Diego Juvenal Gomes

**Aterogênese induzida por albumina modificada por glicação
avançada em camundongos dislipidêmicos é prevenida pelo
tratamento com losartana**

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

São Paulo
2015

DIEGO JUVENAL GOMES

**Aterogênese induzida por albumina modificada por
glicação avançada em camundongos dislipidêmicos é
previnida pelo tratamento com losartana**

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Dra. Marisa Passarelli

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

Gomes, Diego Juvenal

Aterogênese induzida por albumina modificada por glicação avançada em camundongos dislipidêmicos é prevenida pelo tratamento com losartana / Diego Juvenal Gomes. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Marisa Passarelli.

Descritores: 1.Produtos finais de glicação avançada 2.Aterosclerose 3.Albumina sérica 4.Estresse oxidativo 5.Colesterol 6.Inflamação 7.Losartan 8.Camundongos

USP/FM/DBD-237/15

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM 10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, com a colaboração do Laboratório de Matriz Extracelular (LIM 17) da Disciplina de Reumatologia, do Departamento de Clínica Médica, Laboratório de Histomorfometria e Genômica Pulmonar do Departamento de Patologia e do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apoio financeiro FAPESP – 2011/04631-0 e 2012/19755-9, CAPES 158314/2014-0 e CNPq. Projeto aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (135/10).

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Domingos e Maria José, que acreditaram na minha capacidade em ser o primeiro a trilhar um caminho jamais percorrido por eles; e aos meus sobrinhos, Lucas e Thaís, que me motivam a servir-lhes de exemplo e a demonstrar o quão longe eles podem chegar.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora doutora Marisa Passarelli, por ter permitido que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa, por ter me estimulado a descobrir esse amplo mundo da pesquisa me ensinado a pensar com sua maneira independente, profissional e crítica. Agradeço por muitas vezes ter me dado conselhos pessoais, dividir as alegrias do dia-a-dia cantarolando em nosso karaokê imaginário e por nunca ter me deixado desanimar frente a qualquer intempere no decorrer desse trabalho, sempre me dando uma palavra de conforto ou uma crítica construtiva.

Ao meu querido amigo doutor Sergio Catanozi, Serjones, por sempre estar interessado em discutir meus dados, em conversar sobre música, profissões e objetivos, por fazermos piadas e brincadeiras com outros amigos do laboratório ou sobre o sistema renina-angiotensina. Obrigado principalmente, pela realização das cirurgias, por lutarmos juntos para solucionar as adversidades que por vezes apareceram nessa trajetória, além dos contatos feitos com outros profissionais para que esse projeto fosse desenvolvido.

À doutora Edna Regina Nakandakare, chefe do laboratório, por zelar pelo grupo LIM10, por permitir meu ingresso nessa família, que tenho como exemplo de trabalho em equipe; agradeço por estar sempre disposta a sanar minhas dúvidas com estatística e por permitir que realizássemos nossas tradicionais festinhas juninas, nos presenteando com seu incrível pavê de amendoim.

Ao doutor Eder Carlos Rocha Quintão, professor emérito da Faculdade de Medicina da USP, fundador do Laboratório de Lípidos, por em momento algum, nesses seis anos em que participo da família LIM10, se negar a dividir seu fantástico conhecimento sobre a vida e por abrir as portas de sua casa para nossas confraternizações de final de ano, como membros de sua família. Suas maravilhosas histórias sobre Ciência e Arte e sua admirável trajetória pessoal alimentaram minha vontade à investigação.

À mestre Fernanda Bueno Fusco, Fê, não somente por ter sido minha companheira de bancada e biotério, me ajudando com protocolos quando não pude estar presente no laboratório e revezar comigo o manejo dos animais durante os incontáveis finais de semana, mas também, por ser sempre tão solícita, por sempre ter me dado uma palavra de incentivo e ânimo, mesmo quando ela própria necessitava do mesmo.

À mestre Karolline Santana da Silva, Nêga, por sua incansável vontade em me fazer bem durante nossos experimentos e momentos de desespero, por sempre me pedir calma e me colocar no eixo depois de um breve surto psicótico, por me ajudar com meus experimentos, por me acompanhar durante os congressos e, principalmente, por sua amizade, aceitando minhas brincadeiras e loucuras, além da nossa participação no videoclipe de Vanessa da Mata.

À mestre Paula Ramos Pinto, Paulinha, pelo exemplo de sempre querer fazer tudo beirando à perfeição, por sua organização, pela ajuda nos protocolos, pelas divertidas experiências em congressos, pela nossa sinceridade em expor o que pensamos sem receio nem mágoas, pelos nossos “fervos” e por você ter

se tornado uma irmã nessa trajetória, um vez que nossas histórias pessoais são bem parecidas.

À mestre Tatiana Martins Venâncio, Tática, por dividir comigo toda uma experiência de vida, fosse durante a bancada, nos almoços no “bandejão”, nos passeios no parque ou pelos inesquecíveis *happy-hours*, sempre me fazendo refletir sobre as minhas próprias opiniões, me dando um choque de realidade e dividindo comigo muitas de suas angústias.

À mestre Juliana Tironi Machado, Ju, por fazer dessa jornada um mar de gargalhadas, alegrias e companheirismo, por me fazer traduzir resumos e as aulas em inglês com a cobrança de um general, pela divertidíssima madrugada de jogos e brincadeiras depois da minha primeira apresentação em congresso e por todos os outros nossos momentos fora do laboratório.

À mestre Milessa da Silva Afonso, Tchura, por trazer sua alegria ao laboratório todas as manhãs com assobios e uma nova canção engatilhada em seu fone de ouvido, pelo nosso dueto coreografado imaginário que seria “sucesso”, como você mesmo diz, por confiar em mim e dividir muitos dos seus desabafos, por acreditar em meu profissionalismo, pelas nossas aulas de inglês regadas a muita diversão, pelos nossos almoços e momentos nessa trajetória.

À mestre Maria Sílvia Ferrari Lavrador, Marokíta, por todas as nossas conversas, apoio, aulas de inglês seguido de jantares e pela sua companhia animada, por me fazer rir das minhas próprias brincadeiras e sempre ter uma sugestão interessante a ser dada, fosse de um método experimental a um

restaurante popular. Agradeço pelos ótimos momentos que dividimos e pela grande ajuda pessoal nos momentos em que mais precisei.

Ao doutor Rodrigo Tallada Iborra, Rô, por ser sempre muito mais que um parceiro de laboratório, por ser um amigo e companheiro de quarto durante os congressos (já que as mulheres dominam essa família LIM10), por nunca ter demonstrado qualquer preconceito sobre mim, por estar disposto a estender uma mão mesmo quando não havia mais possibilidade de ajuda, pelos almoços e conversas mirabolantes durante o “bandejão”, por sempre participar da discussão dos meus dados contribuindo com seu amplo conhecimento.

À doutora Adriana Saldiba Machado-Lima, Dri, uma amiga que me ensinou que mesmo sendo árduo o caminho, a força de vontade em se fazer melhor supera qualquer obstáculo. Obrigado por me ensinar o ABC do laboratório, principalmente com a glicação das albuminas, por sempre administrar nosso cronograma durante os congressos e por seu pensamento positivo frente às adversidades da vida.

À doutora Lígia Shimabukuro Okuda, Li, por me ensinar a manusear os animais corretamente e a trabalhar de maneira mais organizada, por conversas diretamente da Austrália, nunca permitindo que eu me abatesse e pelo exemplo de que às vezes, precisamos arriscar.

À doutora Gabriela Castilho, por dividir comigo momentos divertidíssimos sentados à bancada, pelo karaokê inesquecível cantando Madonna e por deixar-me aprender com todo o conhecimento científico que transborda, tenho em você um exemplo profissional.

À doutora Valéria Sutti Nunes, Val, por nunca ter hesitado em responder quaisquer que fossem minhas dúvidas, por conhecer o funcionamento do laboratório de A à Z, por contribuir com uma sugestão ou crítica, por dividir gostosas bolachinhas no final da tarde, quando o cérebro quer dar aquela pifada, por ajudar a organizar nossas festinhas, por fazer dos nossos dias momentos melhores com sua energia boa, suas conversas e dicas super culturais, ecológicas ou radicais, além de sua disposição em ajudar e de seu conhecimento invejável.

À doutora Patrícia Miralda Cazita, Paty, por apostar no meu senso de humor em dividir algumas de suas experiências engraçadas, pelas conversas no decorrer do dia, pelas nossas análises não somente sobre ciência, mas sobre moda e cinema, por nossas piadas ácidas um com o outro e, principalmente, por me ajudar a entender conceitos químicos de uma maneira óbvia.

À doutora Ana Maria Pita Lottemberg, Ana, por gostar de discutir os principais assuntos do dia comigo, por fazer parte do grupo de amigos que participaram de momentos importantes da minha história, por me ajudar a realizar minha primeira viagem internacional, por apostar na minha capacidade profissional quando me convidou a participar como palestrante da ANAD e por nunca me deixar abater frente dias ruins. Eu nunca me esquecerei do bilhete de incentivo e a recomendação para compra de um livro.

À Fabiana Ferreira, Fabi, e a Kelly Gomes, Kelitcha, duas das mais divertidas técnicas de laboratório, por toda a ajuda no decorrer desse projeto, por me ajudarem a encontrar equipamentos, solventes, reagentes e outros

materiais, por ouvirem meus desabafos e cantorias, por sempre apoiarem às nossas celebrações de meio de ano, além de sempre me divertirem, permitindo com que eu fizesse comentários engraçados durante uma conversa séria, sem se magoarem.

À Claudia Souza, Clau, que por muitas vezes parou o que estava fazendo para me ajudar com alguma burocracia administrativa, agradeço pela responsabilidade com que levastes a administração desse projeto, pelas conversas, cafés e brincadeiras.

À Jussara Rocha, Ju, por ter me ensinado o mais básico de tudo sobre o laboratório e suas técnicas, sempre de maneira solícita e com um sorriso no rosto.

À Rosibel Silva, pelas conversas, pelo cafezinho e pela organização das salas; e à dona Ana, por deixar tudo sempre limpo para que pudéssemos trabalhar.

À Senária Eguti, Se, e a Maria Aparecida da Silva, Cida, secretárias da pós-graduação que nunca deixaram de me ajudar, desde às exigências do Programa, até à candidatura para bolsas de estudos.

Aos doutores Mônica Neves e Ísio Schultz pelas contribuições em nossas reuniões científicas semanais.

Àqueles que tiveram uma passagem breve pelo laboratório: Karina Oliveira, por conversas superengraçadas que fizeram as tardes passar bem rápido; Eliton Juniro da Silva, por me ajudar com os protocolos e sempre

demonstrar interesse sobre a minha pesquisa, discutindo e perguntando, além de se tornar confidente sobre os problemas que somente nós entenderíamos. Simone Batista e Bruna Lacerda, por contribuírem para que os dias fossem melhores e sempre tivéssemos um assunto diferente para conversar.

À nova geração dessa família LIM10, Lis Mie, Guilherme Ferreira, Ana Paula Lembo, e Vanessa Del Bianco, que já participam com muita vontade da rotina do laboratório e nos ajudam a relembrar conceitos básicos do que aprendemos. Muito sucesso nesse caminho.

Às doutoras Walcy Paganelli Rosolia Teodoro, responsável pelo Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia, e Ana Paula Velosa, por acreditarem neste projeto e aceitarem participar do desenvolvimento do mesmo. Dra Walcy, agradeço-a por todas as longas tardes em seu laboratório regadas a muito bom humor, conversas, um antigo rádio tocando músicas dos anos 80 e por sempre me tratar como membro do seu grupo.

Às alunas Isabelle Camargo e Verônica Protoceovich, membros do laboratório da Dra. Walcy, por me ajudarem nas análises histomorfométricas e de imunofluorescência.

Aos egressos do nosso grupo que contribuíram de maneira importante à minha trajetória: doutor Raphael Souza Pinto, por toda ajuda de bancada; doutora Débora Rocco, por me ajudar a entender, logo que entrei para o laboratório, muito do que havia sido discutido nas reuniões científicas; doutora Roberta Marcondes Machado, por “velejar” comigo em discussões de artigos, sempre com bom humor; doutora Renata Bombo, pelas conversas, brincadeiras

e dicas de viagens; e doutora Camila Canteiro, pelas preciosas dicas sobre qRT-PCR.

À Aritânia Sousa Santos, Taninha, do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios – LIM18, por me ajudar e entender biologia molecular um pouco melhor e principalmente por, juntamente à responsável pelo laboratório Dra. Maria Elizabeth Rossi, permitir que parte dos experimentos deste projeto fosse realizada nos equipamentos de seu grupo.

À doutora Maria Lúcia Corrêa-Gianella, do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular - LIM 25, por permitir que parte dos experimentos deste projeto fosse desenvolvida em seu laboratório, sob supervisão da bióloga Ana Mercedes Cavaleiro ou das alunas (e amigas) Beatriz Monteiro e Danielle Santos.

A todos os amigos e responsáveis pelo Laboratório de Pesquisa Básica em Nefrologia – LIM 12 e pelo Laboratório de Fisiopatologia Renal – LIM 16, por permitirem que eu realizasse parte dos meus experimentos em seus laboratórios.

Ao Antônio dos Santos Filho, Valdeci Francisco da Silva e Valter Marques da Silva, pela manutenção do biotério da Disciplina de Reumatologia da FMUSP, em especial pelo cuidado com meus animais, os quais sempre respeitei e agradei.

À Evangélia Athanassopoulos, Lúcia Nascimento e Cláudia Kuribara, minhas professoras do colégio, e Cláudia Maria Alarcon, da universidade Nove de Julho, por alimentarem minha vontade por Ciências.

Aos meus queridos amigos da graduação, Raquel Cavallari, Camila Brandt, Gabriela Ferreira, Fernando Martins, Rosana Gruber, Rodrigo Oliveira, Cintia Perez e Alexandre Andrade por sempre me apoiarem nos estudos e na vida pessoal, fazendo com que eu acreditasse cada vez mais em mim, em especial, minha amiga Cassia Puci, que conseguiu o e-mail do laboratório, me dando assim, a oportunidade de entrar em contato com o LIM 10.

À minha grande amiga Meire Ellen Moreira Passos por sempre me apoiar, mesmo quando não parecia haver luz no fim do túnel.

A todos da minha família, em especial aos meus pais, Maria José e Domingos, e minha irmã-mãe, Dilma, por nunca terem desistido de acreditar em mim, por me ensinarem que nada na vida surge de maneira fácil, por jamais terem cogitado a ideia de mudar meus planos quanto à pós-graduação, mesmo sem entenderem, muitas vezes, o quão árduo esse processo é, por me estimularem a estudar, dar o melhor de mim, conseguir ter acesso àquilo que eles nunca tiveram e se orgulharem por isso.

Ao meu namorado Justin Ryan Kjerulf, por recarregar minhas energias e confiança sobre minha capacidade ao final desse doutorado, por ter orgulho do meu trabalho e esforço, sempre demonstrando muito interesse na minha pesquisa e me ajudando a pensar grande.

