 com ND franca (caracterizada pela presença de proteinúria) e RD (*background* ou proliferativa) apresentavam menor expressão de AGE-R1 em células linfomononucleares em comparação a pacientes sem ND (normoalbuminúria) e com retinopatia mínima ou ausente. Neste mesmo trabalho, correlacionou-se a expressão de AGER-1 com os valores de AGEs no plasma e na urina (87).

Recentemente, Uribarri e cols. (88) demonstraram que portadores de DM tipo 2 recebendo uma dieta rica em AGEs apresentavam expressão suprimida de AGER-1 e de sirtuína em células linfomononucleares e que a restrição de AGEs na dieta reverteu este fenômeno, além de melhorar a sensibilidade à insulina, aumentar as concentrações plasmáticas de adiponectina e diminuir marcadores de inflamação e de estresse oxidativo. Esses resultados não apenas evidenciam o papel dos AGEs consumidos na dieta na piora da resistência à insulina e na supressão de mecanismos de proteção (AGER-1 e sirtuína-1) (88), como também sugerem que o estudo da expressão de moléculas associadas aos efeitos dos AGEs e a mecanismos de proteção celular (como a

sirtuína) em células linfomononucleares de portadores de DM pode ser um instrumento adicional para mensurar os efeitos deletérios da hiperglicemia e sua resposta à intervenções. Este trabalho também foi o primeiro a explorar a relação entre AGEs, AGER-1 e sirtuínas.

O receptor AGER-1 também tem a importante função de inibir vias de supressão da nicotinamida fosforibosiltransferase (NAMPT); essa enzima é responsável pela produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) intracelular e, desta maneira, relaciona-se positivamente com a expressão de sirtuína (89).

1.6 Sirtuína-1

As sirtuínas são enzimas desacetilases dependentes de NAD, de peso molecular de 120 kDa que se localizam predominantemente no compartimento nuclear e que modulam o silenciamento transcricional de regiões selecionadas do genoma pela regulação da via de desacetilação das histonas e de outras proteínas citosólicas. As sirtuínas possuem quatro regiões bem estabelecidas: o domínio amino-terminal; o domínio carboxi-terminal; o sítio alostérico e o núcleo catalítico (90).

O silenciamento transcricional promovido por essa enzima ocorre por meio da desacetilação de proteínas histônicas e possibilita a modificação na estrutura da cromatina, estando envolvida na regulação do metabolismo lipídico e glicêmico, do ritmo circadiano, da biogênese mitocondrial e das respostas à apoptose e ao estresse (91).

Yacoub e cols. mostraram que a sirtuína 1 também é capaz de diminuir a expressão da p66, que tem um importante papel na promoção do estresse oxidativo, senescência e apoptose, por desacetilação da histona H3 do promotor do gene que codifica esta

proteína; entretanto a sirtuína 1 tem sua expressão diminuída em condições de estresse metabólico crônico, hipóxia, DM, entre outras doenças (92).

Outros autores também mostraram que a expressão e a ativação da sirtuína 1 podem ser influenciadas por diversas condições celulares, como: restrição calórica, exercício e estresse oxidativo (93). Na restrição calórica ou jejum, por exemplo, ocorre o aumento da expressão da sirtuína em alguns tecidos, como: cérebro, músculo e fígado, sugerindo que seus efeitos na homeostase glicêmica sejam modulados por fatores tecido-específico (94). A sirtuína 1 protege do estresse oxidativo por meio da ativação da FOXO (*forkhead transcription factors*), do aumento da atividade da catalase e da inibição da apoptose induzida pelo p53 (95).

As sirtuínas também desempenham um papel importante em processos de envelhecimento e na patogênese de diversas doenças degenerativas (96) e já se demonstrou que estão diminuídas em linfócitos de portadores de DM tipo 2, concomitantemente ao aumento do estresse oxidativo, embora não se saiba o significado dessa alteração (97).

A atividade da sirtuína 1 relaciona-se com a sensibilidade à insulina. A capacidade da sirtuína 1 de melhorar a sensibilidade à insulina em modelos animais de DM tipo 2 deve-se ao fato dessa enzima inibir a gliconeogênese e fatores inflamatórios (93).

Longos períodos de hiperglicemia podem ocasionar uma memória metabólica, que cursa com diminuição da expressão de sirtuína 1 e resulta em respostas inflamatórias, como a ativação da via do NF-kB e aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bax*, ambos ligados às complicações microvasculares diabéticas (98). Portadores de DM tipo 2 com mau controle glicêmico apresentam menor expressão de sirtuína 1 quando comparados àqueles com um bom controle glicêmico, reiterando a importância do bom

controle glicêmico na prevenção do desenvolvimento das complicações microvasculares (99).

Um estudo experimental mostrou que a diminuição da expressão da sirtuína pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de complicações macrovasculares diabéticas (100) e, em pacientes com DM tipo 2, a diminuição da expressão desta enzima desacetilase correlacionou-se com maior formação de placas ateroscleróticas (101),

A diminuição da expressão de sirtuína 1 no DM pode ser um fator crucial para o desenvolvimento da ND; em estudos experimentais foi visto que essa enzima pode aumentar a expressão de claudinas, que são proteínas transmembrânicas que unem os podócitos, sendo, portanto, importantes componentes das “*tight junctions*”. Contudo, a superexpressão das claudinas está relacionada ao aumento da permeabilidade glomerular, causando albuminúria e desempenhando um papel patogênico na ND. Assim, a sirtuína parece participar de respostas epigenéticas que ocorrem no desenvolvimento de complicações microvasculares (102).

Postula-se que a diminuição da expressão do AGER-1 e de sirtuína 1 nas células linfomononucleares de portadores de DM esteja relacionada ao aumento do estresse oxidativo e que a função normal da sirtuína 1 possa depender da habilidade do AGER-1 em controlar os AGEs (88).

1.7 Proteína de interação com a tioredoxina (TXNIP)

A indução de vias pró-oxidantes deletérias pela hiperglicemia já está bem estabelecida, assim como o aumento da geração de EROs em pacientes diabéticos (6).

Neste contexto, a capacidade do indivíduo de ativar fatores de proteção endógenos está intimamente relacionada ao desenvolvimento de complicações microvasculares (103).

Dentre os sistemas antioxidantes endógenos, o sistema da tiorredoxina (TXN) vem sendo amplamente estudado e correlacionado com o DM. Este sistema é formado pela tiorredoxina 1 (TXN1) que é citosólica, tiorredoxina 2 (TXN2), que é mitocondrial, pela tiorredoxina redutase e pela proteína de interação com a tiorredoxina (TXNIP) (104).

A TXN é uma proteína pequena de 12 kDa com atividade redox, sendo mantida no estado reduzido pela tiorredoxina redutase, numa reação dependente de NADPH. Quando necessário, ela atua na doação de elétrons, contribuindo assim para atividade antioxidante intracelular (Figura 4) (104).

Figura 4. Sistema antioxidante endógeno da Tiorredoxina. (TXN). TXNIP: proteína de interação com a tiorredoxina. Adaptado de Maulik N e cols., 2008.

A TXNIP é uma proteína inibidora da atividade da TXN que prejudica a função antioxidante intracelular e consequentemente, aumenta a geração de EROs (105). Entretanto, estudos nesta última década demonstraram funções metabólicas importantes

dessa proteína, como a de sensor da glicose plasmática: a hiperglicemia induziria o aumento da expressão da TXNIP o que favoreceria a diminuição da captação de glicose intracelular via inibição do GLUT1 (transportador de glicose independente de insulina); para contrabalançar, a insulina liberada em resposta às altas concentrações de glicose plasmática aumentaria a captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina e também diminuiria a expressão de TXNIP (106, 107).

Há muitos estudos na literatura que relacionam o papel pró-inflamatório e pró-apoptótico da TXNIP com o desenvolvimento do DM1 e do DM tipo 2, assim como das complicações diabéticas. Nas células β -pancreáticas, o aumento da expressão da TXNIP determinado pela hiperglicemia ativa o inflamassomo NLRP3, um complexo multiprotéico que contém caspase 1; quando ativado, o NLRP3 resulta no processamento da pró-interleucina 1 β em interleucina 1 β madura e consequente apoptose das células β . Desta forma, o aumento da TXNIP é considerado o elo entre a hiperglicemia e a perda de massa de células β , explicando o fenômeno conhecido como glicotoxicidade (108). Ainda, tanto em cultura de podócitos humanos quanto no lisado glomerular de ratos diabéticos, a ativação do inflamassomo NLRP3 pela TXNIP relacionou-se com o desenvolvimento da ND (109).

Já foi observado que o aumento da expressão da TXNIP ativa genes pró-inflamatórios em células endoteliais da retina e sua inibição foi capaz de evitar o aparecimento precoce de RD em camundongos (110, 111).

A TXNIP também é capaz de induzir a expressão de RAGE, mediando a inflamação via aumento da expressão de ciclooxigenase (Cox), VEGF e ICAM desencadeados por pela ativação desse receptor em células endoteliais dos capilares da retina. Como a hiperglicemia induz a expressão da TXNIP, se estabelece um ciclo que sustenta a expressão de genes pró-inflamatórios responsáveis pela lesão do endotélio e

consequentemente, pela progressão das complicações microvasculares do DM (111). Por outro lado, a indução de TXNIP pelos RAGEs parece ser importante para o reparo de nervos periféricos lesados, pois se observou que logo após uma lesão neuronal há liberação da proteína S100, que é ligante do receptor RAGE. Nestas condições, a ativação desse receptor promove um aumento transitório na expressão de TXNIP, seguido por uma redução aproximadamente 15 dias após a lesão, observado em cultura primária de células de Schwann. Neste trabalho os autores sugerem que o papel da TXNIP ativada via RAGE é fundamental para o controle da resposta pró-inflamatória necessária para o reparo da lesão neural (112).

Os AGEs são importantes contribuintes das complicações crônicas do DM. Nossa hipótese é que a alteração no balanço entre a expressão de seus dois principais receptores, RAGE e, AGER-1, bem como a alteração na expressão de TXN, TXNIP e de sirtuína 1 em células linfomononucleares, possa refletir o grau de complicações crônicas microvasculares. A confirmação desta hipótese abre a possibilidade de avaliação da expressão desses marcadores em células de fácil obtenção no monitoramento de intervenções que visem retardar a gênese e a evolução das complicações crônicas.

2. OBJETIVOS

Avaliar, em portadores de DM1, a associação de três complicações crônicas microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia autonômica cardiovascular) com:

- a expressão gênica de *AGER*, *DDOST*, *TXN*, *TXNIP* e *SIRT1* em células linfomononucleares de sangue periférico;
- as concentrações sanguíneas de GSH, um importante antioxidante;
- as concentrações plasmáticas de um marcador de estresse oxidativo, TBARS (*Thiobarbituric acid reactive substances*, um marcador de peroxidação lipídica) e
- as concentrações plasmáticas de CML, um AGE.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização clínica e laboratorial dos portadores de DM1

Todos os portadores de DM1 incluídos nesse estudo são acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Um total de 26 indivíduos controles saudáveis (80% do sexo feminino, idade mediana de 30 anos, variando de 23 a 60 anos) também foi incluído no estudo.