Aos demais amigos João Gabriel Koepke, Raphael Polezi, Ciro Marino, Eduardo D'Angelo, Caio Marco Bego, Ana Paula Chaves e Leandro Rodriguez, que contribuíram direta e indiretamente durante toda essa trajetória, seja com

uma carona até o laboratório em um final de semana, uma conversa para desabafar, ou uma festa ao final de uma sexta-feira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

*“Levante-se e vá ver o sol, tomar um banho
de mar ou cachoeira, buscar um amanhã
melhor. O amanhã se busca hoje, agora!”*

(Vanessa da Mata)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença macrovascular aterosclerótica	1
1.2 Produtos de glicação avançada	3
1.3 Produtos de glicação avançada e aterosclerose	9
1.4 Produtos de glicação avançada e fluxo de lípides em macrófagos	11
1.5 Produtos de glicação avançada e sistema renina-angiotensina	13
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Preparo da albumina murina por glicolaldeído (in vitro)	22
4.2 Modelo animal	23
4.3 Dosagens bioquímicas	24
4.4 Injeção intraperitoneal de albumina C ou albumina AGE nos animais ...	25
4.5 Tratamento com losartana	25
4.6 Medida da pressão arterial sistólica caudal – Pac	26
4.7 Preparo das Amostras para Microscopia Óptica e de fluorescência	26
4.8 Obtenção do arco aórtico para quantificação de mRNA	27
4.9 Histomorfometria do Depósito Lipídico	27
4.10 Imunofluorescência	28

4.11 Imuno-histoquímica para CD-68	30
4.12 Coloração com hematoxilina e eosina	31
4.13 Ensaio da resposta inflamatória de macrófagos peritoneais	32
4.14 Quantificação do conteúdo do mRNA e expressão gênica de macrófagos peritoneais e do arco aórtico por reação de transcrição reversa quantitativa seguida de reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR)	33
4.15 Análise estatística	35
5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	36
6. RESULTADOS	38
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	66
9. REFERÊNCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

3-DG – 3-deoxi-glicosona

4-HNE – 4-hidroxi-nonenal

ABCA-1 – Transportador cassete de ligação a ATP, subfamília A, membro 1

ABCG-1 – Transportador cassete de ligação a ATP, subfamília G, membro 1

ACAT – Acetil-acil transferase

AGE – Produtos de glicação avançada

ANG-(1-12) – Angiotensina 1-12

ANG – Angiotensina 1-7

ANG I – Angiotensina I

ANG II – Angiotensina II

apoA-1 – Apolipoproteína A-I

apoE – Apolipoproteína E

AT-1 – Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT-2 – Receptor de angiotensina II do tipo 2

B-E – Receptor do tipo B-E

cDNA – Ácido dextrorribonucleico complementar

CD-36 – Cluster de diferenciação 36

CD-68 – Cluster de diferenciação 68

CML – Carboximetil-lisina

CT – Colesterol total

DAB – 3, 3'-diaminobenzidina

DM – Diabetes melito

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOLD – Dímero de deoxiglucosona-lisina

DP – Desvio padrão

ECA – Enzima conversora de Angiotensina I

ECA2 – Enzima conversora de angiotensina II

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK – Cinase regulada por sinal extracelular (*extracellular signal-regulated kinase*)

GAD – Glicolaldeído

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFAT – Glutamina frutose 6-fosfato aminotransferase

GO – Glioxal

HbA1c – Hemoglobina glicada

HDL – Lipoproteína de densidade alta

HE – Hematoxilina-eosina

HMGCoA redutase – Hidroxi-3-Metil-Glutaril CoA redutase

ICAM-1 – Molécula de adesão Intracelular

IL-1 α – Interleucina 1 α

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-18 – Interleucina 18

IL-6 – Interleucina 6

JNK – *c-Jun N-terminal kinase*

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LOS – Losartana

LOX-1 – Receptor de LDL oxidada

LPS – Lipopolissacarídeo

MAP-cinase – Proteína Cinase Ativada por Mitógenos

MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MGO – Metilglioxal

MOLD – Dímero de metilglioxal-lisina

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH oxidase – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato-Oxidase

NF-κB – Fator Nuclear Kappa B

NLR – Receptor de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos

NLRP3 – Receptor do tipo *NOD* contendo domínio de pirina 3

NO – Óxido Nítrico

NOD – Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos

NOS – Óxido Nítrico Sintase

Nox2 – Isoforma 2 da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

Nox4 – isoforma 4 da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

PARP – Poli ADP-ribose polimerase

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Solução Fosfato Tamponada

qRT-PCR – Transcrição reversa quantitativa seguida de reação em cadeia da polimerase

RAGE – Receptor para Produtos de Glicação Avançada

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SR-A – Receptor do tipo *scavenger* da classe A

SRA – Sistema renina-angiotensina

sRAGE – Forma solúvel do receptor para produtos de glicação avançada

SR-BI – Receptor do tipo *scavenger* da classe B-I

TG – Triglicérides

TLR – Receptor do tipo *toll*

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral A

UDP – Uridina difosfato

VCAM-1 – Molécula de Adesão de Célula Vascular

VLDL – Lipoproteínas de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Albumina controle e albumina modificada por glicação avançada in vitro.....	23
Figura 2. Análise histomorfométrica para quantificação de depósito lipídico por coloração com Oil Red-O.....	30
Figura 3. Infiltrado lipídico no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS.	39
Figura 4. Expressão de mRNA de Ager, Tnf e Msr1 no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LO, por qRT-PCR em tempo real..	41
Figura 5. Expressão de mRNA de Cybb, Orl1, Abca1 e Abcg1 no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real.	42
Figura 6. Expressão de mRNA de Agtr1a, Agt e Nfkb no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real..	44
Figura 7. Imunofluorescência para AT-1 no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS	45
Figura 8. Imunofluorescência para CML no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS.....	46
Figura 9. Imunofluorescência para RAGE no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS.	48
Figura 10. Imunofluorescência para 4-HNE no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS.	49
Figura 11. Imagens representativas de cortes histológicos do arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, corados por hematoxilina-eosina.....	50

Figura 12. Imagens representativas de cortes histológicos do arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, marcados para CD-68 por histoquímica.	51
Figura 13. Expressão de mRNA de Il1b e Il18 no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real.	52
Figura 14. Expressão de mRNA de Il1b e Il18 em macrófagos peritoneais de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real.	53
Figura 15. Secreção de IL-6 por macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por ELISA.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso corporal, perfil bioquímico e pressão arterial sistólica dos camundongos apoE tratados com albumina controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência de losartana, nos períodos basal e final..... 38

RESUMO

Gomes DJ. *Aterogênese induzida por albumina modificada por glicação avançada em camundongos dislipidêmicos é prevenida pelo tratamento com losartana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: Produtos de glicação avançada (AGE) encontram-se aumentados no diabetes melito e contribuem independentemente para o risco cardiovascular. O reconhecimento dos AGE pelo receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) potencializa vias de sinalização pró-aterogênicas. Antagonistas do receptor de angiotensina II (ANGII) do tipo 1 (AT-1) diminuem a expressão de RAGE em área de lesão aterosclerótica. No presente projeto, avaliou-se, na aorta de camundongos dislipidêmicos (*knockout* para apoE) tratados ou não com inibidor do receptor AT-1 (losartana, LOS), o efeito do tratamento crônico com albumina-AGE sobre o infiltrado de lípidos, a expressão de mRNA e proteínas envolvidas no eixo AGE/RAGE, ANGII/AT-1, modulação da resposta inflamatória e fluxo de lípidos, além da secreção de citocinas inflamatórias por macrófagos tratados com albumina controle ou AGE, concomitantemente ou não a losartana, isolados da cavidade peritoneal de camundongos apoE *knockout*. **MÉTODOS:** Camundongos machos *knockout* para apoE de 12 semanas de idade foram mantidos em dieta padrão e divididos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n = 20/grupo): grupo Controle (C), C+LOS, albumina-AGE (AGE) e AGE+LOS. Os animais receberam injeção intraperitoneal diária, durante 30 dias, de 2 mg de albumina controle (grupos C e C+LOS) ou albumina AGE (AGE e AGE+LOS). Os animais C+LOS e AGE+LOS foram tratados durante todo o período experimental com losartana (100 mg/L água). Secções do arco aórtico foram utilizadas para imunofluorescência para RAGE, carboximetil-lisina (CML), AT-1 e 4-hidroxinonenal (4-HNE) e determinação infiltrado lipídico por coloração com *Oil Red-O*. Análise do mRNA de *Ager* (RAGE), *Agtr1a* (AT-1), *Orl1* (LOX-1), *Msr1* (MCP-1), *Ccl2* (SR-A), *Cybb* (Nox2), *Nfkb* (NF-κB), *Tnf* (TNF-α), *Abca1* (ABCA-1), *Abcg1* (ABCG-1) e *Agt* (angiotensinogênio) foi realizada por qRT-PCR. Ensaio *in vitro* para secreção de IL-6 por ELISA e expressão de *Il1b* (IL-1β) e *Il18* (IL-18) por qRT-PCR, foi realizado com macrófagos peritoneais isolados

camundongos apoE *knockout* incubados com albumina C ou AGE (2 mg/mL), concomitante ou não ao tratamento com losartana (1 µM). RESULTADOS: Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso corporal, colesterol total, triglicérides e glicose plasmáticos, no período basal e final. A pressão arterial sistólica foi reduzida nos animais tratados com losartana quando comparados aos não tratados ($p < 0,05$). Não foi detectada a presença de infiltrado macrófagico na aorta por meio de ensaios de imunofluorescência para CD-68 e pela análise de coloração com hematoxilina-eosina. Todavia, o infiltrado de lípidos foi 5,3 e 2 vezes maior no grupo AGE quando comparado, respectivamente, ao grupo C e AGE+LOS ($p < 0,05$). O conteúdo proteico de RAGE e CML, assim como do marcador de peroxidação lipídica (4-HNE) foi maior no grupo AGE em comparação aos demais grupos, o que não foi prevenido no grupo AGE+LOS ($p < 0,05$). A expressão do mRNA de *Ager*, *Orl1* e *Tnf* foi maior no grupo AGE em comparação ao C, ao passo que o tratamento com losartana impediu o aumento da expressão destes genes ($p < 0,05$). Isto não foi observado para aumento de *Cybb* estimulado por albumina-AGE. A losartana diminuiu o mRNA de *Agtr1a* (AT-1) em ambos os grupos tratados. Não foram observadas diferenças na expressão do mRNA de *Msr1*, *Ccl2*, *Abca1*, *Abcg1*, *Agt* e *Nfkb*. Macrófagos tratados com albumina-AGE apresentaram secreção de IL-6 aumentada em 1,4 vezes em comparação ao grupo C, o que foi prevenido pela losartana ($p < 0,05$). Nestas mesmas células, a albumina-AGE aumentou a expressão de *Il1b* e *Il18*, em comparação à albumina-C, o que não foi prevenido pela losartana. CONCLUSÃO: A administração crônica de albumina-AGE em modelo animal de dislipidemia isento de DM, aumentou o infiltrado de lípidos no arco aórtico, independentemente de variação na pressão arterial, lípidos plasmáticos e da modulação local de componentes do sistema renina-angiotensina. A ação da albumina-AGE foi consequente ao maior insulto oxidativo e inflamatório associado ao maior conteúdo de RAGE e CML. A losartana, por reduzir o insulto oxidativo e inflamatório contrapõe-se à albumina-AGE, contribuindo para prevenção da aterogênese.

Descritores: produtos finais de glicação avançada; aterosclerose; albumina sérica; estresse oxidativo; colesterol; inflamação; losartan; camundongos

ABSTRACT

Gomes DJ. *Atherogenesis induced by advanced glycated albumin in dyslipidemic mice is prevented by losartan* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010.

INTRODUCTION: Advanced glycated end-products (AGE) elevated in diabetes mellitus and independently contribute to cardiovascular risk. The AGE binding to the receptor for AGE (RAGE) potentializes pro-atherogenic signaling pathways. Antagonists of angiotensin II receptor type 1 (AT-1) diminish RAGE expression in atherosclerotic plaques. In this study, we evaluated in the aortic arch of dyslipidemic mice (apoE knockout), treated or not with AT-1 blocker losartan (LOS), the effect of chronic treatment with AGE-albumin in aortic root lipid infiltration, mRNA expression and protein content of components of AGE/RAGE, ANGII/AT-1 axes and modulators of lipid flux and inflammation, and also the secretion of inflammatory cytokines by peritoneal macrophages treated either with control (C) or AGE-albumin, together with or not by losartan treatment,.

METHODS: 12-week old male apoE knockout mice were fed chow diet and randomly assigned into four groups (n = 20/group): Control (C), C+LOS, AGE-albumin (AGE) and AGE+LOS. Animals received daily intraperitoneal injection of 2 mg of C- albumin (C and C+LOS) or AGE-albumin (AGE and AGE+LOS) during 30 days. LOS groups were treated with losartan (100 mg/L water). Immunofluorescence for RAGE, AT-1, carboxymethyllysine (CML) and 4-hydroxynonenal (4-HNE), and Oil red-O staining for lipid infiltration was performed in sections from the aortic arch. mRNA expression of *Ager* (RAGE), *Agtr1a* (AT-1), *Orl1* (LOX-1), *Msr1* (MCP-1), *Ccl2* (SR-A), *Cybb* (Nox2), *Nfkb* (NF- κ B), *Tnf* (TNF- α), *Abca1* (ABCA-1), *Abcg1* (ABCG-1) e *Agt* (angiotensinogen) was evaluated by qRT-PCR. In vitro assay for IL-6 secretion was performed by ELISA and *Il1b* (IL-1 β) and *Il18* (IL-18) mRNA expression was performed by qRT-PCR in peritoneal macrophages from apoE knockout mice after treatment with C or AGE-albumin (2 mg/mL), with or without losartan (1 μ M).

RESULTS: No differences among groups were observed in body weight, plasma total cholesterol, triglycerides and glucose in basal and final periods. Systolic blood

pressure was reduced in both LOS groups when compared to non-treated groups ($p < 0.05$). It was not observed CD-68 infiltration in the arterial wall. However, lipid infiltration was, respectively, 5.3 and 2 times greater in AGE group in comparison to C and AGE+LOS groups ($p < 0.05$). RAGE and CML protein and the lipid peroxidation marker (4-HNE) were greater in AGE group when compared to other groups, which was prevented in AGE+LOS ($p < 0.05$). *Ager*, *Orl1* and *Tnf* mRNA expression was increased in AGE group when compared to C, and losartan was able to prevent this event ($p < 0.05$), except for *Cybb*. Losartan decreased *Agtr1a* mRNA expression in both groups ($p < 0.05$). No differences were observed among groups for *Msr1*, *Ccl2*, *Abca1*, *Abcg1*, *Agt* and *Nfkb* mRNA expression. Macrophages treated with AGE-albumin presented 1.4 times great IL-6 secretion, which was prevented by losartan ($p < 0.05$). In these cells, AGE-albumin increased *Il1b* and *Il18* mRNA expression in AGE group, but this was not prevented by losartan. CONCLUSION: Chronic administration of AGE-albumin in non diabetic dyslipidemic mice increased aortic lipid infiltration, independently of changes in blood pressure, plasma lipids and local modulation of renin angiotensin system components. The role of AGE-albumin was consequent to the enhanced inflammatory and oxidative insult associated to the higher content of CML and RAGE. Losartan by reducing oxidation and inflammation counteracts the effects of AGE-albumin contributing to prevent atherogenesis.

Descriptors: glycosylation end products, advanced; atherosclerosis; serum albumin; oxidative stress; cholesterol; inflammation; losartan; mice

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença macrovascular aterosclerótica

O desenvolvimento da doença macrovascular aterosclerótica caracteriza-se pelo desbalanço entre a captação, por macrófagos, de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e a remoção do excesso de colesterol dessas células pelas lipoproteínas de densidade alta (HDL). Este processo é o reflexo de alteração na concentração de LDL e HDL, bem como de modificações químicas em sua estrutura (Yu *et al.*, 2013).

O conteúdo celular de colesterol é finamente regulado por meio do controle da captação de LDL pelos receptores do tipo B-E (B-E), sua esterificação no citosol pela acilcolesterol aciltransferase (ACAT) e sua síntese a partir de acetil CoA, numa série de reações, com a participação da enzima-chave hidroximetilglutaril CoA redutase (HMGCoA redutase). Além disso, a exportação de colesterol livre a aceptores externos, como apoA-1 e subfrações de HDL representa mecanismo de ajuste da concentração intracelular de esteróis. Isto impede o acúmulo de colesterol e óxidos de colesterol, os quais exercem efeitos citotóxicos. Em macrófagos, a expressão de receptores de B-E é bastante pequena, o que impossibilita o controle da transcrição de seu gene, frente ao aumento da concentração intracelular de esteróis. Além disso, macrófagos captam LDL modificadas, por oxidação, glicação, carbamilação, agregação ou associadas a imunocomplexos, por meio de receptores *scavenger*. A transcrição gênica desses receptores é, em geral, positivamente modulada pelo conteúdo intracelular de colesterol e por eventos inflamatórios que são

desencadeadas conjuntamente ao acúmulo lipídico (Ikonen, 2008; Ohashi *et al.*, 2005).

Os receptores que reconhecem LDL modificadas por oxidação (LOX-1) e os receptores da família *scavenger*, como os da classe A (SR-A), B (SR-BI) e CD-36, desempenham papel importante na captação de LDL modificadas pelos macrófagos (Vohra *et al.*, 2006). Ainda destacam-se os receptores para produtos de glicação avançada (RAGE) e os *toll-like receptors* (TLR) que contribuem para o acúmulo intracelular de esteróis e deflagram a resposta inflamatória que agrava a evolução da lesão aterosclerótica (Barlovic *et al.*, 2011; Pant *et al.*, 2014).

A expressão aumentada de citocinas, como TNF- α , IL-6 e moléculas de adesão como molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e da molécula 1 de adesão de células vasculares (VCAM-1) e E-selectinas favorecem a progressão do dano vascular. Há associação entre a expressão e ativação dos receptores LOX-1, o estresse oxidativo e a ativação de inflamassomas do tipo NLRP3 (Harijith *et al.*, 2014). OS NLRP3 são complexos proteicos que medeiam a imunidade inata, compostos por um domínio pirina apresentando receptores de ligação a nucleotídeo contendo uma sequência repetida de resíduos do aminoácido leucina (NOD-like, NLR), um adaptador denominado ASC, que contém uma porção N-terminal de recrutamento de caspase (CARD) e pró-caspase-1 (Schroder & Tschopp, 2010). Tão logo lipopolissacarídeos ou cristais de colesterol são reconhecidos por esses complexos, ocorre oligomerização dos componentes do inflamassoma, seguida de auto-clivagem, e por fim, ativação de caspase 1 (Martinon *et al.*, 2002). A caspase-1 participa do processo de clivagem da pró-interleucina-1 β e pró-interleucina-18 em interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18), respectivamente.

O mecanismo pelo qual há a retirada de colesterol das células periféricas é denominado efluxo de colesterol, o qual inicia o tráfego de colesterol ao fígado e órgãos esteroideogênicos, pelo transporte reverso de colesterol. A exportação do excesso de colesterol para apoA-1 ou HDL ocorre por meio da interação destas com receptores de membrana da família de transportadores cassete de ligação a ATP, subfamília A, membro 1 (ABCA-1) e da subfamília G, membro 1 (ABCG-1), respectivamente. As HDL transportam o colesterol aos tecidos esteroideogênicos e/ou ao fígado, onde é, respectivamente, convertido a hormônios esteroídicos ou eliminado na bile e excretado nas fezes. Este sistema representa importante via antiaterogênica, por modular a concentração intracelular de esteróis em células intimamente envolvidas no processo aterosclerótico (Quintão *et al.*, 2000). Além desta via antiaterogênica, as HDL reduzem o processo inflamatório e a oxidação de LDL na parede vascular, além de potencializarem a resposta vasodilatadora dependente de endotélio (Kontush, 2014).

1.2 Produtos de glicação avançada

A doença macrovascular aterosclerótica é a principal causa de morbidade e mortalidade em portadores de diabetes melito (DM) tipo 1 (DM1) e 2 (DM2). Além dos desarranjos metabólicos clássicos associados ao diabetes, que incluem obesidade central, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperglicemia, estresse inflamatório, defeitos hemostáticos e dislipidemia (hipertrigliceridemia, elevação de LDL pequenas e densas e redução de HDL colesterol), outros parecem agravar o acúmulo de lipídeos na parede arterial. Entre eles, destaca-se a formação de produtos de glicação avançada (AGE) os quais podem ser

formados em decorrência do estresse oxidativo, mas também propagam a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e exacerbam a resposta inflamatória e injúria vascular (Chielli *et al.*, 2013; Leurs & Lindholm, 2013; Hegab *et al.*, 2012; Negre-Salvayre *et al.*, 2009; Goldin *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo celular é apontado como elo na gênese das complicações tardias do diabetes melito (Brownlee, 2001). O aumento da metabolização da glicose ao longo da via glicolítica, na vigência de hiperglicemia, eleva a produção de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria, em especial ânion superóxido. A enzima poli ADP-ribose polimerase (PARP) protege a molécula de DNA nesta condição, embora, promova modificação da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) impedindo sua atividade. Sendo assim, há o desvio de metabólitos da via glicolítica, culminando na geração do oxaldeído metilglioxal (MGO). Este composto é muito reativo com proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, favorecendo sua modificação irreversível por glicação avançada (Allaman *et al.*, 2015; Schalkwijk, 2015).

A geração de diacilglicerol por meio da conversão de diidroxiacetona e gliceraldeído 3P na via glicotica promove a ativação de proteína cinase C, a qual medeia diferentes vias envolvidas nas complicações do DM. Além disso, outras vias ativadas durante a hiperglicemia têm sido investigadas por também convergirem em estresse oxidativo. A via do poliol promove a conversão de glicose em sorbitol, iniciando-se pela ação da enzima aldose redutase com utilização de NADPH como cofator (Tang *et al.*, 2012). Em seguida, a enzima sorbitol-desidrogenase, utilizando NAD, modifica o sorbitol em frutose-3-fosfato (Safi *et al.*, 2014). O consumo de NADPH contribui para diminuir a concentração de glutatona reduzida, o que favorece a geração de espécies reativas de

oxigênio. Além disso, a frutose gerada ao final da via também é capaz de reagir com proteínas e lipídeos, levando à formação de produtos de glicação.

A via das hexosaminas promove a geração de uridina difosfato (UDP) *N*-acetil-glicosamina, graças à ação da glutamina:frutose-6 fosfato aminotransferase (GFAT), que converte frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato. A *N*-acetil-glicosamina interage com resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição, o que altera a expressão de vários genes envolvidos no dano vascular do DM (Brownlee, 2005).

A glicação não enzimática foi descrita, pela primeira vez, em 1912, por um químico francês chamado Louis Camille Maillard. A reação foi observada em alimentos, relacionada à decomposição dos mesmos e evidenciada por seu escurecimento ou *browning* (Hellwig & Henle, 2014). Em 1948, Patton e Hill (1948) descreveram quimicamente a reação de glicosilação como decorrente da reação de ligação entre proteínas e carboidratos. A evidência posterior de uma fração modificada da hemoglobina em indivíduos diabéticos (hemoglobina glicada- HbA1c) favoreceu a compreensão da associação entre glicação e desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares do diabetes melito (Jovanovic & Peterson, 1981).

A ligação não-covalente entre os grupos amino primários ou secundários das proteínas com o grupo carbonila de um aldeído ou açúcares redutores leva à condensação destes compostos e rearranjos moleculares que envolvem processos de desidratação e oxidação, resultando na formação de um composto instável conhecido como base de Schiff. A concentração de glucose ou outro açúcar redutor, assim como o pH alcalino e os grupos amino livres de proteínas têm influência sobre a taxa de rearranjo de Base de Schiff para um composto

intermediário mais estável, o produto Amadori. Entre os produtos Amadori mais utilizados na prática clínica, destacam-se a HbA1c e a frutossamina, utilizadas como índice de controle glicêmico em períodos antecedentes, em geral cerca de 3 meses para a HbA1c e 21 dias para frutossamina - a qual reflete principalmente a modificação de albumina por glicação precoce (Parriello & Selvin, 2014).

O produto de Amadori também pode ser gerado por oxoaldeídos ou α -dicarbonilas altamente reativos como o metilglioxal (MGO), 3-desoxiglicosona (3-DG), e glioxal (GO), como resultado de vias oxidativas ou não-oxidativas (Sakata *et al.*, 2001; Giacco & Brownlee, 2010). MGO e 3-DG podem resultar de processos não-oxidativos. O primeiro também pode ser formado a partir do catabolismo de corpos cetônicos e de treonina, além da fragmentação da triosefosfato. O segundo, pode ser formado a partir de fragmentação de frutose-3-fosfato e hidrólise de adutos Amadori. A oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, conhecida como peroxidação lipídica, pode levar à produção de MGO, 3-DG e GO como resultado da formação de radicais peroxila altamente reativos que geram hidroperóxidos de lípidos e de peróxido de hidrogênio. Esse conjunto de eventos químicos juntamente a estresse inflamatório crônico, leva à geração de AGE em velocidade muito superior aquela desencadeada pela glicose (Singh *et al.*, 2001). Glicolaldeído (GAD) pode ser formado por meio da atividade da mieloperoxidase em neutrófilos ativados, o que reforça o elo entre glicação e processo inflamatório (Anderson *et al.*, 1997).

A elevada afinidade de ligação destes compostos carbonila com resíduos de arginina e lisina promove mais rearranjos que resultam na formação de AGE (Kim *et al.*, 2012). A hidrólise não oxidativa do produto Amadori pode originar pirralina. No entanto, as reações oxidativas, tais como auto-oxidação do produto

Amadori, conhecido como via Hodge, podem conduzir à formação de Nε-[carboximetil]-lisina (CML) e pentosidina. Contudo, os AGE também podem ser formados a partir da clivagem de compostos dicarbonila a partir de uma base de Schiff, conhecido como via de Namiki, e pela formação de compostos carbonila depois da auto-oxidação de monossacáridos, conhecidos como via de Wolff. Oxoaldeídos gerados por esses rearranjos, pela glicoxidação ou através da peroxidação lipídica, sofrem alterações bioquímicas diferentes formando adutos de AGE distintos. Os produtos formados por causa da oxidação são a pentosidina e CML, a via não-oxidativa inclui a geração do dímero de deoxiglucosona-lisina (DOLD) e dímero de metilglioxal-lisina (MOLD) (Ott *et al.*, 2014).

O detalhamento das diferentes vias de geração de AGE torna evidente que a formação desses compostos não se restringe à hiperglicemia e, portanto, ao diabetes melito. De fato, observa-se maior concentração circulante e tecidual de AGE na doença renal crônica, onde a depuração de intermediários reativos encontra-se prejudicada frente à redução da função renal. Além disso, as terapias substitutivas, como diálise peritoneal (Arsov *et al.*, 2014) e hemodiálise (Siriopol *et al.*, 2015), também favorecem a geração de AGE.

A elevada reatividade dos oxoaldeídos promove a modificação de macromoléculas de meia-vida curta e média, como é o caso das lipoproteínas e da albumina.

Finalmente, como fontes exógenas de AGE incluem-se os alimentos e o tabaco. Uribarri e colaboradores investigaram a quantidade de AGE em um grande grupo de alimentos, sendo de concentração mínima em vegetais e aumentada em itens processados, especialmente nos enriquecidos em gordura

(Uribarri *et al.*, 2010). No entanto, devido às suas características de heterogeneidade, a mensuração dos AGE derivados de alimentos se torna complexa. Essa concentração também varia de acordo com métodos de cocção utilizados uma vez que o calor aplicado ao preparo dos alimentos leva à reação de Maillard, favorecendo a formação de AGE.

Evidencia-se que apenas cerca de 10% dos AGE consumidos na alimentação são absorvidos no trato gastrointestinal, sendo transportados na circulação em associação à albumina e às lipoproteínas. Deste total, dois terços permanecem na circulação por aproximadamente 72 h (Vlassara & Uribarri, 2014; Luevano-Contreras & Chapman-Novakofski, 2010; Goldberg *et al.*, 2004). Embora ainda haja muita controversa sobre o impacto dos AGE de origem alimentar sobre a saúde humana, a restrição do seu consumo em humanos e modelos animais está associada com a redução de sua concentração na circulação, diminuição da resistência insulínica e vias inflamatórias e aumento da longevidade. Por outro lado, o elevado consumo de dieta rica em AGE associa-se com perda de capacidade cognitiva e memória em idosos (West *et al.*, 2014).

Cai e colaboradores (2004) demonstraram que a LDL modificada por AGE, isolada de portadores de diabetes melito que ingeriram dieta rica em AGE, aumenta as vias de sinalização intracelular associadas à produção de marcadores inflamatórios. Todavia, embora estudos tenham associado o consumo de dieta rica AGE com distúrbios metabólicos capazes de desencadear ou acelerar a resistência insulínica e inflamação, ainda não é conhecida a quantidade ideal de consumo AGE. Salienta-se que dietas com menor conteúdo

de AGE são também aquelas com preparo mais saudável, menor conteúdo de gordura e alimentos industrializados.

1.3 Produtos de glicação avançada e aterosclerose

A concentração sérica e tecidual dos AGE está elevada no diabetes melito e na doença renal crônica. No primeiro caso, o estresse carbonila deve-se ao aumento de substrato (hiperglicemia) ou picos de hiperglicemia no período pós-prandial e, no segundo, ao prejuízo na destoxificação de intermediários reativos da reação de glicação. Em tais doenças, a concentração de oxoaldeídos na circulação é elevada e se correlaciona com a incidência de complicações macrovasculares ateroscleróticas (Saito *et al.*, 2010; Chang & Wu, 2006). Carboximetil-lisina (CML), carboxietillisina, pentosidina, dímeros de glioxal e metilglioxal são os principais AGE formados no organismo, sendo a CML encontrada em áreas de lesão aterosclerótica em modelos de diabetes melito, acelerando o processo de calcificação da placa (Wang *et al.*, 2012), e hipercolesterolemia (Leurs & Lindholm, 2013; Singh *et al.*, 2001; Bierhaus *et al.*, 1998).

RAGE é uma proteína transmembrana multiligante do tipo I, da família das imunoglobulinas que exerce papel importante nas alterações metabólicas associadas ao acúmulo de AGE (Barlovic *et al.*, 2011). A ativação do RAGE medeia sinalização intracelular relacionada à progressão da doença aterosclerótica, o qual resulta da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e citocinas (Rojas *et al.*, 2013; Basta, 2008). A internalização do complexo AGE e seu receptor RAGE é necessária para que ocorra transdução de sinal intracelular, com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio

via NADPH oxidase, diminuição de óxido nítrico sintase endotelial (NOS) e óxido nítrico (NO), fosforilação da ERK (*extracellular regulated kinase*), JNK (*JUN N-terminal kinase*), MAP-cinase (p38, p48) e maior ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). Este fator de transcrição, além de estar implicado nos processos fisiopatológicos da hiperglicemia, relaciona-se ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, incluindo IL-6 e IL-1 α , TNF- α , fatores de crescimento, moléculas de adesão e o próprio RAGE, o que agrava a sinalização desta via e cria um ciclo vicioso (Yao & Brownlee, 2010; Sevillano *et al.*, 2009; Bierhaus *et al.*, 2001). Em células endoteliais, os AGE e o TNF- α aumentam a expressão de RAGE por meio da ativação do complexo p65/p50 do NF-kB. Nesse contexto, a exposição crônica aos AGE e ao TNF- α poderia levar a um acúmulo de AGE nos vasos, resultando em exacerbação das disfunções vasculares (Chen *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2000).