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A) e da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), os pacientes e controles saudáveis foram submetidos à coleta de sangue periférico. Nos indivíduos controles saudáveis, o sangue foi utilizado para a extração de RNA, enquanto nos pacientes portadores de DM1 o sangue foi utilizado para a extração de RNA e para mensuração das seguintes variáveis bioquímicas:

- glicemia de jejum (método enzimático Hexoquinase);
- hemoglobina glicada (HbA1c) (cromatografia líquida de alta performance, HPLC);
- colesterol total e colesterol HDL (método enzimático colorimétrico automatizado);
- LDL colesterol (método cinético automatizado);
- triglicérides (método enzimático colorimétrico automatizado);
- vitamina B12 (método eletroquimioluminescente);
- creatinina plasmática (método colorimétrico automatizado).

Clinicamente, os pacientes foram caracterizados quanto ao peso corpóreo, altura, índice de massa corpórea (IMC), idade atual, idade ao diagnóstico, tempo de DM,

presença de hipertensão arterial, dislipidemias, uso de medicamentos e presença de complicações diabéticas microvasculares: RD, ND e neuropatia autonômica cardiovascular (NAC).

Não foram incluídos no estudo portadores de DM1 fumantes.

As complicações microvasculares foram avaliadas e classificadas conforme descrito abaixo:

Acometimento renal:

A razão albumina/creatinina urinária (ACR) foi utilizada para definir os estágios de ND. Ausência de ND foi definida como ACR <30 mg/g de creatinina (normoalbuminúria); ND incipiente foi definida como microalbuminúria persistente (ACR 30 – 300 mg/g de creatinina); ND franca foi definida como macroalbuminúria atual ou em algum período da vida (ACR >300 mg/g de creatinina). A ACR foi medida em amostras isoladas de urina com o uso da metodologia de nefrolometria em ao menos duas amostras coletadas nos seis meses prévios à consulta.

A taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) também foi avaliada nos pacientes, calculada pela fórmula CKD-EPI (113).

Para a análise dos dados, os pacientes foram divididos em: ausência de ND (pacientes normoalbuminúricos) *versus* presença de ND (pacientes com micro ou macroalbuminúria). Uma análise adicional foi realizada excluindo-se os pacientes com microalbuminúria e considerando apenas pacientes com normoalbuminúria (ausência de ND) *versus* pacientes com macroalbuminúria ou doença renal crônica terminal (DRCT, presença de ND). Os pacientes também foram analisados quanto a TFGe, divididos em: <60 mL/ min/1,73m² *versus* ≥60 mL/ min/1,73m².

Acometimento retiniano:

A retina dos pacientes foi avaliada com o uso do retinógrafo (TOPCOM TRC-NW8) após dilatação da pupila com três gotas de colírio de tropicamida (10 mg/mL); foram observados e fotografados sete planos (disco ótico, mácula, lateral temporal à mácula, súpero-nasal, temporal ao disco ótico, ínfero-temporal e nasal ao disco ótico). As imagens da retina foram avaliadas por um único oftalmologista treinado e capacitado para classificar a RD conforme a *International Clinical Classification of Diabetic Retinopathy* (114):

- **RD não Proliferativa Leve:** apenas presença de microaneurismas;
- **RD não Proliferativa Moderada:** presença de microaneurismas, exudatos e/ou micro hemorragias. Menos eventos que a RD não proliferativa grave;
- **RD não Proliferativa Grave:** Presença de mais de 20 hemorragias intrarretinianas em cada um dos quatro quadrantes; “ensalsichamento” venoso em pelo menos dois quadrantes; anormalidades microvasculares intrarretinianas (IRMAs) em pelo menos um quadrante;
- **RD Proliferativa:** Presença de neovascularização, hemorragia vítrea ou hemorragia pré-retiniana.

Nos casos em que os pacientes apresentavam evidências de procedimento oftalmológico que tornou impossível a classificação pelas fotos feitas com o retinógrafo, o prontuário oftalmológico foi revisado e o laudo obtido com base nestes dados.

Para a análise dos dados, os pacientes foram agrupados da seguinte maneira: sem RD ou RD não proliferativa leve *versus* RD não proliferativa moderada, grave ou RD proliferativa.

Acometimento do Sistema Nervoso Autônomo Cardiovascular:

O exame de análise espectral foi realizado para a avaliação do grau de NAC. Três índices foram extraídos da análise espectral a partir das variações espontâneas da variabilidade da frequência cardíaca de repouso:

- **Atividade parassimpática refletida pelo índice HF** (alta frequência; Variabilidade da frequência cardíaca [VFC] de alta frequência) – relacionado com arritmia sinusal;
- **Atividade simpática refletida pelo índice VLF** (muito baixa frequência, VFC de muito baixa frequência) – relacionado ao controle da termorregulação e da sudorese;
- **Controle simpático com a modulação vagal refletida pelo índice LF** (baixa frequência, VFC de baixa frequência) – relacionado ao reflexo barorreceptor.

Em seguida são feitas três manobras para estudo de reflexos cardiovasculares, conhecidas como testes de Ewing: manobra de respiração profunda, manobra de Valsalva e manobra de levantar-se (teste ortostático). O sétimo e último índice é a medida da queda de pressão arterial sistólica após três minutos em pé, que deve ser inferior a 20 mmHg.

No caso de alteração de mais de uma análise dentre as sete realizadas, faz-se o diagnóstico de NAC; considera-se a NAC incipiente quando dois testes estão alterados, NAC instalada quando três testes estão alterados e ainda, caso haja hipotensão ortostática além de três testes alterados é diagnosticada NAC grave (Figura 5). Para a análise dos dados, os pacientes foram divididos da seguinte maneira: sem NAC *versus* com NAC.

	Sem NAC	NAC incipiente	NAC instalada	NAC grave
Testes Alterados	0 ou 1	2	3	>3 e/ou HO

Figura 5. Representação dos critérios para diagnóstico de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC). HO, hipotensão ortostática. Fonte: Adaptado de Rolim e cols., 2008c (115).

3.2 Obtenção das células linfomononucleares

O sangue periférico dos pacientes diabéticos e dos controles foi colhido em um tubo contendo EDTA e em quatro tubos BD Vacutainer CPT (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), específicos para separação de células linfomononucleares, que se baseia na extração pelo método do Ficoll, descrito por Boyum (1968) (116).

Logo após a coleta, o tubo contendo EDTA foi colocado a 4°C para dosagem de glutathiona (GSH) e as amostras nos tubos BD Vacutainer CPT foram centrifugadas em temperatura ambiente por 30 min a 1.700 RCF a 20°C. O plasma foi separado e aliqotado, sendo congelado a -80°C para as análises de TBARS e de CML. A fase que contém os linfócitos e monócitos foi separada em tubo à parte e as células foram lavadas quatro vezes com tampão fosfato-salino (PBS) com EDTA, pH 7,4, seguido por centrifugação de 10 min a 300 RCF. Foi feita também uma lavagem das células com

água destilada para romper as hemácias residuais e a adição de PBS para uma nova centrifugação de 300 RCF durante 10 min a 20°C. As células de cada paciente foram separadas para extração de RNA total para estudo da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-qPCR).

3.3 Avaliação dos marcadores de peroxidação lipídica (TBARS)

A concentração de TBARS foi determinada como indicativa de peroxidação lipídica plasmática, por método colorimétrico. Duzentos microlitros de plasma foram diluídos em 800 µL de água destilada. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17,5%, e, a seguir, 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6%, pH 2,0. As amostras foram colocadas em banho de água fervente por 15 min e a seguir resfriadas. Após este procedimento, foi adicionado às amostras 1 mL de TCA 70%, com incubação por 20 min. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 2.000 rpm e a densidade óptica do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 543 nm contra reagente branco.

A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada, utilizando-se coeficiente de extinção molar equivalente para malonildialdeído (equivalentes de MDA) de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (utilizado para o complexo malonildialdeído e ácido tiobarbitúrico). A concentração de TBARS no plasma é expressa em nmol/mL.

3.4 Avaliação das concentrações de GSH

A GSH foi determinada no sangue total colhido no tubo de EDTA pelo método descrito por Sedlak e Lindsay (1968) (117). O sangue total foi processado pela adição de ácido metafosfórico 5% e centrifugado a 14.000g por 10 min. O ensaio consiste na

reação do sobrenadante do sangue total com o reagente de Ellman's, formando um pigmento amarelo que é mensurado no espectrofotômetro em 412 nm. A GSH foi quantificada pela média da curva padrão de cisteína e expressa em $\mu\text{mol/mL}$ (118).

3.5 Extração, avaliação da integridade e quantificação do RNA total das células linfomononucleares

A extração do RNA total de um quarto das células linfomononucleares foi realizada com o uso do reagente Trizol (Life Technologies, Grand Island, EUA) e do estojo comercial *RNeasy mini kits* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções dos fabricantes. O *RNeasy mini kit* permite a extração de moléculas de RNA por meio de sua adesão à membrana de sílica da coluna e dispensa o tratamento com DNase, pois a membrana remove eficientemente a maior parte do DNA contaminante.

Para avaliar a quantidade e a integridade do RNA total foi utilizado o aparelho NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) adotando a relação 260/280 para avaliação da pureza do RNA e ainda, foi corrido um gel de agarose a 1% corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia) para confirmar a integridade do material.

A concentração média do RNA total obtido das células linfomononucleares de sangue periférico dos 150 pacientes incluídos no estudo e dos 26 controles coletados foi de 150 ng/ μL e todas as amostras apresentaram uma relação 260/280 maior que 1,95.

A confirmação da integridade do material foi feita por corrida em gel de agarose com a visualização das bandas correspondentes às frações 28S e 18S do RNA ribossomal (Figura 6).

Figura 6. Gel de agarose a 1% representativo de amostras de RNA total extraídas de células linfomononucleares de sangue periférico de portadores de DM1.

Para validação do método anterior, algumas amostras foram escolhidas ao acaso e analisadas com o estojo comercial RNA 6000 Nano da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha) no equipamento *Bioanalyser* (119), para a confirmação de que o processo de extração está realmente adequado para utilização das amostras na realização do ensaio de expressão gênica, sem contaminação com DNA genômico. A Figura 7 mostra o resultado de uma das amostras verificadas no equipamento *Bioanalyser*; pode-se observar um RIN (*RNA integrity number*) de 9,4, o que evidencia a boa qualidade do método de extração de RNA empregado.

Figura 7. Amostra de RNA de alta qualidade, conforme evidenciado pelo valor do *RNA integrity number* = 9,4 e pela ausência de contaminação com DNA genômico após análise no equipamento *Bioanalyser*.

3.6 Avaliação quantitativa da expressão dos genes alvo por RT-qPCR:

Para a avaliação da expressão dos genes alvo por RT-qPCR, foi feita a conversão de RNA em DNA complementar (cDNA) utilizando o estojo comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies) em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante, numa concentração inicial de 500 ng de RNA total/reação.

O cDNA foi diluído em 100 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e 2 µL deste cDNA diluído foram utilizados na reação de PCR em tempo real para cada gene, em duplicata, no aparelho *StepOnePlus Real Time PCR System* (Life Technologies).