Em camundongos *knockout* para o receptor de LDL e para o RAGE, alimentados com dieta aterogênica, observou-se redução do tamanho e complexidade das lesões ateroscleróticas. Isto foi associado à menor expressão ICAM-1 e VCAM-1, além da diminuição do estresse oxidativo na parede do vaso e da proliferação de macrófagos (Sun *et al.*, 2009). Neste mesmo estudo demonstrou-se a ligação de LDL oxidada ao RAGE de células *fibroblast-like* COS7 provenientes do tecido renal, com ativação das mesmas vias induzidas por AGE.

A albumina é uma proteína de 67 kDa, com 585 aminoácidos e corresponde a 80% do total de proteínas glicadas na circulação, o que modifica suas propriedades de transporte e ligação (Baraka-Vidot *et al.*, 2015). Ela é sintetizada principalmente no fígado e regula a pressão coloidosmótica, participa

do transporte de hormônios, drogas, metabólitos e ácidos graxos, e sua concentração associa-se à permeabilidade microvascular (Mera *et al.*, 2005). Sua determinação direta ou por meio da medida de frutossamina estabelece um parâmetro de controle glicêmico estreito, que compreende mudanças no perfil glicêmico em período de tempo menor quando comparado à determinação da hemoglobina glicada (Hegab *et al.*, 2012; Selvin *et al.*, 2011).

A concentração plasmática de albumina-AGE associa-se independentemente com o risco cardiovascular em diferentes populações (Furusyo & Hayashi, 2013; Furusyo *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2012). Sua interação com o RAGE promove neoangiogênese, alteração em componentes da matriz extracelular, expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (Rondeau & Bourdon, 2011; Rodiño-Janeiro *et al.*, 2010), além de favorecer a quimiotaxia de monócitos e a expressão de receptores que reconhecem lipoproteínas modificadas em macrófagos arteriais. O aumento do estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia e da presença de albumina-AGE tem sido demonstrado em diferentes tipos celulares, em associação à gênese e progressão da nefropatia, retinopatia e neuropatia diabética (Calcutt *et al.*, 2009; Basta *et al.*, 2005; Fernyhough *et al.*, 2003; Hammes *et al.*, 2003; Nishikawa *et al.*, 2000).

1.4 Produtos de glicação avançada e fluxo de lípidos em macrófagos

A albumina-AGE, isolada do soro de portadores de diabetes melito com controle glicêmico inadequado (HbA1c > 10%), leva ao estresse do retículo endoplasmático (RE) (Castilho *et al.*, 2015) e reduz o efluxo de colesterol de

macrófagos, mediado por apoA-1 e HDL, induzindo acúmulo intracelular de colesterol e óxidos de colesterol (Machado-Lima *et al.*, 2013; Iborra *et al.*, 2011). Isto foi associado à menor expressão de ABCA-1 e à alteração na expressão de genes envolvidos na modulação da estabilidade e atividade deste receptor, como esteroil CoA dessaturase e janus cinase 2 (Machado-Lima *et al.*, 2013). De fato, menor conteúdo proteico do receptor ABCA-1 é observado em macrófagos tratados com albumina glicada *in vitro*, e em modelos animais de diabetes melito, o que prejudica o transporte reverso de colesterol (Tang *et al.*, 2010; Isoda *et al.*, 2007; Passarelli *et al.*, 2005).

A maior produção de ânion superóxido, induzida pela glicação avançada, por induzir o estresse inflamatório e do RE, resulta num cenário intracelular desfavorável ao efluxo de colesterol de macrófagos. Além disso, devido à sua rápida difusão ao meio extracelular, o ânion superóxido pode contribuir para a modificação de LDL, o que a torna suscetível a consequente glico-oxidação, condição esta que facilita a permanência desta lipoproteína nas camadas subendoteliais, sendo mais facilmente retida nas camadas dos vasos por fibras de colágeno glicadas (Yoshida & Kisugi, 2010). O infiltrado precoce de LDL oxidada na íntima arterial é o mecanismo pelo qual a aterosclerose é iniciada, posteriormente recrutando células do sistema imunológico, como monócitos, para a camada interna do vaso (Eberini *et al.*, 2013; Pant *et al.*, 2013). Na vigência de hipercolesterolemia esse processo é favorecido pelo maior aporte de LDL à íntima; na vigência de hiperglicemia, embora pouco se altere a concentração de LDL colesterol, há o predomínio de LDL pequenas, densas e quimicamente modificadas que também aceleram o acúmulo de lípidos e consequente formação de células espumosas (Yang *et al.*, 2012).

A albumina-AGE aumenta a expressão de chaperonas marcadoras do estresse do retículo endoplasmático em macrófagos. A utilização de chaperona química - ácido fenilbutírico – que previne o estresse do retículo é capaz de recuperar a expressão de ABCA-1 e o efluxo de colesterol em macrófagos tratados com albumina AGE (Castilho *et al.* 2012).

A albumina-AGE é mais captada por macrófagos, favorecendo a geração de ROS, graças à ativação do sistema NADPH oxidase e à alteração no sistema respiratório mitocondrial (Pinto *et al.*, 2009). Isto ocorre pela interação da albumina-AGE com o RAGE, o que potencializa a ação inflamatória de calgranulinas e lipopolissacarídeo (LPS) (Okuda *et al.*, 2012). Citocinas produzidas por macrófagos, sensibilizados por albumina-AGE e, posteriormente, estimulados por LPS ou calgranulinas, reduzem o efluxo de colesterol mediado por apoA-1 e HDL, estabelecendo importante ligação entre AGE, resposta inflamatória e aterosclerose. Além disso, os AGE modulam positivamente a expressão de outros receptores que reconhecem proteínas e lipoproteínas modificadas, como os receptores SR-A, SR-BI, LOX-1, CD-36, entre outros (Shiu *et al.*, 2012; Nagai *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 1999). Isto favorece o acúmulo gradual de colesterol em macrófagos, graças ao maior aporte de LDL colesterol em detrimento de sua exportação para as HDL.

1.5 Produtos de glicação avançada e sistema renina-angiotensina

A síntese de angiotensinogênio pode ser induzida em diversos tipos celulares mediante atividade transcricional do NF- κ B, o qual por sua vez, pode ser estimulado mediante interação AGE-RAGE (Brasier & Li, 1996). Pela via clássica do sistema renina-angiotensina (SRA), por meio da ação da renina, o

angiotensinogênio é convertido à angiotensina I (ANG I), um decapeptídeo sem função biológica conhecida. Por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), a ANG I é clivada a um octapeptídeo, denominado angiotensina II (ANGII), importante vasoconstritor. Embora sua concentração plasmática reflita, em grande parte, sua produção via SRA clássico, a formação de ANG II em diversos órgãos e tecidos pode ser explicada por sistemas alternativos, como o intrarrenal, adiposo, adrenal, cardíaco e vascular, onde contribui para o remodelamento tecidual (Sayer & Bhat, 2014).

Acredita-se que a renina seja captada pelo endotélio e, uma vez no meio intracelular, cliva angiotensinogênio previamente produzido pelas células da parede do vaso. No entanto, há controvérsias quanto à quantidade de renina produzida em diferentes estados metabólicos, uma vez que ANG II pode ser encontrada em macrófagos localizados em áreas de lesão aterosclerótica (Potter et al., 1998).

Dados recentes da literatura demonstram que o SRA exerce papel importante na regulação da resposta inflamatória e contribui para o desenvolvimento da aterosclerose, pelo recrutamento de células pró-inflamatórias e sua indução à síntese de ANG II e aumento da expressão de marcadores de dano endotelial, citocinas e quimiocinas (Durante *et al.*, 2012).

A quimase, uma serina protease, está envolvida na via alternativa de conversão de ANG I em ANG II no coração e coronárias, principalmente (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008; Paul et al. 2006). Em secções de artéria renal e coronária, obtidas por autópsia de portadores de diabetes melito, observa-se maior expressão de quimase em associação ao acúmulo de AGE, o que não é verificado em artérias de indivíduos saudáveis (Koka et al., 2006). O bloqueio do

RAGE e/ou a inibição da via da ERK1/2 MAP cinase é capaz de abolir a geração de ANG II, por reduzir a expressão de quimase (Koka et al.2008).

Diversas proteases estão envolvidas na síntese tecido-específico de ANG II, como elastase, calicreína e catepsina. A participação da glicoproteína elastase na síntese de ANG II, a partir de um substrato denominado proangiotensina-12 [ANG-(1-12)], é bem descrita na literatura. ANG-(1-12) pode ser encontrada no tecido cardíaco e através da ação da quimase, gerar ANG II (Uehara *et al.*, 2013). Outros fragmentos de peptídeos derivados de ANG I ou ANG II apresentam características diferentes de ANG II, como a angiotensina 1-7 (ANG 1-7), fragmento gerado a partir da clivagem da ANG II por meio da ação da enzima conversora de angiotensina II (ECA2). Os mecanismos de ação de ANG 1-7, como vasoconstrição e redução da proliferação de células musculares lisas ocorrem, principalmente, pela ligação ao receptor Mas e parece promover efeitos antiaterogênicos, uma vez que a ablação de Mas contribui para os efeitos deletérios de ANG II sobre o vaso (Durante *et al.*, 2012).

As vias de sinalização intracelular promovidas pelos AGE, como ativação de proteína cinase C e NF- κ B, são compartilhadas pela ANG II, por meio de sua interação com os receptores AT-1 e AT-2. O receptor AT-1 é um receptor acoplado a proteína cinase C e adenilil ciclase via proteína G, que predomina em tecidos vasculares, sendo responsável pela maior parte das ações da angiotensina II, incluindo a ativação do sistema NADPH oxidase e produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Já, os receptores AT-2 predominam na vida fetal, embora tenham sua expressão aumentada em condições como infarto do miocárdio e hipertrofia cardíaca, mediando efeitos tróficos sobre células musculares lisas e formação de neoíntima (Ohkubo *et al.*, 1997). No

entanto, a ativação de NF- κ B, a qual conduz à transativação de genes envolvidos na progressão de lesão aterosclerótica parece estar preferencialmente vinculada à interação de ANG II com o receptor AT-1 (Ruiz-Ortega et al., 2000).

A ativação de RAGE por AGE, além de fosforilar ERK 1/2 e ativar NADPH oxidase, também transloca NF- κ B (Yao & Brownlee, 2010). A ANG II estimula a produção de ânio superóxido e ativação de NADPH, o que induz a produção de ROS, sendo este um dos efeitos mais relevantes do SRA no processo aterosclerótico (Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADHoxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis:evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999; 99: 2027-33). Estas ações culminam no aumento da captação de LDL por macrófagos, ativação plaquetária, proliferação de células musculares lisas e alteração de componente da matriz extracelular (Yoshida & Kisugi, 2010; Bierhaus et al., 2005; Gaut & Heinecke, 2001).

Na hipercolesterolemia humana e em modelos animais de dislipidemia, como o camundongo knockout para apolipoproteína E (apoE), observa-se maior expressão e funcionalidade do receptor AT-1 na vasculatura (Montecucco et al., 2009; Daugherty et al., 2008). Sua ablação gênica inibe o estresse oxidativo vascular e o desenvolvimento de aterosclerose nestes animais, independentemente de variação na pressão arterial e na colesterolemia (Wassmann et al., 2004). Expressão aumentada da enzima conversora de angiotensina é observada na placa aterosclerótica, predominantemente em macrófagos enriquecidos em colesterol, com maior produção local de angiotensina II (Ohishi et al., 2010; Diet et al., 1996).

No diabetes melito também se nota maior atividade do sistema renina-angiotensina, em particular na parede vascular, com benefício auferido pela inibição do sistema renina-angiotensina sobre a evolução da aterosclerose diabética (Ishii et al., 2008; Candido et al., 2002). Os efeitos cardioprotetores atribuídos aos inibidores de receptor AT-1 não se restringem ao controle da pressão arterial, e envolvem efeitos sobre a redução das ações diretas da angiotensina II sobre a vasculatura. Neste sentido, demonstra-se importante papel do sistema renina-angiotensina na aterosclerose diabética em camundongos knockout para apo E. O tratamento com diferentes bloqueadores do receptor AT-1 ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) favorece menor área de lesão aterosclerótica, o que não é observado pelo tratamento com amlodipina, isoladamente (Candido et al., 2004).

Diminuição da migração de monócitos ao leito vascular, do mRNA da molécula de adesão vascular VCAM-1, da proliferação de células musculares lisas e da geração de ROS e mediadores inflamatórios têm sido descritos na terapia com inibidores de receptor AT-1 (Matsui et al., 2011; Suganuma et al., 2007). Redução na expressão de NADPH oxidase e consequente diminuição na produção de ROS decorrem do bloqueio do sistema-renina angiotensina, o que contribui para atenuar a geração e o acúmulo de AGE na parede arterial. Além disso, pode minimizar os efeitos deletérios dos AGE sobre o fluxo de lípidos celulares, os quais se encontram intimamente associados à produção de ânion superóxido pelo sistema NADPH oxidase e mitocondrial, podendo ser prevenidos pelo uso de antioxidantes inibidores da geração de AGE, como aminoguanidina e benfotiamina (De Souza Pinto et al., 2012).

Em células renais, a incubação com albumina modificada por carboximetil-lisina promove dano ao DNA, o que é prevenido pela incubação simultânea com candesartana, inibidor do receptor da angiotensina II (receptor AT-1) (Schupp et al., 2005). Em podócitos, a angiotensina II aumenta a expressão de RAGE, graças à ativação de NF- κ B mediada pelo receptor AT-2, com aumento da expressão de TNF- α (Rüster et al., 2009) o que é revertido com a ablação deste receptor (Rüster et al., 2011), isto pode ser explicado nestas células pela ativação da via RAGE/PI3-K (Cheng et al., 2012). Em células endoteliais, o bloqueio do receptor AT-1 por olmesartana ou candesartana diminui a expressão de RAGE induzida por TNF- α . Isto decorre da menor ativação de NF- κ B e de sua atividade transativadora sobre o gene do receptor de AGE, com redução subsequente da expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (Fujita et al., 2006).

Em camundongos dislipidêmicos, com diabetes melito induzida por estreptozotocina, o tratamento com inibidor de HMGCoA redutase, rosuvastatina, e candesartana reduz o desenvolvimento de lesão aterosclerótica. Este efeito é independente de variação nos lípides plasmáticos e do controle glicêmico e associado com o menor acúmulo de AGE e menor expressão de RAGE na placa aterosclerótica (Calkin et al., 2008). Por outro lado, em portadores de diabetes melito tipo 2 hipertensos e com nefropatia, o bloqueio de AT-1 com irbesartana não altera a concentração plasmática elevada de carboximetil-lisina, pentosidina (Busch et al., 2008) e carboxietil-lisina (Engelen et al., 2011). Uma vez que a interação de RAGE com seus ligantes, assim como a de angiotensina II com o receptor AT-1, podem estimular processos pró-inflamatórios associados à aterosclerose no diabetes melito, e sendo ambos

receptores expressos em macrófagos e células do músculo liso, o bloqueio desses sistemas parece ser uma promessa terapêutica promissora (Geronikaki *et al.*, 2007) e uma série de estudos têm investigado a interação do eixo de sinalização AGE/RAGE e ANGII/AT-1.

Ihara e colaboradores (2007) analisaram uma possível ligação entre a expressão dos receptores RAGE e AT-1 em placas ateroscleróticas de camundongos diabéticos *knockout* para apo E. Tanto o bloqueio quanto a deficiência do receptor AT-1 demonstraram-se eficazes na redução da placa aterosclerótica e na regulação exacerbada do eixo RAGE e seus ligantes. Alta concentração plasmática de metilglioxal associa-se positivamente à regulação do sistema renina-angiotensina (Dhar *et al.*, 2013) em ratos alimentados com dieta rica em AGE. A inibição da formação de AGE, por compostos químicos que destoxificam aldeídos bifuncionais ou competem por sua ligação com proteínas, a utilização de RAGE solúvel (sRAGE) e a inibição do sistema renina-angiotensina também são demonstrados como capazes de conter a progressão da aterosclerose (Lee *et al.*, 2013) e da nefropatia diabética (Schupp *et al.*, 2005). Da mesma forma, o bloqueio imunológico do RAGE parece exercer efeitos de proteção renal, via ativação de AT2 (Sourris *et al.*, 2010), e sua deficiência reduz a expressão de AT-1 no leito vascular e atenua o desenvolvimento da doença aterosclerótica (Soro-Paavonen *et al.*, 2008).

Além disso, em animais dislipidêmicos e urêmicos, nos quais prevalecem produtos de peroxidação lipídica e de glicação avançada, a inibição do sistema renina-angiotensina com enalapril ou losartana reduz a área de lesão aterosclerótica. Este evento associa-se à menor expressão de moléculas de adesão e redução da oxidação de LDL no plasma (Bro *et al.*, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos *in vitro* evidenciam que a albumina glicada exerce efeitos potencialmente aterogênicos, caracterizados pelo aumento do estresse oxidativo celular, disfunção endotelial e hemostática e estresse inflamatório. Além disso, a albumina glicada interfere negativamente sobre o fluxo de lípidos celulares, aumentando a captação de LDL por macrófagos e prejudicando o transporte reverso de colesterol nestas células. No entanto, não existem evidências sobre o papel *in vivo* da albumina AGE sobre a gênese da aterosclerose e os estudos em modelos animais de diabetes melito não permitem elucidar quais componentes, incluindo hiperglicemia, estresse oxidativo, AGE, *background* genético, entre outros, contribuem para alterações no leito vascular.

Importante reiterar que a interação dos AGE com o RAGE favorece a expressão de RAGE e a produção local de angiotensinogênio que culmina na formação de ANG I e posteriormente ANG II. De fato, no diabetes melito, onde prevalece a formação de AGE, há maior ativação do SRA, estando sua inibição, por meio do bloqueio do receptor AT-1, relacionada ao benefício cardiovascular. Além de efeitos vasoconstritores, a ativação do receptor AT-1 induz o estresse oxidativo e inflamatório celular, o que retroalimenta positivamente a via do RAGE.

Antagonistas do receptor AT-1 reduzem a geração de espécies reativas de oxigênio, a produção de mediadores inflamatórios e a expressão de RAGE na parede arterial o que contribui, independentemente, do efeito hipotensor, para a redução de eventos cardiovasculares (Yamazaki *et al.*, 2012; Schupp *et al.*, 2005).

3. OBJETIVO

Avaliar, no arco aórtico de camundongos dislipidêmicos, o efeito da administração crônica de albumina-AGE isolada ou concomitantemente ao tratamento com losartana sobre:

- 1) o infiltrado de lípidos na camada íntima-média e
- 2) a expressão gênica e proteica de componentes do eixo AGE/RAGE, ANGII/AT-1 e de moduladores inflamatórios e do fluxo de lípidos no arco aórtico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo da albumina murina por glicolaldeído (*in vitro*)

Albumina murina (Calbiochem, EDM Chemicals, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), isenta em ácidos graxos e com teor de endotoxina inferior a 0,1 ng/mg (*Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel*; Pierce Biotechnology, Rockford IL, USA) foi incubada na presença de glicolaldeído 10 mM (Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha) dissolvido em tampão fosfato (PBS) (NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L) com EDTA (pH = 7,4). Albumina controle (C) foi preparada na presença de PBS, apenas. As incubações foram realizadas sob condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37°C, com agitação por 4 d (**figura 1**). A seguir, as albuminas glicadas (albumina-AGE) e C foram dialisadas contra PBS e esterilizadas em filtro 0,22µm. A concentração final de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951) e todas as amostras foram congeladas a -70°C até o seu uso.

Figura 1. Albumina controle e albumina modificada por glicação avançada *in vitro*. Albumina murina isenta em ácidos graxos foi submetida à glicação avançada por meio da incubação com glicolaldeído (GAD) 10 mM dissolvido em PBS, durante 4 d, 37°C, sob agitação, atmosfera de nitrogênio, no escuro. Albumina controle foi incubada na presença de PBS/EDTA apenas. Observa-se a intensa reação de escurecimento promovida pelo GAD.

4.2 Modelo animal

Os protocolos para utilização de animais deste projeto estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP. As matrizes dos animais *knockout* para apo E foram adquiridas comercialmente do Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, EUA) e possuem base genética dos camundongos C57BL/6J. Os animais foram mantidos em biotério convencional com ciclo de 12 h luz/12 h escuro, à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, recebendo água e ração padrão *ad libitum*. O camundongo *knockout* para

apoE é um modelo animal amplamente utilizado para o estudo da aterogênese. A apoE é um ligante para receptores que desempenham um papel fundamental na depuração de lipoproteínas pelo fígado. Na sua ausência, há uma severa elevação das lipoproteínas ricas em apolipoproteína B, predominantemente, as de muito baixa densidade (VLDL) e remanescente (Plump *et al.*, 1992). Trata-se de um animal severamente hipercolesterolêmico que desenvolve lesão aterosclerótica extensa por volta de 20 a 30 semanas de idade. Os animais foram estudados a partir da décima segunda semana de idade, onde não se evidenciam sinais de lesão avançada na aorta, porém observa-se infiltração lipídica no espaço subendotelial. Isto permitiu elucidar a contribuição da albumina-AGE e do sistema renina-angiotensina sobre o desenvolvimento da aterosclerose. Cabe ainda ressaltar que a manutenção dos animais em dieta padrão, visou impedir a exacerbação da aterosclerose por dieta rica em gordura, o que dificultaria a análise do papel isolado da albumina-AGE.

4.3 Dosagens bioquímicas

Para determinações bioquímicas, alíquotas de sangue (140 µL) foram coletadas após período de jejum de 12 h, no início e no final do protocolo, pela veia caudal utilizando-se capilares previamente heparinizados. Com esta finalidade, os animais, excetuando-se a cauda, foram envolvidos em toalha com dimensões apropriadas, objetivando-se um procedimento adequado de imobilização. Colesterol total (CT), triglicérides (TG) foram determinados no plasma, por meio de métodos enzimáticos colorimétricos (Labtest do Brasil). A leitura foi realizada no Thermo/Milton Roy Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, Verona, EUA). A

concentração de glicose plasmática foi determinada por meio de tiras reagentes para leitura em glicosímetro *Accu-Check Performa Nano* (Roche Diagnostics - EUA). A determinação do conteúdo de AGE total foi realizada por imunoenensaio enzimático ELISA (Estuche de ELISA para la cuantificación de Productos Finales de Glicación Avanzada, Lamider SA, Mexico D.F., Mexico).

4.4 Injeção intraperitoneal de albumina C ou albumina AGE nos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Uma injeção intraperitoneal diária, durante 30 dias consecutivos, foi realizada com auxílio de seringa hipodérmica nos animais dos grupos controle (C), controle + losartana (C+LOS), albumina-AGE (AGE) e albumina-AGE + losartana (AGE+LOS) (n = 20/grupo). O volume injetado não foi superior a 200 µL, contendo 2 mg de albumina C ou albumina-AGE. O peso dos animais foi monitorado semanalmente.

4.5 Tratamento com losartana

Os animais dos grupos C+LOS e AGE+LOS foram tratados com bloqueador do receptor de angiotensina II, losartana (LOS, 100 mg/L água) durante todo o período de estudo. A concentração de losartana foi previamente padronizada em nosso laboratório de acordo com Suganuma e colaboradores (2007) e Sayer & Bhat (2014). O fármaco foi administrado por meio da água do bebedouro o qual foi mantido ao abrigo da luz por meio de revestimento com papel alumínio.

4.6 Medida da pressão arterial sistólica caudal – Pac

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) caudal é baseada no princípio da detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso do sangue que flui através da cauda. Um sensor piezoelétrico altamente sensível detecta a distensão causada pelos pulsos e fornece um sinal que representa a relação da alteração (dP/dt) do pulso que foi análogo a velocidade do pulso. O *cuff* de oclusão e o sensor de pulso foram colocados suavemente sobre a cauda. Foram consideradas apenas as medidas obtidas na ausência de movimentação do animal. A medida de PAS foi obtida por meio da média de seis aferições consecutivas, durante dois dias consecutivos, utilizando-se aparelho Kent Scientific Corporation, EUA, modelo RTBP 2045.

4.7 Preparo das Amostras para Microscopia Óptica e de fluorescência

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg/Kg de peso corporal; i.p.) e cloridrato de xilazina (Rompum® - 10 mg/Kg peso corporal; i.p.) e então, submetidos a uma toracolaparotomia longitudinal, objetivando-se a extração do coração e da artéria aorta. A seguir, as artérias foram perfundidas com criopreservante (Tissue TEK-OCT, Sakura, EUA) para assegurar a integridade das estruturas histológicas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. Utilizando-se um criostato (Leica, modelo CM1800 – Maryland, EUA), foram realizados cortes seriados transversais no arco aórtico com 4 µm de espessura ao longo de aproximadamente 1 cm de comprimento a partir da raiz aórtica.

Foram investigados 4 domínios com 120µm de extensão, denominados segmentos I, II, III e IV, com intervalo de 1 mm de comprimento cada, sendo o segmento IV o mais próximo da raiz aórtica. Em seguida, três seções de dez cortes foram obtidas de cada segmento aórtico com intervalo de 10 µm entre cada seção. Quinze cortes de cada segmento foram, aleatoriamente, escolhidos para as análises histológicas e quinze para as análises de fluorescência. Desta maneira, trinta amostras do arco aórtico de cada animal foram analisadas microscopicamente. Cortes alternados de cada segmento foram destinados à análise do conteúdo lipídico e à imunofluorescência.

4.8 Obtenção do arco aórtico para quantificação de mRNA

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ e então, submetidos a uma toracolaparotomia longitudinal, objetivando-se a extração do arco aórtico. A seguir, as artérias foram perfundidas com solução gelada de cloreto de sódio 0,9% e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

4.9 Histomorfometria do Depósito Lipídico

Cortes da aorta de aproximadamente 4 µm foram aderidos às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Estes foram submetidos a um processo de coloração específica para lípidos, empregando-se *Oil red-O* (Xu *et al.*, 2010), um método semi-quantitativo que colore áreas com presença de gordura. Uma média da soma da área de todos os cortes, de cada fase e de cada animal foi feita e o resultado final expresso em porcentagem (%) de marcação por % de área total. A morfometria dos depósitos lipídicos foi determinada no segmento da parede aórtica,

compreendendo o espaço subendotelial e a média, utilizando-se um microscópio óptico (objetiva de 40x) conectado a uma câmera de vídeo e a um programa de análise de imagens (Image-Pro Plus 6.0). Nesta metodologia é considerada a positividade das áreas teciduais abrangidas pela coloração específica para lipídios (*Oil red-O*). Primeiramente as imagens foram digitalizadas para obtenção das microfotografias dos vasos em aumento de 400X, seguindo-se de seleção da área a ser analisada (**figura 2A**). Posteriormente, houve a seleção da tonalidade para a coloração de *Oil red-O* na área selecionada (**figura 2B**). Esta tonalidade foi previamente estabelecida por três analisadores diferentes e aplicada a todas as microfotografias provenientes das aortas estudadas. Após aplicação do padrão, obteve-se a soma das áreas marcadas dentro da área analisada (**figura 2C**) seguindo-se de conversão para mensuração da área total selecionada (**figura 2D**), ambos valores foram expressos em μm^2 . As áreas de depósitos lipídicos foram quantificadas pela média dos cortes histológicos de cada camundongo de acordo com Catanozi e colaboradores (2003) e expressas em porcentagem de área marcada.

4.10 Imunofluorescência

Cortes de aorta de aproximadamente 4 μm foram aderidos às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltietoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Para a reação de imunofluorescência os cortes histológicos de congelação das artérias são submetidos a três lavagens de 10 min com PBS pH=7,2. O bloqueio dos sítios inespecíficos é realizado primeiramente com ácido fórmico p.a durante três minutos, seguido de duas lavagens em PBS e posteriormente incubados com soro de cavalo 1:50 em PBS pH=7,2 durante 20 min, a

temperatura ambiente. A seguir, as lâminas são incubadas durante 18 h, a 4°C, com anticorpos policlonais de coelho anti AT-1 (1:50), RAGE (1:50) de camundongos (Santa Cruz Biotech Inc.), anti 4-hidroxinonenal (1:50) (Abcam) e CML (1:100) (Imundiagnostik). As lâminas são lavadas três vezes, durante 10 min cada, com PBS + *Tween*²⁰ a 0,005% e incubadas com anticorpo anti IgG de coelho conjugado com Alexa 488 (Sigma) diluídos em azul de Evans 0,006% durante 90 ou 60 min, respectivamente, a temperatura ambiente. Após outro ciclo de lavagens, as lâminas são incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, com 4, 6-diamidino-2- fenilindole, diidroclorido (DAPI) diluído 1:200 em PBS pH=7,2. Após um ciclo de três lavagens as lâminas são preparadas em meio de montagem semipermanente (solução de glicerol/PBS) e analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus-BX51, Tóquio, Japão). As imagens são digitalizadas para obtenção das microfotografias dos vasos em aumento de 400 X, seguindo-se de seleção da área a ser analisada que compreende a região da íntima-média do vaso. Posteriormente, há a aplicação do padrão de reconhecimento estabelecido para a fluorescência da área selecionada. Este padrão, previamente selecionado por três analisadores diferentes, foi aplicado a todas as microfotografias provenientes das aortas estudadas. Após aplicação do padrão, obtem-se a soma das áreas positivas para fluorescência dentro da área analisada, seguindo-se de uma quantificação da área total selecionada. Ambos valores são expressos em % de área marcada (Ludovico-Martins *et al.*, 2009).

Figura 2. Análise histomorfométrica para quantificação de depósito lipídico por coloração com Oil Red-O. O corte da aorta de camundongo é microfotografado em aumento de 400X. Em A, marcação da área da íntima-média (verde). Em B, aplicação do padrão de coloração sobre a microfotografia (vermelho). Em C, quantificação do padrão de reconhecimento da coloração dentro da área analisada e a expressão em μm^2 (*Sum*). Em D, a conversão para mensuração da área total analisada, resultado expresso em μm^2 (*Sum*).

4.11 Imuno-histoquímica para CD-68

Para a reação de imuno-histoquímica os cortes histológicos das artérias foram aderidos às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltietoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e posteriormente submetidos a três lavagens de 10 min, em PBS. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado pela incubação das lâminas com leite desnatado 5%, durante 30 min, a temperatura ambiente. As

lâminas foram, então, incubadas com anticorpo monoclonal anti CD-68 (Santa Cruz Biotech Inc.) na diluição de 1:50 durante 18h, 4 °C. Após três lavagens consecutivas de 5 minutos cada, as lâminas são incubadas com kit de anticorpo secundário anti-coelho diluído em 1:200 por 30 min e seguidamente incubadas com complexo imuno-histoquímico na diluição de 1:125, por 30 min a 37°C, sendo que entre as incubações são realizadas 3 lavagens de 3 min Vectastain (Vector Laboratories Inc. Burlingame, EUA). A revelação das lâminas foi feita em DAB (3, 3'-diaminobenzidina - Sigma Co., S. Louis, EUA) por 5 min e contracorada com eosina. As lâminas foram montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e analisadas em microscópio de luz (Olympus-BX51, Tóquio, Japão) no aumento de 400X.