Para realização dos experimentos de expressão dos genes *DDOST* (codifica o AGER1), *AGER* (codifica o RAGE), *SIRT1* (codifica a sirtuína 1), *TXN* e *TXNIP* nas células linfomononucleares por RT-qPCR, foram escolhidas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Life Technologies). As sondas para expressão gênica selecionadas foram: Hs00193263_m1 (*DDOST*), Hs00542584_g1 (*AGER*), Hs01555214_g1 (*TXN*), Hs01006900_g1 (*TXNIP*) e Hs01009005_m1 (*SIRT1*). Todas são consideradas pelo fabricante como de melhor cobertura, pois amplificam regiões de junções exônicas, a fim de reduzir o impacto da contaminação por DNA genômico.

Após a definição das sondas dos genes-alvo, foi realizado um primeiro estudo piloto de expressão quantitativa com os genes *DDOST*, *AGER*, *TXNIP* e *SIRT1* e com três genes candidatos a controles internos da reação utilizados na literatura: *ACTB* (codifica a β -actina, Hs01060665_g1), *B2M* (codifica a β -2 microglobulina, Hs00984230_m1) e *HPRT1* (codifica a hipoxantina fosforibosiltransferase 1, Hs02800695_m1) (120-122).

Neste estudo piloto foram avaliadas amostras de RNA obtidas de células linfomononucleares de pacientes DM1 (n= 6) e de indivíduos controles não diabéticos (n=3) para a verificação de qual dos três genes apresentaria a menor variabilidade. Ao analisarmos os resultados da expressão gênica no programa *Genorm*, encontramos que a *B2M* e o *ACTB* foram os genes mais estáveis em células linfomononucleares (Figura 8). Sendo assim, optamos por utilizar uma média dos valores obtidos para cada um desses genes para avaliarmos a expressão dos genes-alvo.

Os resultados de expressão foram analisados pelo método de quantificação relativa (Ct, *cycle threshold*) com normalização pelo valor médio dos dois genes controle interno, utilizando-se a fórmula (123):

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene-alvo} - \text{média do Ct dos genes } B2M \text{ e } ACTB$$

Sendo que o Ct gene-alvo e Ct do controle interno correspondem à média dos valores de Ct das duplicatas. Após o cálculo, foi feita a fórmula de expressão normalizada: $2^{-\Delta Ct}$. Antes de realizar as análises estatísticas, a média da expressão dos controles saudáveis foi utilizada como sendo a amostra balizadora na expressão $2^{-\Delta \Delta Ct}$ (124). Os valores de expressão gênica foram transformados em $\log_{10}$.

As curvas de amplificação dos genes: *DDOST*, *AGER*, *SIRT1*, *TXN*, *TXNIP*, *B2M* e *ACTB* estão apresentadas no Anexo C.

Figura 8. Estabilidade dos genes *B2M*, *ACTB* e *HPRT1* obtida pelo programa Genorm a partir dos resultados de expressão gênica de um experimento piloto em seis portadores de DM1 e em três controles saudáveis não diabéticos.

3.7 Dosagem das concentrações plasmáticas de CML:

As concentrações plasmáticas de CML foram obtidas com o uso do estojo comercial *CircuLex CML/N^c-(Carboxymethyl)lysine ELISA* seguindo as orientações do fabricante.

Este estojo baseia-se em um teste de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) por competição, pois os anti-CML das amostras competirão com os anticorpos monoclonais anti-CML MK-5A10 do fabricante pelo antígeno CML-BSA que é previamente aderido à placa. É necessária a realização de uma curva-padrão de diluição com concentrações conhecidas de anti-CML para parear com os valores de absorbância. Neste estojo comercial, o valor de absorbância é inversamente proporcional à concentração de CML dosada.

Obtivemos as concentrações plasmáticas de CML depois de “plotar” os valores de absorbância e de concentração da curva-padrão de diluição em uma Curva de Lowess.

3.8 Avaliação do consumo oral de AGEs

Em um subgrupo de 30 pacientes, foi realizado o recordatório alimentar dos três dias anteriores ao dia da coleta de sangue para a quantificação do AGEs consumido na dieta. O cálculo foi baseado no guia de Uribarri e cols. (125).

3.9 Análise Estatística

As análises foram realizadas no *software* JMP (SAS Institute). Os resultados estão expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartilico. As variáveis foram testadas com relação a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e as diferenças entre os grupos foram analisadas pelo Teste de Mann-Whitney. As correlações entre as variáveis contínuas foram avaliadas pelos testes de correlação de Spearman.

O teste de ANCOVA também foi utilizado para comparação dos grupos, sempre ajustado para HbA1c, sexo, idade, duração do DM e presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS). Nas análises por complicação, também se realizou o ajuste para a TFG_e, exceto nas análises para a ND.

A curva de característica de operação do receptor (ROC) foi feita no programa SPSS, para a avaliação da especificidade e da sensibilidade da expressão normalizada dos genes-alvo, e ainda, para obtenção do valor de “*cut-off*” para posterior realização do *heatmap*.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica e laboratorial dos portadores de DM1

Foram coletadas amostras de sangue de 150 portadores de DM1, os quais foram classificados em dois grupos distintos: Grupo A, de pacientes sem complicações crônicas microvasculares e/ou com RD não proliferativa leve e Grupo B, de pacientes com alguma outra forma de complicação microvascular.

Conforme demonstrado na Tabela 1, as únicas características que diferiram significativamente entre os dois grupos foi a maior duração do DM e a maior frequência de HAS no Grupo B, o que provavelmente reflete a alta frequência de ND no Grupo B.

Tabela 1. Caracterização clínica e laboratorial dos portadores de DM1 incluídos no estudo.

	Grupo A n=68	Grupo B n=82	p
Sexo	42M /26H	52M /30H	n/s
Idade (anos)	33 (27 – 39)	34 (30 – 42)	n/s
IMC (kg/m²)	24,7 (22,9 – 28,3)	24,6 (21,1 – 27,6)	n/s
Duração do DM (anos)	19 (15 – 25)	22 (16 – 30)	0,03*
Idade ao diagnóstico (anos)	12 (9 – 19)	11 (6 – 17)	n/s
Hb1Ac média (%)	8,11 (7,28 – 8,83)	8,21 (7,18 – 9,78)	n/s
Glicemia de jejum (mg/dL)	195 (112 – 261)	165 (132 – 282)	n/s
HDL-colesterol (mg/dL)	59 (46 – 74)	56 (43 – 68)	n/s
LDL-colesterol (mg/dL)	93 (80 – 105)	86 (70 – 105)	n/s
Colesterol total (mg/dL)	170 (149 – 184)	162 (139 – 188)	n/s
Triglicérides (mg/dL)	75 (55 – 94)	85 (57 – 105)	n/s
Hipertensão Arterial (%)	20	40	0,03*
Dislipidemia (%)	20	26	n/s
Pacientes com nefropatia (%)	0	51	n/a
Pacientes com retinopatia (%)	48,5	59	n/a
Pacientes com NAC			
Incipiente	0	23	n/a
Instalada		21	

Variáveis contínuas expressas pela mediana e intervalo interquartilico; variáveis categóricas expressas em porcentagem. *diferença significativa; IMC: índice de massa corpórea; NAC: neuropatia autonômica cardiovascular; n/s – não significativa; n/a – não se aplica.

4.2 Avaliação da GSH e do TBARS

As medidas de GSH e de TBARS aferidas no sangue total e no plasma, respectivamente, não foram diferentes entre os Grupos A e B. Os valores de GSH e de TBARS apresentaram uma correlação inversa, com o ρ de Spearman igual a 0,7984 e $p < 0,0001$ (Gráfico 1).

Gráfico 1. Correlação entre os valores das Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticos e de glutathiona (GSH) sanguíneos nos pacientes portadores de DM1. Valor de ρ Spearman=0,7984 e $p < 0,0001$.

4.3 Avaliação da expressão dos genes-alvo por RT- qPCR

4.3.1 Controles x DM1

A expressão dos genes alvo: *DDOST*, *AGER*, *TXN*, *TXNIP* e *SIRT1* foi comparada entre o grupo de portadores de DM1 e o grupo controle saudável. Na Figura 9, é possível observar a menor expressão relativa do *DDOST* (*AGER1*) no grupo de portadores de DM1 em relação ao grupo controle ($p=0,01$).

Figura 9. Expressão relativa do RNA mensageiro de *DDOST* (AGER1) nos portadores de DM1 (n=150) *versus* o grupo controle (n=26). A linha horizontal representa o valor da mediana da expressão.

O grupo de portadores de DM1 apresentou uma maior expressão relativa de *TXNIP* e de *TXN* em relação ao grupo controle ($p=0,01$ e $p=0,005$, respectivamente) (Figuras 10 e 11, respectivamente).

Figura 10. Expressão relativa do RNA mensageiro de *TXNIP* nos portadores de DM1 (n=150) *versus* o grupo controle (n=26). A linha horizontal representa o valor da mediana da expressão.

Figura 11. Expressão relativa do RNA mensageiro de *TXN* nos portadores de DM1 (n=150) *versus* o grupo controle (n=21). A linha horizontal representa o valor da mediana da expressão.

As expressões relativas dos genes *AGER* (RAGE) e *SIRT1* não diferiram entre os portadores de DM1 e os controles saudáveis (Figura 12 e 13, respectivamente).

Figura 12. Expressão relativa do RNA mensageiro de *AGER* (RAGE) nos portadores de DM1 (n=150) *versus* o grupo controle (n=26). A linha horizontal representa o valor da mediana da expressão.

Figura 13. Expressão relativa do RNA mensageiro de *SIRT1* nos portadores de DM1 *versus* o grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana da expressão.

A plotagem dos valores de expressão relativa dos genes-alvo na Curva ROC foi realizada para que se pudesse avaliar a especificidade e a sensibilidade da expressão relativa de cada gene-alvo na diferenciação de portadores de DM1 de controles saudáveis (Figura 14).

Figura 14. Curva ROC da expressão relativa dos genes-alvo: *DDOST*, *AGER*, *SIRT1*, *TXN* e *TXNIP* no grupo controle *versus* grupo DM1. A linha amarela representa 50% de especificidade e de sensibilidade. *Asymptotic Sig* = *asymptotic significance*.

De acordo com a Figura 14, a expressão relativa dos genes-alvo *TXNIP*, *DDOST* (*AGER1*), *TXN* e *AGER* apresentam um desempenho satisfatório, pois têm significância menor que 0,5 (*asymptotic significance*), ou seja, a expressão relativa desses genes tem maior poder de discriminar entre portadores de DM1 e controles saudáveis do que a ocorrência do evento ao acaso. Baseado na Curva ROC, foi calculado o valor de *cut-off* da expressão relativa dos genes-alvo (ponto que apresenta maior soma entre especificidade e sensibilidade) para a configuração do *heatmap* apresentado na Figura

15, demonstrando a expressão de todos genes-alvo em cada um dos indivíduos estudados.

Figura 15. *Heatmap* da expressão relativa dos genes-alvo: *DDOST*, *AGER*, *SIRT1*, *TXNIP* e *TXN* no grupo de portadores de DM 1 e no grupo controle. Sendo que a cor vermelha representa maior expressão relativa e a cor verde representa menor expressão relativa dos genes.

4.3.2 Portadores de DM1

Nas análises de expressão relativa nos portadores de DM1, inicialmente eles foram analisados em dois grupos distintos já caracterizados na Tabela 1 (Grupo A - pacientes sem nenhuma complicação microvascular e/ou com RD não proliferativa leve (n=70) e Grupo B - pacientes com outras formas de RD e/ou outras complicações microvasculares (n=80). Posteriormente, os pacientes foram analisados por complicação microvascular.