4.12 Coloração com hematoxilina e eosina

Para coloração com hematoxilina e eosina (HE) as secções realizadas no arco aórtico foram aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e descongeladas à temperatura ambiente por 10 minutos. As lâminas foram embebidas em água destilada por 5 min, seguido de imersão em hematoxilina de Harris por 5 min, 1 imersão em água destilada, 3 imersões em álcool clorídrico 1%, banho em água corrente por 5 min, 1 imersão em álcool 70%, 4 imersões em Eosina alcoólica, álcool 70% por 30 seg, álcool 95% por 30 seg, álcool 100% por 30seg e, finalmente, montagem em xilol. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus-BX51, Tóquio, Japão) no aumento de 400X.

4.13 Ensaio da resposta inflamatória de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais de camundongos apoE *knockout* foram isolados por meio de punção peritoneal com uso de PBS estéril sem EDTA, pH 7,4. Para esse procedimento não foi utilizada qualquer substância indutora de migração macrofágica para a cavidade peritoneal. Estas células foram centrifugadas a 4 °C, 1000 rpm por 2 min.

A viabilidade celular foi determinada (89 a 98%), seguido de plaqueamento na quantidade de $1,5 \times 10^6$ e cultivadas por 48 h em placa de 24 poços em RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), 100 U/L de penicilina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e 2 mM de glutamina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque), mantida em estufa com 5% CO₂ a 37 °C por 24 h. Após confluência, o meio foi aspirado e os poços foram cuidadosamente lavados uma vez em tampão fosfato (PBS - NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L) com 1mg de albumina isenta em ácidos graxos (FAFA – Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), pH = 7,4, seguido por incubação com 50 µg/mL de LDL acetilada em 0,5 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA)/FAFA por 24 h. Em seguida, os poços foram lavados e novamente incubados com DMEM contendo 2mg/mL de albumina murina controle ou glicada, acrescidos ou não com 1 µM de losartana, durante 72h. Após aspiração do meio e cuidadosa lavagem com PBS, as células foram estimuladas com 1 µg/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma chemical Co. EUA) por 24 horas. O meio de cultura de cada poço foi coletado para realização de ensaio imunoenzimático para IL-6 e sendo armazenados em tubos de

congelamento, mantidos a -80 °C. As concentrações plasmáticas de IL-6 foram determinadas por meio da utilização de método imunoenzimático ELISA (R&D Systems, EUA). A densidade óptica das amostras foi determinada em leitor de ELISA (Genius Plus-Tecan, Suíça) com filtro de 450 nm. Após coleta do meio de cultura contendo LPS, os poços foram lavados com solução gelada de cloreto de sódio 0,9% e posteriormente foi acrescido 1 mL de Trizol (Invitogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA) em cada poço objetivando-se a lise celular, realizando-se imediatamente aspiração deste 1 mL para subsequente isolamento do RNA total pelo método de cromatografia (RNeasy Mini Kit, Qiagen), conforme recomendações do fabricante.

4.14 Quantificação do conteúdo do mRNA e expressão gênica de macrófagos peritoneais e do arco aórtico por reação de transcrição reversa quantitativa seguida de reação em cadeia da polimerase (qRT-PCR)

A extração e purificação do RNA total de macrófagos e do arco aórtico foram realizadas em espécimes armazenadas em tubo de congelamento e congeladas em nitrogênio líquido, segundo o protocolo baseado na lise de células com Trizol (Invitogen-Life Technologies, Carlsbad, EUA), realizando subsequente isolamento do RNA total pelo método de cromatografia (RNeasy Mini Columns Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado e analisado quanto à sua integridade pela avaliação das bandas correspondentes ao RNA ribossomal 18s e 28s no equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., EUA).

Para a síntese de cDNA foram utilizados 100 ng de RNA total seguindo-se o protocolo do conjunto de reagentes *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied

Biosystems, EUA). A reação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, Watertown, Massachusetts, EUA), de acordo com o protocolo do fornecedor (60 min a 37°C, 5 min a 95°C seguido de incubação a 4°C). O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até sua utilização. Para a análise da expressão gênica por amplificação do cDNA foram utilizadas sondas marcadas com FAM (6-carboxy-fluorescein) adquiridas no formato *TaqMan Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, EUA). Para esta análise dos genes *Ager*, *Agtr1a*, *Agt*, *Nfkb1*, *Msr1*, *Ccl2*, *Abca1*, *Abcg1*, *Olr1*, *Cybb*, *Tnf*, *Il1b* e *Il18* são desenhados *primers* das junções exônicas destes genes a fim de evitar a amplificação de DNA genômico. Como normalizador das reações, realizou-se ensaios com quatro genes endógenos descritos na literatura, sendo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH - *Gapdh*) e β -actina (*Atcb*) os genes mais estáveis para aorta e macrófagos, respectivamente.

As reações de qRT-PCR foram realizadas com a utilização de solução denominada *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendações do fabricante, no equipamento *StepOnePlus* (Applied Biosystems) e analisadas pelo programa *StepOne Software 2.0* (Applied Biosystems, EUA) que gera curvas logarítmicas dos sinais de fluorescência emitidos durante a amplificação dos genes. O programa oferece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado *t threshold* (Ct) (Kubista *et al.*, 2006; Bustin & Muller, 2005). Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o controle endógeno escolhido. Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$, considerando-se a eficiência do ensaio (90 a 110%) (Livak & Schmitgen, 2001).

4.15 Análise estatística

As comparações estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prism 4 (*GraphPad Software, Inc. 2003*), utilizando o teste ANOVA de um fator com pós teste de *Newman-Keuls* para comparação entre os animais. Em todos os casos, são consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância for inferior a 5 % ($p < 0,05$). A avaliação dos dados foi feita com a utilização do programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., EUA). Tabelas e figuras apresentam dados expressos como média $\pm$ EP.

5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

In vivo:

In vitro:

6. RESULTADOS

Peso corporal, lípides plasmáticos (CT e TG), glicose e PAS foram determinados em camundongos *knockout* para apo E com 12 semanas de idade no início e término do protocolo experimental. Não houve diferença dos parâmetros analisados entre os grupos no período basal. Ao final do tratamento, os grupos que foram tratados com losartana apresentaram PAS menor quando comparados aos respectivos grupos não tratados. Todavia, CT, TG, peso e glicose não diferiram entre os grupos ao final do tratamento (tabela 1).

Tabela 1 - Peso corporal, perfil bioquímico e pressão arterial sistólica dos camundongos apoE *knockout* tratados com albumina controle ou albumina-AGE, na presença ou ausência de losartana, nos períodos basal e final.

	C	C+LOS	AGE	AGE+LOS
Basal				
Peso (g)	26 ± 0,5	25 ± 0,5	27 ± 0,5	26 ± 0,4
CT (mg/dL)	470 ± 13	496 ± 24	460 ± 19	506 ± 27
TG (mg/dL)	108 ± 6	106 ± 4	121 ± 12	123 ± 7
Glicose (mg/dL)	107 ± 3	97 ± 4	96 ± 5	100 ± 4
PAS (mmHg)	77 ± 2	76 ± 4	78 ± 4	77 ± 2
Final				
Peso (g)	26 ± 2	26 ± 2	27 ± 2	26 ± 2
CT (mg/dL)	481 ± 84	417 ± 108	491 ± 98	518 ± 90
TG (mg/dL)	111 ± 8	115 ± 5	116 ± 10	133 ± 7
Glicose (mg/dL)	111 ± 23	102 ± 15	100 ± 16	111 ± 29
PAS (mmHg)	76 ± 3	73 ± 3*	77 ± 3	74 ± 4*

O infiltrado de lípidos na camada íntima/média do arco aórtico foi determinado por coloração com *Oil red-O*. Conforme pode ser observado na figura 3, os animais tratados com albumina-AGE apresentaram aumento de 5,3 vezes no infiltrado de lípidos em comparação aqueles tratados com albumina-C. O tratamento com losartana foi capaz de prevenir o acúmulo lipídico na aorta, sendo semelhante aos dos animais que receberam albumina C.

Figura 3. Infiltrado lipídico no aorco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina

AGE + LOS. Secções do aorco aórtico foram realizadas, aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltrietoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas à coloração por *oil Red-O*. Em **A**, imagens representativas de cortes histológicos. INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. As setas evidenciam a positividade da reação. Em **B**, representação gráfica da porcentagem do infiltrado lipídico no arco aórtico (% área total). Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). Aumento: 400 x.

A expressão de genes envolvidos no fluxo de lípidos, resposta inflamatória e de componentes do SRA em macrófagos foi quantificada por RT-PCR. Na figura 4, observa-se que a expressão de mRNA de *Ager* (RAGE) e *Tnf* (TNF- α) foi de 1,4 vezes e 2,4 vezes maior na artéria de camundongos tratados com albumina-AGE em comparação à albumina-C, respectivamente. Para ambos os genes, a elevação foi prevenida pela losartana. Não houve alteração na expressão de *Msr1* (MCP-1).

Figura 4. Expressão de mRNA de *Ager*, *Tnf* e *Msr1* no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LO, por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído do arco aórtico de camundongos apoE knockout, tratados com 2 µg/mL de albumina controle ou glicada, concomitante ou não ao tratamento com 100 mg/mL de losartana. Para amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01134790_g1 (*Ager*), Mm00446214_m1 (*Msr1*) e Mm00443258_m1 (*Tnf*). O gene Gapdh (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho SetOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Os grupos foram comparados por ANOVA de

um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). A) *Ager*, $p < 0,05$; B) *Tnf*, $p < 0,05$; e C) *Msr1*, $p > 0,05$.

O tratamento com losartana não reduziu a expressão de *Cybb* (Nox2), a qual foi induzida pela albumina-AGE (figura 5A). Em comparação aos animais que receberam albumina-C, houve maior expressão do mRNA de *Orl1* (LOX-1) nos animais que receberam albumina-AGE (figura 5B). Isto foi prevenido pela losartana (albumina-AGE + losartana). A losartana também reduziu a expressão de *Orl1* nos animais C+LOS em comparação ao grupo C. A expressão dos genes que codificam os receptores *Abca1* (ABCA-1) e *Abcg1* (ABCG-1) não diferiu entre os grupos (figuras 5C e 5D, respectivamente).

Figura 5. Expressão de mRNA de *Cybb*, *Orl1*, *Abca1* e *Abcg1* no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS,

albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído do arco aórtico de camundongos apoE *knockout*, tratados com 2 µg/mL de albumina controle ou glicada, concomitante ou não ao tratamento com 100 mg/mL de losartana. Para amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01287743_m1 (*Cybb*), Mm00454586_m1 (*Orl1*), Mm00442646_m1 (*Abca1*) e Mm00437390_m1 (*Abcg1*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho SetOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). A) *Cybb*, $p < 0,05$; B) *Orl1*, $p < 0,05$; C) *Abca1*, $p > 0,05$; e D) *Abcg1*, $p > 0,05$.

Não houve indução da expressão de mRNA de *Agtr1a* (receptor AT-1) pela albumina-AGE. Por outro lado, a losartana reduziu o mRNA de *Agtr1a* em ambos os grupos, albumina-C + losartana e albumina-AGE + losartana (figura 6A). A expressão do mRNA de *Agt* (angiotensinogênio) foi semelhante entre os camundongos que receberam albumina-C e albumina-AGE (figura 6B). Finalmente, o mRNA de *Nfkb1* (NF-KB) foi semelhante entre todos os grupos experimentais (figura 6C).

Figura 6. Expressão de mRNA de *Agtr1a*, *Agt* e *Nfkb* no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído do arco aórtico de camundongos apoE knockout, tratados com 2 µg/mL de albumina controle ou glicada, concomitante ou não ao tratamento com 100 mg/mL de losartana. Para amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm01166161_m1 (*Agtr1a*), Mm00599662_m1 (*Agt*) e Mm00476361_m1 (*Nfkb*). O gene Gapdh (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho SetOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t =$

Ct gene alvo – Ct do controle endógeno. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). A) *Agtr1a*, $p < 0,01$; B) *Agtr1*, $p > 0,05$; e C) *Nfkb*, $p > 0,05$.

A análise por imunofluorescência não apresentou diferença quanto ao conteúdo de AT-1 na parede do vaso entre os grupos (figura 7).

Figura 7. Imunofluorescência para AT-1 no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com

albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS.

Secções do arco aórtico aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas a imunofluorescência com anticorpo policlonal de coelho anti-AT-1, conforme a sessão Materiais e métodos. Em **A**, imagens representativas da imunomarcção. INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. As setas

evidenciam a positividade da reação. Em **B**, representação gráfica da porcentagem da imunomarcção dos grupos estudados. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). Aumento: 400 x.

A quantificação de CML por imunofluorescência foi realizada nos cortes do arco aórtico, considerando-se que a CML é o principal AGE formado em áreas de lesão aterosclerótica. Observou-se aumento de 4,8 vezes no conteúdo de CML nos animais tratados com albumina-AGE em comparação aqueles tratados com albumina-C (figura 8).

Figura 8. Imunofluorescência para CML no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e

albumina AGE + LOS. Secções do arco aórtico aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltietoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas a imunofluorescência com anticorpo policlonal de coelho anti-CML, conforme a sessão Materiais e métodos. Em **A**, imagens representativas da imunomarcação. INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. As setas evidenciam a positividade da reação. Em **B**, representação gráfica da porcentagem da imunomarcação dos grupos estudados. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). Aumento: 400 x.

O receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) e o marcador de peroxidação lipídica, 4-hidroxinonenal (4-HNE) foram, respectivamente, 1,7 e 2,6 vezes maiores no grupo albumina-AGE em comparação ao grupo albumina-C (figuras 9 e 10, respectivamente). Em todos os casos, observou-se efeito benéfico da losartana, a qual preveniu a elevação destas proteínas no grupo albumina-AGE + losartana, sendo similar ao grupo albumina-C + losartana.

Figura 9. Imunofluorescência para RAGE no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS. Secções do arco aórtico aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltietoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas a imunofluorescência com anticorpo policlonal de coelho anti-RAGE, conforme a sessão Materiais e métodos. Em **A**, imagens representativas da imunomarcção INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. As setas evidenciam a positividade da reação. Em **B**, representação gráfica da porcentagem da imunomarcção dos grupos estudados. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). Aumento: 400 x.

Figura 10. Imunofluorescência para 4-HNE no arco aórtico de camundongos apo E KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS. Secções do arco aórtico aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas a imunofluorescência com anticorpo policlonal de coelho anti-4-HNE, conforme a sessão Materiais e métodos. Em **A**, imagens representativas da imunomarcção. INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. A seta evidenciam a positividade da reação. Em **B**, representação gráfica da porcentagem da imunomarcção dos grupos

estudados. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). Aumento: 400 x.

Coloração com hematoxilina-eosina foi realizada com a finalidade de se observar a composição celular da vasculatura em todos os grupos experimentais. Neste ensaio, observou-se marcação positiva de células da musculatura lisa do vaso e fibroblastos. Além disso, notou-se alterações morfológicas das fibras elásticas no grupo AGE, ao passo que o tratamento com losartana impediu a elastólise das mesmas, sendo morfolologicamente semelhante aos grupos C e C + LOS (figura 11).

Figura 11. Imagens representativas de cortes histológicos do arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, corados por hematoxilina-eosina. Secções do arco aórtico aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas a com hematoxilina-eosina, conforme a sessão Materiais e métodos. INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. Nota-se a intensa elastólise presente no grupo AGE em relação aos grupos C e C + LOS, que apresentam disposição normal das fibras elásticas ao longo da parede da artéria.

Em AGE + LOS, observa-se diminuição da elastólise, sendo similar aos grupos C e C + LOS. Aumento: 400 x.

A análise de marcação de imunohistoquímica para CD-68 encontra-se evidenciada na figura 12. Apenas uma tênue marcação para CD-68 foi evidenciada na parede do vaso. Em todos os grupos experimentais houve ausência de imunomarcação para este receptor na camada íntima-média do arco aórtico.