A expressão relativa de *TXNIP* foi maior nos Grupos A e B em relação ao grupo controle, como se pode observar na Figura 16.

Figura 16. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXNIP* no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

A expressão relativa de *TXN* foi maior nos Grupos A e B em relação ao grupo controle, como se pode observar abaixo.

Figura 17. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXN* no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Não houve diferenças significantes na expressão relativa dos genes-alvo *AGER* (RAGE), *DDOST* (AGER1) e *SIRT1* na comparação ajustada pela HbA1c, idade, tempo de DM e presença de HAS entre os Grupos A, B e grupo controle (Anexo D).

Os resultados das análises da expressão gênica por complicação diabética microvascular estão apresentados a seguir.

Retinopatia Diabética (RD)

Os pacientes DM1 com a presença de RD não proliferativa moderada/grave ou RD proliferativa (n=47) e os pacientes com a ausência de RD ou com RD não proliferativa leve (n=99) apresentaram maior expressão relativa do gene *TXNIP* (p=0,01 e p=0,0006, respectivamente) e também do gene *TXN* (p=0,01 e p=0,03, respectivamente) quando comparados aos controles (Figura 18 e 19 - respectivamente). Em relação aos genes *AGER*, *DDOST*, *TXN* e *SIRT1*, não houve diferença significativa entre os grupos (Anexo E).

Figura 18. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXNIP* nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve (n=99), no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) (n=47) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura 19. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXN* nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve (n=99), no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) (n=47) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Neuropatia autonômica cardiovascular (NAC)

Os portadores de DM1 com ausência de NAC (n=104) e com presença de NAC (n=46) apresentaram maior expressão relativa de *TXNIP* e *TXN* em comparação ao grupo controle (Figura 20 e 21).

Figura 20. Expressão relativa do RNA mensageiro de *TXNIP* nos portadores de DM1 com ausência (n=104) ou presença (n=46) de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura 21. Expressão relativa do RNA mensageiro de *TXN* nos portadores de DM1 com ausência (n=104) ou presença (n=46) de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Em relação aos genes *DDOST*, *AGER* e *SIRT1*, não houve diferença significativa entre os grupos (Anexo F).

Nefropatia Diabética (ND)

Em relação à ND, os portadores de DM1 com a presença de ND (n=44) apresentaram menor expressão relativa do gene *DDOST* (AGER1) quando comparados ao grupo controle e ao grupo sem ND (normoalbuminúricos) (n=106) (Figura 22).

Figura 22. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *DDOST* (AGER1) nos portadores de DM1 com ausência (n=106) ou presença (n=44) de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

A curva ROC mostra que a expressão relativa do *DDOST* tem maior poder de discriminar entre portadores de DM1 a presença de ND do que a ocorrência do evento ao acaso, visto que a curva tem significância menor que 0,5 (*asymtotic significance*) (Figura 23).

Figura 23. Curva ROC da expressão relativa do *DDOST* no grupo ausência de ND *versus* presença de ND. A linha verde representa 50% de especificidade e de sensibilidade.

Os portadores de DM1 sem ND (normoalbuminúricos) apresentaram maior expressão relativa do gene *TXNIP* e do *TXN* quando comparados ao grupo controle; não se observou diferença entre os grupos com e sem ND ou entre o grupo controle e o grupo com presença de ND para o gene *TXNIP* (Figura 24). A expressão do gene *TXN* também foi maior nos pacientes com presença de ND *versus* o grupo controle (Figura 25).

Figura 24. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXNIP* nos portadores de DM1 com ausência (n=106) ou presença (n=44) de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura 25. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXN* nos portadores de DM1 com ausência (n=106) ou presença (n=44) de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Em relação aos genes *AGER* e *SIRT1*, não houve diferença significativa entre os grupos (Anexo G).

A análise dos dados de expressão gênica com a exclusão dos pacientes com ND incipiente, uma vez que a microalbuminúria representa uma condição que tanto pode evoluir para macroalbuminúria, como regredir para normoalbuminúria, evidenciou uma expressão relativa do mRNA do *DDOST* maior no grupo controle em relação ao grupo de portadores de DM1 com macroalbuminúria e DRCT (Figura 26). Na análise dos dados de expressão da *TXNIP* e da *TXN* com a exclusão dos pacientes com microalbuminúria, o grupo controle apresenta menor expressão relativa deste gene em relação aos grupos com ausência e presença de ND (Figura 27 e 28). A expressão relativa dos genes *AGER* e *SIRT1* não foi diferente entre os grupos.

Figura 26. Expressão relativa do gene *DDOST* (*AGER-1*) nos portadores de DM1 com ausência (n=106) ou presença (n=22) de nefropatia diabética (ND; apenas macroalbuminúria e doença renal crônica terminal) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura 27. Expressão relativa do gene *TXNIP* nos portadores de DM1 com ausência (n=106) ou presença (n=22) de nefropatia diabética (ND; apenas macroalbuminúria e doença renal crônica terminal) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura 28. Expressão relativa do gene *TXN* nos portadores de DM1 com ausência (n=106) ou presença (n=22) de nefropatia diabética (ND; apenas macroalbuminúria e doença renal crônica terminal) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Na análise realizada quando os portadores de DM1 foram estratificados pelo valor da TFGe, o grupo com TFGe < 60 mL/min/1,73m² (n=30) apresentou uma menor expressão de *DDOST* ($p=0,03$) em relação ao grupo controle (Figura 29). Não encontramos diferença entre os grupos de pacientes com a TFGe ≥ 60 mL/min/1,73m² (n=120) e os demais.

Figura 29. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *DDOST* (AGER1) nos portadores de DM1 estratificados de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

A expressão relativa de *TXNIP* e de *TXN* foi maior tanto no grupo com TFGe < 60 mL/min/1,73m² (n=30) quanto no grupo de pacientes com TFGe ≥ 60 mL/min/1,73m² (n=120) quando comparados ao grupo controle (Figura 30 e 31).

Figura 30. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXNIP* nos portadores de DM1 estratificados de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura 31. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *TXN* nos portadores de DM1 estratificados de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Observou-se uma correlação positiva entre a expressão de mRNA de *SIRT1* e de *DDOST* (*AGER1*) (ρ Spearman=0,30; $p<0,0001$) (Gráfico 2) e também entre a expressão de mRNA de *SIRT1* e de *AGER* (*RAGE*) (ρ Spearman=0,42; $p<0,0001$) (Gráfico 3).

Gráfico 2. Correlação entre a expressão relativa dos genes *SIRT1* e *DDOST* (*AGER-1*). Valor de ρ Spearman=0,40 e $p<0,0001$.

Gráfico 3. Correlação entre a expressão relativa dos genes *SIRT1* e *AGER* (RAGE). Valor de ρ Spearman=0,50 e $p<0,0001$.

A expressão do mRNA da *TXN* também correlacionou-se positivamente com a expressão gênica de *TXNIP* (ρ Spearman=0,69; $p<0,0001$) (Gráfico 4), da *SIRT1* (ρ Spearman=0,34; $p<0,0001$) (Gráfico 5) e de *DDOST* (ρ Spearman=0,23; $p<0,0043$) (Gráfico 6).

Gráfico 4. Correlação entre a expressão relativa dos genes *TXN* e *TXNIP*. Valor de ρ Spearman=0,69 e $p<0,0001$.

Gráfico 5. Correlação entre a expressão relativa dos genes *TXN* e *SIRT1*. Valor de ρ Spearman=0,34 e $p<0,0001$.

Gráfico 6. Correlação entre a expressão relativa dos genes *TXN* e *DDOST* (AGER-1). Valor de ρ Spearman=0,23 e $p=0,00043$.

4.4 Dosagem das concentrações plasmáticas de carboximetil-lisina (CML)

A dosagem de CML foi realizada no plasma de 120 pacientes e não foi encontrada diferença significativa entre os portadores de DM1 agrupados por complicações microvasculares. A concentração de CML também não se correlacionou significativamente com a média de HbA1c ou com qualquer outra variável clínica ou laboratorial.

4.5 Avaliação do consumo oral de AGE

Na literatura, considera-se que o consumo médio diário de AGEs analisado por um recordatório de três dias seja de aproximadamente 15.000 kU (kilo unidades) para pessoas saudáveis e para portadores de DM tipo 2 na população americana (126-128). No nosso subgrupo de 30 pacientes diabéticos tipo 1, observamos que a média do consumo de AGEs por dia foi de 17.000 kU e a mediana foi de 19.800 kU.

Esses pacientes foram divididos em dois grupos distintos tendo como valor de corte a mediana do consumo de AGEs: acima ou igual a mediana (n=15) e no outro grupo, pacientes com o consumo abaixo da mediana (n=15). Na análise da expressão gênica entre esses dois grupos, observamos um aumento relativo da expressão do *AGER* (RAGE) no grupo com maior consumo de AGE (Figura 32). Não foram observadas diferenças na expressão relativa do *DDOST*, *SIRT*, *TXN* e *TXNIP* entre os dois grupos.

Figura 32. Expressão relativa do gene *AGER* de acordo com o consumo de AGEs nos três dias anteriores à coleta de sangue. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos se expressão do RNA de proteínas relacionadas à sinalização/metabolização de AGEs e ao sistema TXN estariam diferentes nas células linfomononucleares de sangue periférico de portadores de DM1 com diferentes graus de três complicações microvasculares: ND, RD e NAC. Embora esta abordagem tenha a limitação de não estar avaliando a expressão dos genes-alvo nos órgãos-alvo das complicações, o achado de diferenças de expressão em células de tão fácil obtenção, como as células do sangue periférico, poderia ser útil no monitoramento de intervenções que visassem retardar a gênese e a evolução das complicações crônicas do DM.

Inicialmente, os pacientes foram divididos em dois grupos, que foram caracterizados clínica e laboratorialmente: o Grupo A, no qual os pacientes não apresentavam nenhuma das complicações, exceto RD não proliferativa leve (presente em 48,5% dos pacientes) e o Grupo B, no qual os pacientes apresentavam estágios mais avançados de RD e/ou ND e/ou NAC. Optamos por agrupar os pacientes com RD não proliferativa leve juntamente com os pacientes sem RD por duas razões: (1), consideramos que ter unicamente esse grau de RD após um tempo mediano de DM de 19 anos com controle glicêmico aquém do ideal (HbA1c mediana de 8,1%) é quase tão positivo quanto não ter nenhuma complicação e (2) a presença de microaneurismas, que define a RD não proliferativa leve, ocorre em até 10% da população saudável (9).

A comparação entre os dois grupos evidenciou que os pacientes no Grupo com complicações apresentavam maior tempo de doença e maior frequência de HAS em relação ao Grupo sem complicações; a maior frequência de HAS é um reflexo da presença de 51% de pacientes com ND no primeiro grupo. Não foram observadas diferenças significantes no grau de controle glicêmico, expresso pela HbA1c, entre os dois Grupos, o que se deve à homogeneidade da população incluída neste estudo.

Avaliamos a expressão da *TXNIP* em nossos pacientes, pois estudos recentes abordam a participação desta proteína na patogênese das complicações crônicas do DM; a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo que se estabelecem nas células expostas à hiperglicemia crônica promovem a dissociação do complexo TXN-TXNIP; a TXN exerce seus efeitos antioxidantes e, em alguns tipos celulares, como a célula β pancreática (108) e os podócitos (109), a TXNIP ativa inflamassomos, o que resulta em ativação da IL-1 β e consequente injúria celular. Na retina exposta à hiperglicemia, ocorre um aumento da expressão de *TXNIP*, que, ao ligar-se a TXN, reduz a capacidade antioxidante intracelular, culminando com a piora do estresse oxidativo (106).

Nossos resultados evidenciaram um aumento da expressão da *TXNIP* nos pacientes portadores de DM1 em relação ao grupo controle. Na estratificação por estágio de RD e de NAC, não foram encontradas diferenças entre os pacientes com e sem complicação, apenas entre ambos e o grupo controle.

Na estratificação por estágio de ND, apenas o grupo com ausência de ND apresentou maior expressão que o grupo controle na avaliação na qual os pacientes microalbuminúricos foram incluídos no grupo com presença de ND. Quando excluímos os pacientes microalbuminúricos, tanto o grupo com quanto o grupo sem ND apresentaram maior expressão de *TXNIP* em relação ao controle. Acreditamos que esse resultado se deva ao fato dos pacientes com microalbuminúria apresentarem uma menor expressão de *TXNIP* em comparação àqueles com macroalbuminúria e DRCT. Após a exclusão dos microalbuminúricos, a mediana da expressão de *TXNIP* ficaria maior e alcançaria diferença estatística em relação ao grupo controle.

O padrão de expressão observado sugere que a expressão de *TXNIP* nas células linfomononucleares seja afetada pelas anormalidades metabólicas que cursam com o DM1, possivelmente a hiperglicemia, mas não reflete a presença das complicações

microvasculares. Poderíamos interpretar esse aumento na expressão de *TXNIP* nos portadores de DM1 como mais um achado que reflete o aumento do estresse oxidativo na população de DM (129-131). Ele, no entanto, não se mostrou um marcador capaz de demonstrar maior estresse oxidativo naqueles pacientes com estágios mais avançados de complicações, como alguns estudos mostraram, por exemplo, na progressão da nefropatia diabética(132).

No entanto, outros marcadores de estresse oxidativo mensurados no presente estudo, como as concentrações plasmáticas de TBARS e de GSH, também não se mostraram maiores nos pacientes com *versus* sem complicações. Esses resultados talvez se devam a uma limitação das metodologias de quantificação de TBARS e de GSH, que se mostraram bastante variáveis na população estudada (inclusive em controles não diabéticos, dados não mostrados). Contudo, é provável que marcadores de estresse oxidativo no sangue e no plasma sofram a influência de diferentes fatores, e não apenas do DM, como o próprio conteúdo de AGEs na dieta (133).

Da mesma forma que a *TXNIP*, a expressão da *TXN* nas células linfomononucleares também se mostrou maior em portadores de DM1 em relação aos controles não diabéticos, não sendo diferente quando os pacientes foram estratificados de acordo com as complicações microvasculares. A forte correlação entre a expressão de *TXNIP* e *TXN* sugere que, nas células linfomononucleares, esses dois genes estejam sendo modulados pelas anormalidades metabólicas que cursam com o DM1, o que não ocorre em todos os tecidos. Advani e cols., por exemplo, mostraram em um modelo de ND em roedores e em biópsias renais de portadores de DM tipo 2 com ND que somente a expressão de *TXNIP* estava aumentada (134).

Embora o Sistema TXN seja muito conhecido por sua participação nas defesas antioxidantes, ele também exerce outras funções celulares. No contexto das

complicações crônicas do DM, é importante ressaltar que a *TXN* regula o transporte de histonas desacetilases classe II, juntamente com a *TXNIP* (135), razão pela qual poderiam participar dos mecanismos epigenéticos relacionados à acetilação e desacetilação de histonas associados às complicações crônicas do DM. Perrone e cols. mostraram que em células endoteliais de capilares retinianos, a indução da via de sinalização de RAGE e altas concentrações de glicose aumentam a expressão de *TXNIP*, que é indispensável para o remodelamento de histonas na região promotora do gene que codifica a Cox2, ligando a expressão de *TXNIP* a mecanismos epigenéticos que resultam em inflamação na RD (111).

A avaliação da expressão do RNA de dois receptores de AGE, o RAGE e o AGER1 evidenciou apenas a modulação do AGER1: uma diminuição de expressão deste receptor em portadores de DM1 em relação aos controles e dentre os pacientes com DM1, uma redução nos pacientes com ND em comparação aos pacientes sem ND e aos controles. A avaliação de acordo com a TFG_e também evidenciou uma diminuição da expressão do AGER1 naqueles pacientes com TFG_e <60 mL/min em relação aos controles. Não foram observadas diferenças quando os pacientes foram estratificados de acordo com os estágios de RD e de NAC.

O AGER1 é o principal responsável por remover os AGEs da circulação para posterior degradação destes compostos. Um estudo de He e cols. publicado em 2001 com 18 portadores de DM1 com RD grave, 11 pacientes sem complicações e 7 voluntários saudáveis não diabéticos havia demonstrado um aumento da expressão desse receptor no grupo sem complicações em comparação ao grupo controle e ao grupo com complicações (87), no entanto, esse estudo avaliou a expressão gênica em casuística bem menor que a do presente estudo e por metodologia de RT-PCR não

quantitativa, razões pelas quais acreditamos que nossos resultados sejam mais consistentes.

Não é possível estabelecer qual a relação de causa e efeito entre a expressão de AGER1 nas células linfomononucleares e a ND, ou seja, a menor expressão seria um fator predisponente para essa complicação ou, ao contrário, seria uma consequência da redução na função renal. Essa última possibilidade não pode ser excluída, apesar de não termos encontramos correlação entre a expressão de AGER1 e a TFGe. Vlassara e cols. mostraram a redução da expressão de AGER1 em pacientes com DRC, no entanto, os valores de expressão nesses pacientes praticamente normalizaram com a restrição de AGEs na dieta (136), o que poderia sugerir que a piora da função renal cursa com redução da eliminação de AGEs, que se acumulam no organismo e acabam por diminuir a expressão de AGER1. Com a redução na ingestão, os valores plasmáticos de AGEs diminuiriam e quase normalizariam a expressão de AGER1.

Vários estudos já demonstraram que o aumento das concentrações plasmáticas de AGEs aumenta a expressão de RAGEs, os receptores que desencadeiam efeitos celulares deletérios e cuja ativação está intimamente relacionada ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM (55, 137, 138). Não encontramos diferenças significantes nas concentrações do AGE CML entre pacientes com e sem complicações e nem na expressão do mRNA de RAGE entre os portadores de DM1 *versus* o grupo controle ou entre os portadores de DM1 estratificados de acordo com a presença das complicações microvasculares. Um estudo em portadores de DM tipo 2 mostrou um aumento de quatro e 12 vezes na expressão de RAGE em células linfomonocucleares de pacientes sem complicações e com complicações microvasculares, respectivamente, em relação a controles não diabéticos (139). Não sabemos se essas diferenças se devem ao fato de estarmos avaliando populações de pacientes com diferentes tipos de DM ou se

padrões dietéticos muito distintos entre as populações estudadas poderiam justificar essas diferenças, uma vez que aquele estudo foi realizado na Índia.

A única diferença na expressão do RAGE no presente estudo foi observada quando um subgrupo de 30 portadores de DM foi dividido de acordo com o consumo de AGEs nos três dias anteriores à coleta de sangue, evidenciando uma maior expressão nas células linfomononucleares dos pacientes que apresentavam um consumo maior que a mediana calculada para todos os pacientes. Esses dados estão de acordo com outros estudos que já evidenciaram a diminuição da expressão de RAGE após uma dieta pobre em AGEs (140) e evidenciam a importância de se avaliar a expressão dos receptores de AGE nas células linfomononucleares levando-se em conta o consumo de AGEs na dieta.

Não observamos diferenças na expressão de *SIRT1* entre controles e portadores de DM1 ou neste último grupo estratificado de acordo com as complicações microvasculares. A correlação positiva observada entre o mRNA da *SIRT-1* e do *DDOST* poderia corroborar a hipótese de Uribarri, de que a função normal da sirtuína-1 depende do AGER1, proposta após a constatação de que a restrição dietética de AGEs aumenta a expressão do mRNA de *DDOST* e de *SIRT-1* em pacientes com DM2 (88). No entanto, também observamos uma correlação positiva entre a expressão de *AGER* e *SIRT1*, enquanto não foi observada correlação entre a expressão de *AGER* e *DDOST*. Portanto, embora o AGER1 e a sirtuína 1 possam participar conjuntamente da resposta celular aos AGEs, a expressão de sirtuína-1 deve ser modulada por inúmeros fatores; Lee e cols. encontraram, por exemplo, que a expressão de sirtuína-1 em células mononucleares correlaciona-se negativamente com o IMC, com o grau de resistência à insulina (mensurado pelo índice HOMA-IR) e com a quantidade de gordura visceral em indivíduos adultos japoneses sem história de DM ou doença cardiovascular (141).

Finalmente, assim como vários outros trabalhos na literatura, também não observamos correlação entre as concentrações plasmáticas do AGE CML e os valores de HbA1c (142), (66, 143), o que provavelmente se deve ao fato das concentrações de AGEs no estado de equilíbrio dinâmico não refletirem apenas a glicemia, mas também o balanço do consumo oral, da formação endógena e do catabolismo dos AGEs (144).

6 CONCLUSÃO

- As expressões gênicas de *TXNIP* e *TXN* estão aumentadas e a expressão gênica de *DDOST* está diminuída em células linfomononucleares de portadores de DM1 em relação ao grupo controle não diabético;
- A expressão gênica de *DDOST* em células linfomononucleares de sangue periférico está diminuída em portadores de DM1 com nefropatia diabética;
- Os valores do marcador de estresse oxidativo TBARS e do antioxidante GSH se correlacionaram inversamente, porém não foram diferentes entre os portadores de DM1 com e sem as complicações microvasculares avaliadas;
- As concentrações plasmáticas do AGE CML não diferiram entre os portadores de DM1 com e sem as complicações microvasculares avaliadas.