Figura 12. Imagens representativas de cortes histológicos do arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, marcados para CD-68 por histoquímica. Secções do arco aórtico aderidas às lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriétoxi Silano (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas a histoquímica para CD-68, conforme a sessão Materiais e métodos. INT = camada íntima; MED = camada média; ADV = camada adventícia. A seta evidencia a positividade da reação. A expressão para CD-68 aparece negativa nos grupos C, C + LOS e AGE + LOS, enquanto no grupo AGE observa-se uma expressão tênue neste grupo. Aumento: 400 x.

A análise da expressão gênica de *Il1b* e *Il18*, marcadores de ativação do inflamassoma NLRP3, não apresentou diferenças entre os grupos (figura 13A e 13B, respectivamente).

Figura 13. Expressão de mRNA de *Il1b* e *Il18* no arco aórtico de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído do arco aórtico de camundongos apoE *knockout*, tratados com 2 µg/mL de albumina controle ou glicada, concomitante ou não ao tratamento com 100 mg/mL de losartana. Para amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00434228_m1(*Il1b*) e Mm00434225_m1 (*Il18*). O gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho SetOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t$ gene alvo – C_t do controle endógeno. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP).

Macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos *knockout* para apoE não tratados, foram incubados com sobrecarga de colesterol e tratados por diferentes intervalos de tempo com albumina-C ou albumina-AGE na ausência ou presença de losartana (1 μ M). Nas 24 h seguintes foram expostos a 1 μ g/mL de lipopolissacarídeo bacteriano. Após 72 h de tratamento, a albumina-AGE aumentou a expressão de mRNA de genes envolvidos com a ativação de inflamassoma NLRP-3, *Il1b* (IL-1B) e *Il18* (IL-18) em comparação à albumina-C (figura 13). Isto não foi prevenido pela losartana.

Figura 14. Expressão de mRNA de *Il1b* e *Il18* em macrófagos peritoneais de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por qRT-PCR em tempo real. O cDNA foi obtido a partir de 100 ng de RNA extraído de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos apoE *knockout*, tratados com 2 μ g/mL de albumina controle ou glicada, concomitante ou não ao tratamento com 1 μ M de losartana. Para amplificação do cDNA foram utilizadas sondas adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) identificadas pelo código Mm00434228_m1(*Il1b*) e Mm00434225_m1 (*Il18*). O gene *Actb* (Mm00607939_s1) foi escolhido como normalizador da reação de PCR. Às sondas e ao cDNA, foi adicionada a solução Gene Expression Master Mix

(Applied Biosystem) e a reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho SetOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os valores de expressão gênica foram calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, no qual $\Delta C_t = C_t \text{ gene alvo} - C_t \text{ do controle endógeno}$. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP). A) *Il1b* $p > 0,05$; B) *Il18* $p > 0,05$.

O tratamento com albumina AGE induziu secreção de IL-6 maior do que o grupo C e o grupo AGE + LOS ($p < 0,05$). O tratamento com losartana impediu a secreção de IL-6, sendo semelhante ao grupo C + LOS.

Figura 15. Secreção de IL-6 por macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos apoE KO tratados com albumina-C, albumina C + LOS, albumina-AGE e albumina AGE + LOS, por ELISA. Macrófagos da cavidade peritoneal foram isolados e incubados em placas de cultura com 2 μ m/mL de albumina-C ou albumina-AGE, concomitante ou não ao tratamento de 1 μ M de losartana, durante 72 h. Posteriormente, foi adicionado 1 μ g/mL de LPS de *Escherichia coli* por 24 horas. O meio celular onde as células foram cultivadas foi coletado ao final do experimento para determinação da secreção celular de IL-6 através do método ELISA. Os grupos foram comparados por ANOVA de um fator com pós-teste de Newman Keuls (média $\pm$ EP).

7. DISCUSSÃO

A associação independente entre produtos de glicação avançada e o desenvolvimento da doença marcovascular aterosclerótica se dá, em parte, pelo prejuízo no metabolismo de lípidos e lipoproteínas. Os AGE impedem a metabolização de lípidos no plasma e seu reconhecimento por receptores celulares (Barlovic *et al.*, 2011). Além disso, induzem a geração intracelular de espécies reativas de oxigênio e propagam o insulto inflamatório, associados ao acúmulo de colesterol em macrófagos da íntima arterial (Folli *et al.*, 2011).

O papel dos AGE na alteração da homeostase celular de lípidos tem sido bem caracterizado em modelos experimentais animais e em humanos (Hanssen *et al.*, 2015; Del Turco & Basta, 2012; Ahmed *et al.*, 2009). A albumina modificada por glicação - principal proteína modificada no compartimento plasmático por glicação - prediz o espessamento vascular e risco de doença aterosclerótica (Furusyo *et al.*, 2013), além da gravidade e extensão angiográfica da doença coronariana em pacientes com diabetes melito do tipo 2 (Lu *et al.*, 2009).

No entanto, não é conhecido se os AGE, por si, induzem aterogênese *in vivo*, independentemente da presença de outras alterações bioquímicas do diabetes melito ou de condições de estresse carbonila. No presente estudo, avaliamos o papel do tratamento crônico de albumina-AGE, em modelo animal de dislipidemia grave (camundongo *knockout* para apoE), sobre o infiltrado de lípidos no arco aórtico e a expressão de genes e conteúdo de proteínas vinculadas ao eixo AGE/RAGE, ANGII/AT-1, mediadores inflamatórios e oxidativos.

O tratamento com albumina-AGE acelerou o infiltrado de lípidos na região íntima-média do arco aórtico em comparação aos animais que receberam albumina-C (figura 3). Isto ocorreu mesmo na ausência de variação na concentração plasmática de lípidos e glicose (tabela 1).

Animais dislipidêmicos apresentam aumento de estresse oxidativo plasmático e tecidual e, em decorrência, maior geração de carboximetil-lisina em áreas de lesão aterosclerótica, independentemente da presença de diabetes melito (Palinsky *et al.*, 2005). Em nosso modelo experimental, a albumina-AGE aumentou a marcação imuno-histoquímica para CML na íntima-média arterial (figura 10). Neste sentido, não é sabido o grau de infiltração de albumina-AGE na íntima arterial e se a CML nesta região é consequência direta da albumina modificada. Por outro lado, a CML pode ser também resultado de sua síntese *de novo* a partir do estresse oxidativo local gerado.

O aumento de CML foi acompanhado pelo maior conteúdo proteico do RAGE (figura 9) e de seu mRNA (figura 4) na parede arterial. Por meio de sua ligação ao RAGE, a CML favorece a gênese de estresse oxidativo e inflamatório. De fato, observou-se maior marcação para 4-HNE, marcador de peroxidação lipídica (figura 10). Este achado evidencia maior insulto oxidativo na íntima arterial, o qual propicia a modificação oxidativa de LDL e sua captação por macrófagos por intermédio de receptores *scavenger*. Este evento é crucial nas etapas iniciais da aterogênese e predispõe à formação de células espumosas.

As análises de imuno-histoquímica para CD-68 evidenciaram marcação tênue no grupo tratado com albumina-AGE (figura 12), o que foi reiterado pela análise morfológica da artéria por coloração com HE, a qual revelou ausência de infiltrado significativo de macrófagos na íntima-média da aorta (figura 11).

Interessantemente, a coloração por HE revelou elastálise das fibras elásticas do vaso no grupo tratado com albumina-AGE. Todavia, a losartana foi capaz de impedir essa alteração morfológica. Estudos futuros serão necessários para compreensão dessas alterações na parede do vaso.

Observou-se ainda, maior expressão do mRNA de *Or11*. O LOX-1 é um receptor específico para LDL oxidada e sua atividade vincula-se à maior progressão da aterosclerose (Sawamura *et al.*, 2015). A ativação de receptores *scavenger* e de RAGE, invariavelmente, propiciam a geração de ROS por meio do sistema NADPH oxidase (Ott *et al.*, 2014). Há evidências na literatura de que os AGE, além de aumentarem o estresse oxidativo e se ligarem a LOX-1, modulam positivamente a expressão deste receptor (Jono *et al.*, 2002). Isso foi corroborado neste estudo, com o aumento da peroxidação lipídica através da marcação por 4-HNE (figura 10) e da expressão do mRNA de LOX-1 (figura 9B) nos camundongos tratados com albumina-AGE.

Maior expressão de mRNA de (NOx2), a isoforma de NADPH oxidase mais encontrada no leito vascular, foi induzida pela albumina-AGE (figura 9A). A combinação de alterações celulares como metabolismo mitocondrial prejudicado, ativação de NADPH e hiperlipidemia contribuem para o aumento do estresse oxidativo (Tan *et al.*, 2002; Inoguchi *et al.*, 2000). A atividade de Nox2 na parede endotelial, contribui para produção de ânion superóxido e diminuição do sequestro de NO, o que favorece a geração de ROS e se correlaciona com a progressão da aterosclerose. Esse cenário é potencializado na presença de AGE, LDL oxidada e consequente ativação de RAGE e LOX-1. Em células epiteliais de córnea, obervou-se que os AGE são capazes de fosforilar a subunidade p47phox de Nox2 (Shi *et al.*, 2013), reduzir a atividade da NOS

endotelial (Baumann, 2012), enquanto eleva a produção de endotelina 1 (Quehenberger *et al.*, 2000). Além disso, os AGE sequestram NO (Bucala *et al.*, 1991), o que prejudica a resposta vasodilatadora (Yamagishi *et al.*, 2012), contribuindo para o insulto oxidativo. De forma semelhante, a LDL oxidada promove estresse oxidativo na parede do vaso por meio de uma maior atividade desta oxidase (Galle *et al.*, 2003; Heinloth *et al.*, 2000; Galle *et al.*, 1999)

Por meio da ativação de Nox2, sinalizações de vias pró-apoptóticas e alteração do equilíbrio oxidativo associam-se o aumento do estresse do RE, que tem sido considerado de importante relevância quanto às consequências de alterações fisiopatológicas relacionadas ao balanço redox (Laurindo *et al.*, 2014). Em macrófagos, a indução do estresse do RE por meio de 7-cetocolesterol induziu apoptose e aumento oxidativo (Li *et al.*, 2010).

Estudos prévios evidenciaram que a albumina-AGE, em macrófagos, reduz a remoção de colesterol celular, mediada por apoA-1 e HDL (Machado-Lima *et al.*, 2013), o que eleva a concentração intracelular de esteróis totais e, particularmente, de 7-cetocolesterol, derivado oxigenado do colesterol altamente citotóxico (Iborra *et al.*, 2011). A albumina-AGE aumenta a geração de ROS via sistema NADPH oxidase e mitocondrial. A utilização de aminoguanidina - composto antioxidante e inibidor da formação de AGE - reduziu em 45% a geração de ROS em macrófagos tratados com albumina-AGE, o que corrigiu o efluxo de colesterol celular, mediado pela apoA-1 via receptor ABCA-1 (De Souza Pinto *et al.*, 2012).

Na artéria de animais tratados com albumina-AGE observou-se maior expressão gênica de *Tnf* (TNF- α), o que vai ao encontro da maior expressão de *Ager* (figura 4). A presença de TNF- α está associada a maior produção de ROS

proveniente da ativação de Nox2 em células endoteliais (Brandes *et al.*, 2014). As ROS são apontadas como importantes mediadoras das respostas celulares causadas por TNF- α (Chen *et al.*, 2008).

As vias de sinalização geradas a partir da ativação de receptores do tipo *toll-like* 4 (TLR4), presentes na membrana de células endoteliais, ativam Nox2 (Menden *et al.*, 2013), podendo sua atividade ser aumentada devido à resposta de inflamassomas (Brandes *et al.*, 2014). Modelos animais suscetíveis à aterosclerose apresentam células espumosas com presença de inflamassomas do tipo NLRP3, o que reforça o papel do sistema imunológico no desenvolvimento da aterosclerose (Duewell *et al.*, 2010). A ativação de citocinas inflamatórias como IL-1 β e IL-18 é independentemente regulada pelo inflamassoma tipo NLRP3 e, juntamente com o acúmulo de colesterol na parede arterial, leva à progressão da aterogênese (Harijith *et al.*, 2014). Cristais de colesterol presentes em lesões ateroscleróticas mostraram-se potentes ativadores de NLRP3 (Harijith *et al.*, 2014; Duewell *et al.*, 2010)

A associação entre ROS e a ativadores de NLRP3 tem sido objetivo de investigação em diversos estudos, apontando evidências de que o estresse oxidativo e a atividade de caspase-1 mediada por ATP dependente de ROS são derivados da ativação de Nox e ativadores de NLRP3 (Hua *et al.*, 2013; Riteau *et al.*, 2012; Bauernfeind *et al.*, 2011; Cruz *et al.*, 2007), contribuindo para o perfil inflamatório.

A análise dos genes que transcrevem IL-1 β e IL-18 no arco aórtico dos animais não apresentou diferenças (figura 13A e B). Isso pode ser explicado de forma temporal, possivelmente pelo estágio precoce da aterogênese, uma vez que o ensaio *in vitro* com macrófagos isolados da cavidade peritoneal de

camundongos apoE *knockout* demonstrou que o tratamento com albumina glicada aumenta a transcrição dos genes relacionados a NLRP3 (figura 13C e D) e consequente aumento da secreção de IL-6 para o meio de cultura em comparação ao tratamento com albumina-C (figura 14). Interessante mencionar, que estudos têm buscado um melhor entendimento a respeito da participação de NLRP3 sobre o desenvolvimento da aterosclerose em modelos animais. Menu e colaboradores (2011) demonstraram, utilizando matrizes apoE *knockout* inter cruzadas com modelos de ablação de NLRP3, caspase 1, ou de ASC, que parece não haver uma participação importante do inflamassoma NLRP3 na aterogênese neste modelo animal. Todavia, em camundongos apoE *knockout* alimentados com dieta rica em gordura, o silenciamento do gene que codifica NLRP3 resultou em estabilidade da placa, previniu a progressão da aterosclerose e a indução de citocinas inflamatórias (Zheng *et al.*, 2014). Estudos seguintes são necessários para observarem a correlação entre NLRP3 e aterogênese e sua progressão em modelos animais e humanos, uma vez que o mecanismo pelo qual a ativação de NLRP3 e componentes ativados por sua via de sinalização na imunidade inata endotelial não são totalmente compreendidos devido a escassez de modelos de ablação genética específicos para células endoteliais ou de superexpressão de moléculas cruciais para as vias de sinalização da resposta imunológica inata (Chen *et al.*, 2014).

Nas incubações realizadas *in vitro* com macrófagos expostos à albumina AGE e lipopolissacarídeos observou-se a maior secreção de IL-6, confirmando o insulto inflamatório promovido pela albumina-AGE (figura 14). Okuda e colaboradores (2012) demonstraram que a albumina-AGE sensibiliza macrófagos ao estímulo inflamatório mediado por lipopolissacarídeos e calgranulina, o que

favorece a secreção de várias citocinas inflamatórias e o prejuízo no conteúdo de ABCA-1 e efluxo de colesterol celular.

Não foram observadas alterações na expressão de mRNA de *Nfkb* na aorta dos animais tratados com albumina-AGE em comparação à albumina-C (figura 6C). Este achado é surpreendente, uma vez que o NF-KB é apontado como elo na sinalização de vários receptores scavenger, RAGE e *toll-like receptors*, os quais convergem para a transcrição de genes inflamatórios (Manigrasso *etr al.*, 2014; Hayden & Ghosh, 2012; Patel & Santani, 2009). Entretanto, a determinação do mRNA de *Nfkb* pode não refletir sua atividade transcricional no núcleo celular (Bierhaus *et al.*, 2001).