7. ANEXOS

Anexo A. Aprovação do Comitê de Pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DIRETORIA CLÍNICA
COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA -
CAPPesq

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA**Registro** (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)

Nº do Protocolo:

Tipo: Humanos

Instituto: FMUSP

Registro on-line nº: 10647

Data de Entrada: 16/04/2013

Este projeto envolve:

Pacientes HC .....Sim

Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa) .....Não

Documentos HC(Prontuários e Outros) .....Sim

Materiais estocados no HC .....Não

Peças anatômicas de cadáveres .....Não

Haverá necessidade de recrutamento de pacientes na mídia .....Não

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de Diabetes mellitus tipo 1

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

expressão gênica, Diabetes tipo 1, AGEs, complicações microvasculares

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

O papel da hiperglicemia na patogênese das complicações micro e macrovasculares do diabetes tipo 1 (DM1) já está bem estabelecido, sendo o risco de complicações modulado por determinantes como: susceptibilidade genética, idade de início, duração do DM, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo e consumo de álcool. Vários mecanismos são propostos para explicar a glicotoxicidade, como o aumento da ativação da via dos polióis, da ativação da proteína cinase C e via da hexosamina e formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs alteram irreversivelmente a estrutura de macromoléculas, comprometendo a sua função biológica. Além disso, a interação com seus receptores específicos RAGEs favorece vias de transdução de sinal que culminam com a geração de espécies reativas de oxigênio. Um segundo tipo de receptor, o AGER-1 contrapõe-se à toxicidade dos AGEs, graças ao estímulo à atividade antioxidante celular e a redução de estresse inflamatório. Há poucos estudos na literatura abordando a expressão de receptores de AGEs e sua correlação com complicações crônicas microvasculares no DM1. Nossa hipótese é que a alteração no balanço entre a expressão de RAGE e

AGER-1 em células linfomononucleares, bem como a diminuição das defesas antioxidantes, possa refletir o grau de complicações crônicas microvasculares. Assim, o objetivo do presente projeto é correlacionar, em portadores de DM1, o grau de comprometimento microvascular (retinopatia, neuropatia e nefropatia) com: (1) a expressão de RAGE, AGER-1 e sirtuína 1 (desacetilase que desempenha papel importante na patogênese de diversas doenças degenerativas) em células linfomononucleares de sangue periférico; (2) as defesas antioxidantes totais e marcadores de peroxidação lipídica e (3) as concentrações plasmáticas do AGE carboximetil-lisina e de AGE totais. Portanto, aproximadamente 100 portadores de DM1 e 10 controles saudáveis pareados para idade e sexo serão avaliados.

4. Pesquisador Responsável:

Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

<http://lattes.cnpq.br/5205676344593195>

Graduação: Medicina

Vínculo: FMUSP

5. Pesquisador Executante:

Daniele Pereira dos Santos

<http://lattes.cnpq.br/8958113666528406>

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Maria Beatriz Monteiro, Ricardo V Perez, Sharon Nina Admoni

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Clínica Médica

Disciplina: Endocrinologia e Metabologia

LIM: LIM/25 - Lab Endocrinologia Celular e Molecular

8. Existe entidade externa envolvida?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Mestrado

Outros:

Orientador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

13. Investigação

Retrospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Prontuários de pacientes

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Experimental

16. Áreas temáticas previstas na Res. 196/96

Armazenamento e utilização de material biológico humano

17. Patrocínio

Não há patrocínio

18. Valor do financiamento

0,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 24 meses

20. Assinaturas

Assinatura e carimbo do Pesquisador

____/____/____.

Maria Lúcia Corrêa Giannella
CRM 62426
Endocrinologista

Aprovado em

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento

____/____/____.

Aprovado em

Aprovado "ad-referendum" o encaminhamento à Comissão
de Ética de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

24/09/13

Prof. Dr. Innebu Tadeu Velasco
Chefe do Departamento de Clínica Médica
Faculdade de Medicina USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de diabetes mellitus tipo 1.

Pesquisador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15635113.3.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 294.169

Data da Relatoria: 19/06/2013

Apresentação do Projeto:
adequada

Objetivo da Pesquisa:
claro e relevante

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

risco baixo e alto benefício (conhecimento de marcadores celulares de glicotoxicidade em pacientes diabéticos com complicações vasculares)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante e exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos solicitados foram devidamente apresentados

Recomendações:

Os itens solicitados foram devidamente esclarecidos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado sem pendências

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: maria.cervinho@hcfm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 294.169

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o Item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 05 de Junho de 2013

Assinador por:

Lutz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

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

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marta.carvalho@hcfm.usp.br

Anexo B. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – PACIENTE e CONTROLE**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL****1.NOME:**.....DOCUMENTO DE IDENTIDADE nº.: .....SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... nº: ..... APTO: .....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL: .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE nº.:.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... nº: ..... APTO:

BAIRRO: ..... CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de diabetes mellitus tipo 1.

PESQUISADOR : Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora INSCRIÇÃO
CONSELHO REGIONAL Nº 62926

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica
Médica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO X	RISCO MAIOR ☐

3.DURAÇÃO DA PESQUISA: 01/05/2013 a 30/04/2015

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O diabetes melito é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue) e o seu descontrole por um longo tempo pode levar ao desenvolvimento de complicações como diminuição ou perda da visão, problemas nos rins e nos nervos. Assim, o/a senhor(a) está convidado(a) a participar da nossa pesquisa que tem como objetivo relacionar o aparecimento de complicações diabéticas (na retina, nos nervos e nos rins) com a expressão de marcadores expressados nas células do sangue.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Caso o(a) Senhor(a) concorde em participar deste estudo, iremos coletar uma amostra de 20 mL de sangue de uma veia de seu braço com todos os cuidados preconizados de coleta sanguínea. Para posteriormente extrair o material genético (RNA e Proteínas) das células do seu sangue. Este material será usado no estudo da expressão de genes envolvidos na susceptibilidade do aparecimento de complicações do diabetes melito.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos

Somente será realizada a coleta de sangue de uma veia de seu braço para a obtenção de material genético.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3

O único desconforto que o (a) Sr.(a) sentirá será uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa no seu material genético. Os riscos mais comuns deste procedimento são: formação de hematomas, pequeno sangramento local e dor. Outros menos frequentes que podem ocorrer são punção acidental de uma artéria, anemia por sangramento, infecção e lesão nervosa. Esses riscos são raros e são minimizados pelos cuidados tomados pelo enfermeiro no momento da punção. Caso ocorra algum problema após a coleta do sangue, o (a) Sr (a) será atendido no próprio ambulatório médico do Hospital das Clínicas pelo médico responsável pela pesquisa. O (a) Sr (a) tem garantia de assistência, acompanhamento e indenização caso ocorra algum dano relacionado aos procedimentos efetuados para esta pesquisa conforme a Resolução CNS 196/96.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados fatores genéticos que aumentam o risco para o desenvolvimento das complicações associadas ao diabetes. Com isso, no futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de diabetes, identificar em familiares os que têm risco de ter diabetes e indicar a prioridade para futuras estratégias de prevenção e de controle intensivo dos portadores de diabetes com maior risco de desenvolver essas doenças associadas.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar

Como a retirada do sangue para a pesquisa do material genético não é um procedimento para tratamento, não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o(a) Sr(a), caso o Sr (a) opte por não retirar o sangue.

7 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o (a) Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Telefone(s) 3061-7253, ramal 13. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – O (A) Sr (a) tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que o Sr. (a) recebe no Hospital das Clínicas.

9 – Direito de confidencialidade: Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de desenvolvimento de diabetes ou de suas complicações. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – O (A) Sr(a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Todos os procedimentos necessários para o estudo serão realizados no dia de sua consulta. Caso haja despesas adicionais com transporte e alimentação, por necessidade de comparecimento ao ambulatório fora do dia da sua consulta, serão ressarcidas.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado em outras pesquisas apenas com autorização do paciente

A amostra de sangue cedida pelo(a) Sr(a) poderá ser utilizada em outras pesquisas que também tenham o objetivo de prevenir ou estudar as complicações decorrentes do diabetes. Para que sua amostra possa ser armazenada e usada em outras pesquisas é necessária sua autorização. Por favor, informe abaixo se existe a necessidade de

consultá-lo(a) para autorizar o uso do seu material biológico em outras pesquisas científicas.

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

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

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

Se o(a) Sr(a). concordar em doar este material para outras futuras pesquisas científicas ele será armazenado no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, permanecendo sob a responsabilidade institucional da Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

O prazo de armazenamento do seu material biológico no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) será de acordo com o cronograma da pesquisa, sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto de pesquisa “Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de diabetes mellitus tipo 1.”

Eu discuti com a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE nº: ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... nº: ..... APTO: .....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD(.....) .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc : .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE nº: ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO:..... nº: ..... APTO: .....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD(.....) .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de diabetes mellitus tipo 1.

PESQUISADOR : Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

CARGO/FUNÇÃO: Médica Assistente e Professora Pesquisadora INSCRIÇÃO
CONSELHO REGIONAL Nº 62926

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica
Médica

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐	RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO X	RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 01/05/2013 a 30/04/2015

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

O diabetes melito é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue) e o seu descontrole por um longo tempo pode levar ao desenvolvimento de complicações como diminuição ou perda da visão, problemas nos rins e nos nervos. Assim, o/a senhor(a) está convidado(a) a participar como controle da nossa pesquisa que tem como objetivo relacionar o aparecimento de complicações diabéticas (na retina, nos nervos e nos rins) com a expressão de marcadores nas células do sangue.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Caso o(a) Senhor(a) concorde em participar deste estudo, iremos coletar uma amostra de seu sangue de uma veia de seu braço para a extração do material genético (RNA). Este material será usado no estudo da expressão de genes envolvidos na susceptibilidade do aparecimento de complicações do diabetes melito.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica da veia do antebraço; exames radiológicos

Somente será realizada a coleta de sangue de uma veia de seu braço para a obtenção de material genético.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3

O único desconforto que o (a) Sr.(a) sentirá será uma picada no seu braço para a retirada do sangue onde será realizada a pesquisa no seu material genético. Os riscos mais comuns deste procedimento são: formação de hematomas, pequeno sangramento local e dor. Outros menos frequentes que podem ocorrer são punção acidental de uma artéria, anemia por sangramento, infecção e lesão nervosa. Esses riscos são raros e são minimizados pelos cuidados tomados pelo enfermeiro no momento da punção. Caso ocorra algum problema após a coleta do sangue, o (a) Sr (a) será atendido no próprio ambulatório médico do Hospital das Clínicas pelo médico responsável pela pesquisa. O (a) Sr (a) tem garantia de assistência, acompanhamento e indenização caso ocorra algum dano relacionado aos procedimentos efetuados para esta pesquisa conforme a Resolução CNS 196/96.

5 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Uma vez o (a) Sr (a) sendo um paciente saudável, existe a possibilidade de que após a realização desse estudo, sejam identificados fatores genéticos que possam predispor ao desenvolvimento do diabetes. Com isso, no futuro, poderemos diagnosticar e tratar com precisão os portadores de tal doença, identificar em familiares os que têm risco de ter diabetes e indicar a prioridade para futuras estratégias de prevenção e de controle intensivo dos portadores de diabetes com maior risco de desenvolver doenças a ele relacionadas.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar

Como a retirada do sangue para a pesquisa do material genético não é um procedimento para tratamento, não há procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o(a) Sr(a), caso o Sr (a) opte por não retirar o sangue.

7 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o (a) Sr(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Telefone(s) 3061-7253, ramal 13. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – O (A) Sr (a) tem liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que o Sr. (a) recebe no Hospital das Clínicas.

9 – Direito de confidencialidade: Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de desenvolvimento de diabetes ou de suas complicações. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – O (A) Sr(a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Todos os procedimentos necessários para o estudo serão realizados no dia de sua consulta. Caso haja despesas adicionais com transporte e alimentação, por necessidade de comparecimento ao ambulatório fora do dia da sua consulta, serão ressarcidas.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado em outras pesquisas apenas com autorização do paciente

A amostra de sangue cedida pelo(a) Sr(a) poderá ser utilizada em outras pesquisas que também tenham o objetivo de prevenir ou estudar as complicações decorrentes do diabetes. Para que sua amostra possa ser armazenada e usada em outras pesquisas é necessária sua autorização. Por favor, informe abaixo se existe a necessidade de consultá-lo(a) para autorizar o uso do seu material biológico em outras pesquisas científicas.

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

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

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

Se o(a) Sr(a). concordar em doar este material para outras futuras pesquisas científicas ele será armazenado no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, permanecendo sob a responsabilidade institucional da Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella.

O prazo de armazenamento do seu material biológico no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) será de acordo com o cronograma da pesquisa, sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto de pesquisa “Estudo da associação entre as complicações microvasculares e a expressão de receptores para produtos finais de glicação avançada em células mononucleares de portadores de diabetes mellitus tipo 1.”

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

Anexo C. Curvas de Amplificação dos genes: *DDOST*, *AGER*, *SIRT*, *TXNIP*, *TXN*, *B2M* e *ACTB*.

Figura a. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *ACTB*.

Figura b. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *B2M*.

Figura c. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *AGER* (RAGE).

Figura d. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *DDOST* (AGER-1).

Figura e. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *SIRT1*.

Figura f. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *TXNIP*.

Figura g. Curva de amplificação do RNA mensageiro do gene *TXN*.

Anexo D.

Expressão dos genes-alvo: *DDOST*, *AGER* e *SIRT1* entre os Grupos A (n=70, pacientes sem nenhuma complicação microvascular e/ou com RD não proliferativa leve), B (n=80, pacientes com outras formas de RD e/ou outras complicações microvasculares [ND e NAC]) e Grupo controle. Não houve diferenças significantes entre os três grupos para os três genes analisados.

Figura a. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *DDOST* (*AGER1*) no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura b. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *AGER* (*RAGE*) no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura c. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *SIRT1* no Grupo A (portadores de DM1 sem nenhuma complicação microvascular e/ou com retinopatia não proliferativa leve), no Grupo B (pacientes com outras formas de retinopatia e/ou outras complicações microvasculares) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Anexo E.

Expressão dos genes-alvo: *AGER*, *SIRT* e *DDOST* entre os grupos de portadores de DM1 com RD não proliferativa moderada/grave e proliferativa (n=44) quando comparados aos pacientes com ausência de RD ou com RD não proliferativa leve (n=86). Não houve diferenças significantes entre os três grupos para os três genes analisados.

Figura d. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *AGER* (RAGE) nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve, no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura e. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *SIRT1* nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve, no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura f. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *DDOST* (*AGER1*) nos portadores de DM1 com ausência de retinopatia diabética (RD) ou com RD não proliferativa (RDNP) leve, no grupo com a presença de RDNP moderada/grave ou RD proliferativa (RDP) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Anexo F.

Expressão dos genes alvo: *DDOST*, *AGER* e *SIRT* entre os grupos de portadores de DM1 com a presença (n=46) ou ausência (n=104) de NAC e no grupo controle. Não houve diferenças significantes entre os três grupos para os três genes analisados.

Figura g. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *DDOST* nos portadores de DM1 com a presença ou ausência de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura h. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *AGER* (RAGE) nos portadores de DM1 com a presença ou ausência de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura i. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *SIRT1* nos portadores de DM1 com a presença ou ausência de neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Anexo G.

Expressão dos genes alvo: *AGER* e *SIRT1* entre os grupos de portadores de DM1 com a presença (n=44) ou ausência (n=106) de ND (n=106) e no grupo controle. Não houve diferenças significantes entre os três grupos para os dois genes analisados.

Figura m. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *AGER* (RAGE) nos portadores de DM1 com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

Figura n. Expressão relativa do RNA mensageiro do gene *SIRT1* nos portadores de DM1 com a presença ou ausência de nefropatia diabética (ND) e no grupo controle. A linha horizontal representa o valor da mediana de expressão.

8. REFERÊNCIAS

1. [cited 2014 26/11]. Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas>.
2. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2130-5.
3. Xie J, Méndez JD, Méndez-Valenzuela V, Aguilar-Hernández MM. Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cell Signal*. 2013;25(11):2185-97.
4. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*. 2000;23(10):1516-26.
5. Spinas GA. [Blood glucose monitoring and late complications of diabetes--consequences of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1993;123(51-52):2387-9.
6. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
7. McVicar CM, Ward M, Colhoun LM, Guduric-Fuchs J, Bierhaus A, Fleming T, et al. Role of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in retinal vasodegenerative pathology during diabetes in mice. *Diabetologia*. 2015.
8. Sheetz MJ, King GL. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*. 2002;288(20):2579-88.
9. Jensen RA, Sim X, Li X, Cotch MF, Ikram MK, Holliday EG, et al. Genome-wide association study of retinopathy in individuals without diabetes. *PLoS One*. 2013;8(2):e54232.
10. Manigrasso MB, Juranek J, Ramasamy R, Schmidt AM. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):15-22.
11. Bansal V, Kalita J, Misra UK. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J*. 2006;82(964):95-100.
12. Khandoker AH, Imam MH, Couderc JP, Palaniswami M, Jelinek HF. QT variability index changes with severity of cardiovascular autonomic neuropathy. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*. 2012;16(5):900-6.
13. M B, LP A, E F, AI V, RW N, AJM B. Complications of Diabetes mellitus. *Willians Text Book of Endocrinology*. Tenth ed: Philadelphia: Saunders; 2003.

14. Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G, Rottiers RE, Fuller JH. Microalbuminuria in type 1 diabetes: rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney Int.* 2001;60(1):219-27.
15. Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Jensen BR, Graae M, Torp I, et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ.* 2004;328(7448):1105.
16. Stitt AW, Curtis TM. Advanced glycation and retinal pathology during diabetes. *Pharmacol Rep.* 2005;57 Suppl:156-68.
17. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-86.
18. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998;352(9131):837-53.
19. Conway BR, Savage DA, Maxwell AP. Identifying genes for diabetic nephropathy--current difficulties and future directions. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(11):3012-7.
20. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* 1999;48(1):1-9.
21. Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(30):18714-9.
22. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;67(1):3-21.
23. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404(6779):787-90.
24. Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem J.* 1990;269(1):1-11.

25. Lal S, Szwergold BS, Taylor AH, Randall WC, Kappler F, Brown TR. Production of fructose and fructose-3-phosphate in maturing rat lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(5):969-73.
26. Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(10):2465-71.
27. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest*. 1999;104(1):103-13.
28. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*. 1997;99(3):457-68.
29. Baidoshvili A, Niessen HW, Stooker W, Huybregts RA, Hack CE, Rauwerda JA, et al. N(omega)-(carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels. *Atherosclerosis*. 2004;174(2):287-92.
30. Thornalley PJ. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:111-7.
31. Boehm BO, Schilling S, Rosinger S, Lang GE, Lang GK, Kientsch-Engel R, et al. Elevated serum levels of N(epsilon)-carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, are associated with proliferative diabetic retinopathy and macular oedema. *Diabetologia*. 2004;47(8):1376-9.
32. Hammes HP, Brownlee M, Lin J, Schleicher E, Bretzel RG. Diabetic retinopathy risk correlates with intracellular concentrations of the glycoxidation product Nepsilon-(carboxymethyl) lysine independently of glycohaemoglobin concentrations. *Diabetologia*. 1999;42(5):603-7.
33. Hammes HP, Alt A, Niwa T, Clausen JT, Bretzel RG, Brownlee M, et al. Differential accumulation of advanced glycation end products in the course of diabetic retinopathy. *Diabetologia*. 1999;42(6):728-36.
34. Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, Takeuchi M, Yamamoto H, Makita Z, et al. Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes. *J Diabetes Complications*. 2003;17(1):16-21.

35. Robinson AB, Stogsdill JA, Lewis JB, Wood TT, Reynolds PR. RAGE and tobacco smoke: insights into modeling chronic obstructive pulmonary disease. *Front Physiol.* 2012;3:301.
36. Nicholl ID, Bucala R. Advanced glycation endproducts and cigarette smoking. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998;44(7):1025-33.
37. Peppas M, Vlassara H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones (Athens).* 2005;4(1):28-37.
38. Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6474-9.
39. Uribarri J, Cai W, Sandu O, Peppas M, Goldberg T, Vlassara H. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:461-6.
40. Thornalley PJ. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact.* 2008;23(1-2):125-50.
41. Saito A, Takeda T, Sato K, Hama H, Tanuma A, Kaseda R, et al. Significance of proximal tubular metabolism of advanced glycation end products in kidney diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:637-43.
42. Semba RD, Arab L, Sun K, Nicklett EJ, Ferrucci L. Fat mass is inversely associated with serum carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, in adults. *J Nutr.* 2011;141(9):1726-30.
43. Semba RD, Gebauer SK, Baer DJ, Sun K, Turner R, Silber HA, et al. Dietary intake of advanced glycation end products did not affect endothelial function and inflammation in healthy adults in a randomized controlled trial. *J Nutr.* 2014;144(7):1037-42.
44. Hu S, He W, Liu Z, Xu H, Ma G. The accumulation of the glycoxidation product N(ε)-carboxymethyllysine in cardiac tissues with age, diabetes mellitus and coronary heart disease. *Tohoku J Exp Med.* 2013;230(1):25-32.
45. McLellan AC, Thornalley PJ, Benn J, Sonksen PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin Sci (Lond).* 1994;87(1):21-9.

46. Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood ME, Touchette AD, Szwergold BS. alpha-Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*. 2001;24(4):726-32.
47. Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, et al. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(9):1166-73.
48. 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 Commun*. 1999;256(1):89-93.
49. Henle T, Miyata T. Advanced glycation end products in uremia. *Adv Ren Replace Ther*. 2003;10(4):321-31.
50. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Tomita K, et al. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens Res*. 2005;28(12):973-80.
51. Schalkwijk CG, Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*. 2012;42(4):1193-204.
52. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*. 1992;267(21):14998-5004.
53. Sevillano N, Girón MD, Salido M, Vargas AM, Vilches J, Salto R. Internalization of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is required to mediate intracellular responses. *J Biochem*. 2009;145(1):21-30.
54. Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem*. 1999;274(44):31740-9.
55. Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, et al. Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in

mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest.* 1995;96(3):1395-403.

56. Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest.* 1996;97(1):238-43.

57. Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR. The role of reactive oxygen species in TNF α -dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1744(2):213-23.

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

59. Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, et al. Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(19):8807-11.

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

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

62. Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, et al. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes.* 2000;49(9):1561-70.

63. Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol.* 1995;146(3):688-94.

64. Greten J, Kreis I, Wiesel K, Stier E, Schmidt AM, Stern DM, et al. Receptors for advance glycation end-products (AGE) - expression by endothelial cells in non-diabetic uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11(5):786-90.

65. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(9):1656-66.
66. Chawla D, Bansal S, Banerjee BD, Madhu SV, Kalra OP, Tripathi AK. Role of advanced glycation end product (AGE)-induced receptor (RAGE) expression in diabetic vascular complications. *Microvasc Res.* 2014;95C:1-6.
67. Zong H, Ward M, Madden A, Yong PH, Limb GA, Curtis TM, et al. Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia.* 2010;53(12):2656-66.
68. Juranek JK, Kothary P, Mehra A, Hays A, Brannagan TH, Schmidt AM. Increased expression of the receptor for advanced glycation end-products in human peripheral neuropathies. *Brain Behav.* 2013;3(6):701-9.
69. Park SY, Kim YA, Hong YH, Moon MK, Koo BK, Kim TW. Up-regulation of the receptor for advanced glycation end products in the skin biopsy specimens of patients with severe diabetic neuropathy. *J Clin Neurol.* 2014;10(4):334-41.
70. Giannini C, D'Adamo E, de Giorgis T, Chiavaroli V, Verrotti A, Chiarelli F, et al. The possible role of esRAGE and sRAGE in the natural history of diabetic nephropathy in childhood. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(2):269-75.
71. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 2003;370(Pt 3):1097-109.
72. Nishizawa Y, Koyama H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products and cardiovascular disease in end-stage renal disease. *J Ren Nutr.* 2008;18(1):76-82.
73. Su XD, Li SS, Tian YQ, Zhang ZY, Zhang GZ, Wang LX. Elevated serum levels of advanced glycation end products and their monocyte receptors in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res.* 2011;42(7):596-601.
74. Piarulli F, Lapolla A, Ragazzi E, Susana A, Sechi A, Nollino L, et al. Role of endogenous secretory RAGE (esRAGE) in defending against plaque formation induced by oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis.* 2013;226(1):252-7.

75. Bakker SF, Tushuizen ME, Gözütok E, Çiftci A, Gelderman KA, Mulder CJ, et al. Advanced glycation end products (AGEs) and the soluble receptor for AGE (sRAGE) in patients with type 1 diabetes and coeliac disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(2):230-5.
76. Nin JW, Jorsal A, Ferreira I, Schalkwijk CG, Prins MH, Parving HH, et al. Higher plasma soluble Receptor for Advanced Glycation End Products (sRAGE) levels are associated with incident cardiovascular disease and all-cause mortality in type 1 diabetes: a 12-year follow-up study. *Diabetes.* 2010;59(8):2027-32.
77. Ding Y, Kantarci A, Hasturk H, Trackman PC, Malabanan A, Van Dyke TE. Activation of RAGE induces elevated O₂⁻ generation by mononuclear phagocytes in diabetes. *J Leukoc Biol.* 2007;81(2):520-7.
78. Cai W, He JC, Zhu L, Lu C, Vlassara H. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(37):13801-6.
79. Yap FY, Kantharidis P, Coughlan MT, Slattery R, Forbes JM. Advanced glycation end products as environmental risk factors for the development of type 1 diabetes. *Curr Drug Targets.* 2012;13(4):526-40.
80. Lu C, He JC, Cai W, Liu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11767-72.
81. Cai W, He JC, Zhu L, Chen X, Wallenstein S, Striker GE, et al. Reduced oxidant stress and extended lifespan in mice exposed to a low glycotoxin diet: association with increased AGER1 expression. *Am J Pathol.* 2007;170(6):1893-902.
82. He CJ, Zheng F, Stitt A, Striker L, Hattori M, Vlassara H. Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: possible role in nonobese diabetic renal disease. *Kidney Int.* 2000;58(5):1931-40.
83. Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, et al. Protection against loss of innate defenses in adulthood by low advanced glycation end products (AGE) intake: role of the antiinflammatory AGE receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4483-91.
84. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al. CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:350-5.

85. Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, Ikemoto M, Arai H, Horiuchi S, et al. Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2001;276(16):13348-55.
86. Tamura Y, Adachi H, Osuga J, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, et al. FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12613-7.
87. He CJ, Koschinsky T, Buening C, Vlassara H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. *Mol Med*. 2001;7(3):159-68.
88. Uribarri J, Cai W, Ramdas M, Goodman S, Pyzik R, Chen X, et al. Restriction of advanced glycation end products improves insulin resistance in human type 2 diabetes: potential role of AGER1 and SIRT1. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1610-6.
89. Cai W, Ramdas M, Zhu L, Chen X, Striker GE, Vlassara H. Oral advanced glycation endproducts (AGEs) promote insulin resistance and diabetes by depleting the antioxidant defenses AGE receptor-1 and sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):15888-93.
90. Autiero I, Costantini S, Colonna G. Human sirt-1: molecular modeling and structure-function relationships of an unordered protein. *PLoS One*. 2009;4(10):e7350.
91. Kitada M, Kume S, Kanasaki K, Takeda-Watanabe A, Koya D. Sirtuins as possible drug targets in type 2 diabetes. *Curr Drug Targets*. 2013;14(6):622-36.
92. Yacoub R, Lee K, He JC. The Role of SIRT1 in Diabetic Kidney Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:166.
93. Chong ZZ, Shang YC, Wang S, Maiese K. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(2):167-78.
94. Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol*. 2009;29(5):1363-74.
95. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med*. 2008;14(5):219-27.
96. Guarente L, Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med*. 2011;364(23):2235-44.

97. Calabrese V, Cornelius C, Leso V, Trovato-Salinaro A, Ventimiglia B, Cavallaro M, et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(5):729-36.
98. Zheng Z, Chen H, Li J, Li T, Zheng B, Zheng Y, et al. Sirtuin 1-mediated cellular metabolic memory of high glucose via the LKB1/AMPK/ROS pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes*. 2012;61(1):217-28.
99. Balestrieri ML, Servillo L, Esposito A, D'Onofrio N, Giovane A, Casale R, et al. Poor glycaemic control in type 2 diabetes patients reduces endothelial progenitor cell number by influencing SIRT1 signalling via platelet-activating factor receptor activation. *Diabetologia*. 2013;56(1):162-72.
100. Yang J, Wang N, Zhu Y, Feng P. Roles of SIRT1 in high glucose-induced endothelial impairment: association with diabetic atherosclerosis. *Arch Med Res*. 2011;42(5):354-60.
101. Cardellini M, Menghini R, Martelli E, Casagrande V, Marino A, Rizza S, et al. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. *Diabetes*. 2009;58(10):2396-401.
102. Nihalani D, Susztak K. Sirt1-Claudin-1 crosstalk regulates renal function. *Nat Med*. 2013;19(11):1371-2.
103. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig*. 2010;1(3):77-89.
104. Spindel ON, World C, Berk BC. Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(6):587-96.
105. Patwari P, Lee RT. An expanded family of arrestins regulate metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(5):216-22.
106. Singh LP. Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) and Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *J Clin Exp Ophthalmol*. 2013;4.
107. Wu N, Zheng B, Shaywitz A, Dagon Y, Tower C, Bellinger G, et al. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Mol Cell*. 2013;49(6):1167-75.
108. Osowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced β cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab*. 2012;16(2):265-73.

109. Gao P, Meng XF, Su H, He FF, Chen S, Tang H, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2448-60.
110. Perrone L, Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, Singh LP. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. *Cell Death Dis*. 2010;1:e65.
111. Perrone L, Devi TS, Hosoya K, Terasaki T, Singh LP. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) induces inflammation through chromatin modification in retinal capillary endothelial cells under diabetic conditions. *J Cell Physiol*. 2009;221(1):262-72.
112. Sbai O, Devi TS, Melone MA, Feron F, Khrestchatisky M, Singh LP, et al. RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4332-9.
113. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.
114. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1677-82.
115. Rolim LC, Sá JR, Chacra AR, Dib SA. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy: risk factors, clinical impact and early diagnosis. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(4):e24-31.
116. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:77-89.
117. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968;25(1):192-205.
118. Vogt BL, Richie JP. Glutathione depletion and recovery after acute ethanol administration in the aging mouse. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(10):1613-21.
119. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006;7:3.

120. Rienzo M, Schiano C, Casamassimi A, Grimaldi V, Infante T, Napoli C. Identification of valid reference housekeeping genes for gene expression analysis in tumor neovascularization studies. *Clin Transl Oncol*. 2013;15(3):211-8.
121. Zampieri M, Ciccarone F, Guastafierro T, Bacalini MG, Calabrese R, Moreno-Villanueva M, et al. Validation of suitable internal control genes for expression studies in aging. *Mech Ageing Dev*. 2010;131(2):89-95.
122. Zhang X, Ding L, Sandford AJ. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2005;6:4.
123. Galatro TF, Uno M, Oba-Shinjo SM, Almeida AN, Teixeira MJ, Rosemberg S, et al. Differential expression of ID4 and its association with TP53 mutation, SOX2, SOX4 and OCT-4 expression levels. *PLoS One*. 2013;8(4):e61605.
124. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
125. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010;110(6):911-16.e12.
126. Uribarri J, Cai W, Peppia M, Goodman S, Ferrucci L, Striker G, et al. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62(4):427-33.
127. Uribarri J, Cai W, Pyzik R, Goodman S, Chen X, Zhu L, et al. Suppression of native defense mechanisms, SIRT1 and PPAR γ , by dietary glycoxidants precedes disease in adult humans; relevance to lifestyle-engendered chronic diseases. *Amino Acids*. 2014;46(2):301-9.
128. Uribarri J, Peppia M, Cai W, Goldberg T, Lu M, Baliga S, et al. Dietary glycotoxins correlate with circulating advanced glycation end product levels in renal failure patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(3):532-8.
129. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. [Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(7):1096-105.
130. Răchișan AL, Hrușcă A, Căinap S, Pop TL, Andreica M, Miu N, et al. The activity of 8-iso-prostaglandin F2 α as an oxidative stress marker in vivo in

paediatric patients with type 1 diabetes mellitus and associated autoimmunities. *Clin Lab*. 2014;60(2):253-9.

131. García-Ramírez M, Francisco G, García-Arumí E, Hernández C, Martínez R, Andreu AL, et al. Mitochondrial DNA oxidation and manganese superoxide dismutase activity in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab*. 2008;34(2):117-24.

132. Shao N, Kuang HY, Wang N, Gao XY, Hao M, Zou W, et al. Relationship between Oxidant/Antioxidant Markers and Severity of Microalbuminuria in the Early Stage of Nephropathy in Type 2 Diabetic Patients. *J Diabetes Res*. 2013;2013:232404.

133. Negrean M, Stirban A, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Götting C, et al. Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(5):1236-43.

134. Advani A, Gilbert RE, Thai K, Gow RM, Langham RG, Cox AJ, et al. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):730-41.

135. Ago T, Liu T, Zhai P, Chen W, Li H, Molkentin JD, et al. A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell*. 2008;133(6):978-93.

136. Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, Huang D, Bernardo J, Ellis D, et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(1):e54662.

137. Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffmann R, Burz DS, Shekhtman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem*. 2008;283(40):27255-69.

138. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18(1):1-14.

139. Jariyapongskul A, Areebambud C, Suksamrarn S, Mekseepralard C. Alpha-Mangostin Attenuation of Hyperglycemia-Induced Ocular Hypoperfusion and Blood Retinal Barrier Leakage in the Early Stage of Type 2 Diabetes Rats. *BioMed Research International* [Internet]. 2015; Volume 2015:[1-10 pp.].

140. Thallas-Bonke V, Coughlan MT, Tan AL, Harcourt BE, Morgan PE, Davies MJ, et al. Targeting the AGE-RAGE axis improves renal function in the context of a healthy

diet low in advanced glycation end-product content. *Nephrology (Carlton)*. 2013;18(1):47-56.

141. Lee H, Chu SH, Park JY, Park HK, Im JA, Lee JW. Visceral adiposity is associated with SIRT1 expression in peripheral blood mononuclear cells: a pilot study. *Endocr J*. 2013;60(11):1269-73.

142. Perkins BA, Rabbani N, Weston A, Ficociello LH, Adaikalakoteswari A, Niewczas M, et al. Serum levels of advanced glycation endproducts and other markers of protein damage in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(4):e35655.

143. Kender Z, Fleming T, Kopf S, Torzsa P, Grolmusz V, Herzig S, et al. Effect of metformin on methylglyoxal metabolism in patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014;122(5):316-9.

144. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep*. 2014;14(1):453.