O acúmulo intracelular de colesterol, estresse oxidativo e inflamatório, promovidos pela albumina-AGE vinculam-se ao estresse do retículo endoplasmático. A resposta do RE frente ao mal enovelamento de proteínas, ocorre por meio de uma gama complexa de sinalização denominada resposta à proteínas mal enoveladas que envolve a atividades de chaperonas específicas do RE. Estudos evidenciam que diversos tipos de Noxs atuam em conjunto com RE nas respostas ao estresse e que chaperonas como a proteína dissulfeto isomerase, estão envolvidas na regulação dessas oxidases (Laurindo *et al.*, 2014). Castilho e colaboradores (2012) demonstraram que a albumina-AGE aumenta de maneira tempo-dependente a expressão de proteínas marcadoras do estresse de retículo (chaperonas Grp78 e 94, calreticulina e proteína dissulfeto isomerase) e da via adaptativa a proteínas mal enoveladas (EIF2 α e ATF6). O uso de chaperona química, ácido-4-fenilbutírico, que reduz o estresse do retículo, foi capaz de restaurar o conteúdo de ABCA-1 e o transporte reverso de colesterol de macrófagos, os quais foram diminuídos pela albumina-AGE. No

presente estudo, entretanto, não foram observadas alterações na expressão dos genes que codificam para os receptores de HDL, ABCA-1 e ABCG-1 (figuras 5C e D). Neste aspecto, convém ressaltar que o conteúdo proteico destes transportadores não foi determinado, o que impede conclusões sobre suas concentrações no leite arterial.

O conteúdo de ABCA-1 é, principalmente, regulado por sua degradação pós-traducional, nos sistemas proteasomal, lisossomal e pela ação de calpaínas de superfície. Resultados recentes de Iborra e colaboradores (2015) evidenciaram que a albumina-AGE aumenta a degradação proteasomal de ABCA-1 em macrófagos, em comparação à albumina-C.

A ablação gênica ou o bloqueio imunológico de RAGE reduz a aterosclerose, a formação de neoíntima e a geração de ANGII por rotas alternativas (Koka *et al.* 2008; Soro-Paavonen *et al.*, 2008). Camundongos *knockout* para apoE urêmicos, tratados com anticorpo anti-RAGE, independentemente de alteração na concentração de lípidos plasmáticos, apresentaram redução da aterosclerose (Bro *et al.*, 2008). Estudos recentes de Machado-Lima e colaboradores (2015) evidenciaram que o RAGE medeia os efeitos deletérios da albumina-AGE sobre a homeostase lipídica em macrófagos. Macrófagos obtidos de camundongos *knockout* para RAGE ou tratados com RNA de interferência para RAGE, não apresentam redução no conteúdo de ABCA-1 e efluxo de colesterol quando incubados com albumina-AGE.

Os achados do presente estudo revelam uma íntima conexão entre todos os eventos observados. Em outras palavras, o estresse oxidativo pode favorecer a geração de AGE, mas também é consequente da sinalização destes

compostos via RAGE, o que exacerba a resposta oxidativa e inflamatória, potencializando o acúmulo de lípidos na íntima-média arterial. A administração de albumina-AGE em camundongos *knockout* para apo E não alterou a concentração plasmática de lípidos e glicose, excluindo a ação destes fatores sobre a gênese da aterosclerose (tabela 1). No entanto, não foram avaliadas alterações tecido-específicas que poderiam contribuir para o risco cardiovascular, como fígado e tecido adiposo. Neste sentido, estudo em andamento em nosso grupo tem evidenciado que, em ratos Wistar, o tratamento crônico com albumina-AGE, por 3 meses, aumenta a secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo periepídimal e induz o acúmulo de triglicérides no fígado. Já foi demonstrado que a albumina-AGE altera a citoarquitetura e a função das ilhotas pancreáticas (Costal *et al.*, 2013), aumenta a inflamação e fibrose hepática (Cai *et al.*, 2014) e, periféricamente prejudica a sensibilidade insulínica (Uribarri *et al.*, 2011). Sendo assim, as ações da albumina-AGE *in vivo* podem ser múltiplas, com reflexo na maior taxa de desenvolvimento de aterosclerose.

A superexpressão do SRA também contribui para a fisiopatologia de eventos cardiovasculares (van Thiel *et al.*, 2015; Montezano *et al.*, 2014). A hipertensão arterial é fator de risco clássico para doença cardiovascular e agravamento do diabetes melito. O bloqueio do receptor AT-1 por meio de antagonistas hipotensores tem sido utilizado há longa data, objetivando-se não só a redução da pressão arterial, mas também uma melhora no funcionamento cardiovascular e no perfil metabólico de pacientes diabéticos e com nefropatia (Miyajima *et al.*, 2015; Moan *et al.*, 1996). A participação do sistema renina-angiotensina nas patologias associadas ao diabetes em humanos é embasada

pela diminuição de incidência em complicações diabéticas, além de efeitos renoprotetores através da utilização de bloqueadores do receptor AT-1 (Cooper, 2004). Modelos animais de DM1 e DM2 tratados com bloqueadores de AT-1 apresentaram redução de incidências cardiovasculares (Senador *et al.*, 2009; Amazonas *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2005).

A expressão de componentes do SRA não foi alterada pela albumina-AGE, o que contraria nossa hipótese inicial de exacerbação do potencial oxidativo e inflamatório pela transativação de *Agtr1a* e *Agt* pela albumina-AGE (figuras 6A e B). Por outro lado, foram observados efeitos favoráveis com o bloqueio do receptor AT-1 pela losartana, a qual preveniu a infiltração de lípidos na parede do aorco aórtico dos animais tratados com albumina-AGE de forma semelhante ao dos animais tratados com albumina-C + losartana (figura 7).

A pressão arterial foi reduzida pela losartana nos grupos C e AGE (tabela 1), o que é invariavelmente observado na literatura em modelos animais em uso deste ou outros bloqueadores de AT-1 em concentrações semelhantes (Tiyerili *et al.*, 2012; Tomono *et al.*, 2008; Ihara *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Candido *et al.*, 2004). Entretanto, a ação benéfica da losartana foi independente de seu efeito sobre a redução da pressão arterial, uma vez que seu efeito foi semelhante nos grupos que receberam albumina-C e albumina-AGE. Isto tem sido evidenciado em estudos que mostram efeito da losartana na prevenção da doença cardiovascular, também aparte de sua ação hipotensora (Zhang *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2007). Xu e colaboradores (2013) evidenciaram que a losartana reduziu a área de lesão aterosclerótica em coelhos hipercolesterolêmicos, independentemente de variação nos lípidos plasmáticos, porém relacionado à diminuição da concentração sérica de IL-6 e proteína C reativa. Resultados

semelhantes foram observados no presente estudo, onde se evidenciou redução da expressão gênica de *Ager* e *Tnf* na aorta dos animais AGE+LOS em comparação ao grupo não tratado (figura 4A e B).

Resultados da qRT-PCR para AT-1 indicam que a losartana reduziu a expressão do mRNA deste receptor no modelo experimental utilizado neste estudo (figura 6A). Todavia, ainda isto não é refletido sobre a expressão proteica de AT-1 na parede arterial (figura 7), diferentemente aos dados da literatura em que a expressão do gene deste receptor é aumentada nas células do leito vascular, tanto em camundongos quanto em humanos (Wassmann *et al.*, 2004). Em acordo com o mRNA de AT-1, não foi observada alteração da expressão de angiotensinogênio (figura 6B), componente da via clássica de produção de angiotensina II.

Frente ao exposto, o aumento do infiltrado de lípidos observado nos animais do grupo tratado com albumina-AGE não se relaciona com ativação local de componentes do SRA, mas com a indução de estresse oxidativo e inflamatório causados pelos AGE. Os efeitos da losartana sobre a redução do mRNA e da proteína de RAGE, assim como consequente redução do conteúdo de AGE na íntima-média arterial são acompanhados pela prevenção da resposta inflamatória e peroxidação lipídica. Além disso, é possível que a losartana module direta ou indiretamente a expressão de outros receptores, como AT-2 e Mas, ECA-2 ou a concentração de angiotensina II, que não foram avaliados na presente investigação .

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo demonstram que a albumina modificada por glicação avançada, independentemente da presença de diabetes melito, alterações nos lípides plasmáticos, pressão arterial e ativação do sistema renina-angiotensina local, favorece o infiltrado de lípidos na parede do aorco aórtico de camundongos dislipidêmicos, o que se vincula ao aumento do estresse oxidativo e inflamatório. Estes eventos podem ser contrapostos pelo bloqueio do receptor AT-1 com losartana.

9. REFERÊNCIAS

- Ahmed KA, Muriandy S, Ismail IS. N ϵ -(Carboxymethyl)lysine and Coronary Atherosclerosis-Associated Low Density Lipoprotein Abnormalities in Type 2 Diabetes: Current Status. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 44, 14-27, 2009.
- Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Front Neurosci.* 2015;9:23.
- Amazonas RB, Lopes De Faria JB. Effects of tight blood pressure control on glomerular hypertrophy in a model of genetic hypertension and experimental diabetes mellitus. *Life Sci.* 2006;79(22):2135–2143.
- Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive α -hydroxy and α,β -unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J Clin Invest.* 1997;99(3):424-32.
- Arsov S, Graaff R, van Oeveren W, Stegmayr B, Sikole A, Rakhorst G, Smit AJ. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(1):11-20.
- Baraka-Vidot J, Planesse C, Meilhac O, Militello V, van den Elsen J, Bourdon E, Rondeau P. Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin. *Biochemistry.* 2015;54(19):3051-62.
- Barlovic DP, Soro-Paavonen A, Jandeleit-Dahm K. RAGE Biology, Atherosclerosis and Diabetes. *Clinical Science.* 2011;121: 43-55.
- Basta G, Lazzerini G, Del Turco S, Ratto GM, Schmidt AM, De Caterina R. At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cells adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(7):1401-7.
- Basta, G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis.* 2008;196:9-21.
- Bauernfeind F, Bartok E, Rieger A, Franchi L, Núñez G, Hornung V. Cutting edge: reactive oxygen species inhibitors block priming, but not activation, of the NLRP3 inflammasome. *J Immunol.* 2011;187,613–617.

Baumann M. Role of advanced glycation end products in hypertension and cardiovascular risk: human studies. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2012;6(6):427-435.

Bierhaus, A; Hofmann, MA; Ziegler R; Nawroth, PP. AGEs and their interaction with AGE-receptor in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovascular Research*. 1998;37: 586-600.

Bierhaus, A; Schiekofer, S; Schwaninger, M; Andrassy, M; Humpert, PM; Chen, J; Hong, M; Luther, T; Henle, T; Klöting, I; Morcos, M; Hofmann, M; Tritschler, H; Weigle, B; Kasper, M; Smith, M; Perry, G; Schmidt, AM; Stern, DM; Häring, HU; Schleicher, E; Nawroth, PP. Diabetes-associated sustained activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B. *Diabetes*. 2001;50:2792-2808.

Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J. Mol. Med*. 2005;83:876-886.

Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:208-26.

Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*. 1996;27:465-475.

Bro S, Binder CJ, Witztum JL, Olgaard K, Nielsen LB. Inhibition of the renin-angiotensin system abolishes the proatherogenic effect of uremia in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1080-86.

Bro S, Flyvbjerg A, Binder CJ, Bang CA, Denner L, Olgaard K, Nielsen LB. A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice. *Atherosclerosis*. 2008;201(2):274-80.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*. 2005;54(6):1615-25.

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

Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced Glycosylation Products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991;87(2):432-8.

Busch M, Franke S, Wolf G, Rohde RD, Stein G, For The Collaborative Study Group. Serum levels of advanced glycation end products N^ε-carboxymethyllysine

and pentosidine are not influenced by treatment with the angiotensin receptor II type 1 blocker irbesartan in patients with type 2 diabetic nephropathy and hypertension. *Nephron Clin Pract.* 2008;108(4):c291-c297.

Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(4):365-79.

Cai W, He JC, Zhu L, Peppas M, Lu C, Uribarri J, Vlassara H. High levels of dietary advanced glycation end products transform low-density lipoprotein into a potent redox-sensitive mitogen-activated protein kinase stimulant in diabetic patients. *Circulation.* 2004;110: 285-291.

Cai XG, Xia JR, Li WD, Lu FL, Liu J, Lu Q, Zhi H. Anti-fibrotic effects of specific-siRNA targeting of the receptor for advanced glycation end products in a rat model of experimental hepatic fibrosis. *Mol Med Rep.* 2014;10(1):306-14.

Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schimdt AM. Therapies for hyperglycemia-induced diabetic complications: From animal models to clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009;8(5):417-29.

Calkin AC, Giunti S, Sheehy KJ, Chew C, Boolell V, Rajaram YS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. The HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin and the angiotensin receptor antagonist candesartan attenuate atherosclerosis in an apolipoprotein E-deficient mouse model of diabetes via effects on advanced glycation, oxidative stress and inflammation. *Diabetologia.* 2008;51:1731-40.

Candido R, Jandeleit-Dahm KA, Cao Z, Nesteroff SP, Burns WC, Twigg SM, Dilley RJ, Cooper ME, Allen TJ. Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2002;106:246-253.

Candido R, Allen TJ, Lassila M, Cao Z, Thallas V, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:1536-42.

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

Castilho G, Sartori C, Machado-Lima A, Nakandakare E, Corrêa-Giannella M, Roverso M, Porcu S, Lapolla A, Traldi P, Passarelli M. Glycated human serum albumin isolated from poorly controlled diabetic patients impairs cholesterol efflux

from macrophages: an investigation by mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom.* 2015;21. Doi: 10.1255/ejms.1322.

Catanozi S, Rocha JC, Passarelli M, Guzzo ML, Alves C, Furukawa LNS, Nunes VS, Nakandakare ER, Heimann JC, Quintão ECR. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. *J Lipid Res.* 2003;44(4): 727-732.

Chang T, Wu L. Methylglyoxal, oxidative stress, and hypertension. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2006, 84:1229-1238.

Chen X, Andresen BT, Hill M, Zhang J, Booth F, Zhang C. Role of reactive oxygen species in tumor necrosis factor- α induced endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rev.* 2008;4(4):245-255.

Chen Z, Martin M, Li Z, Shyy JY. Endothelial dysfunction: the role of sterol regulatory element-binding protein-induced NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 inflammasome in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2014;25(5):339-49.

Cheng CL, Tang Y, Liu X, Ye ZC, Wang C, Lou TQ. Advanced Glycation End-Products Activate the Renin-Angiotensin System Through the RAGE/PI3-K signaling pathway in podocytes. *Clinical and Investigative Medicine.* 2012;35(5):E282.

Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycoxidation-centric” point of view. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases.* 2013; 23(10):913-0.

Cooper ME. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am J Hypertens.* 2004;17(11 pt 2):16S–20S

Costal F, Oliveira E, Raposo A, Machado-Lima A, Peixoto E, Roma L, Santos L, Lopes Faria JB, Carpinelli AR, Giannella-Neto D, Passarelli M, Correa-Giannella ML. Dual effect of advanced glycation end products in pancreatic islet apoptosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29(4):296-307.

Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* 2007;282:2871–2879.

Daugherty A, Lu H, Rateri DL, Cassis LA. Augmentation of renin-angiotensin system by hypercholesterolemia promotes vascular diseases. *Future Lipidology*. 2008;3(6):625-636.

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

Del Turco S, Basta G. An Update on Advanced Glycation Endproducts and Atherosclerosis. *BioFactors* 38(4): 266–274, 2012.

Dhar I, Dhar A, Wu L, Desai KM. Increased Methylglyoxal Formation with Upregulation of Renin Angiotensin System in Fructose Fed Sprague Dawley Rats. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74212.

Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation*. 1996;94(11):2756-67.

Durante A, Peretto G, Laricchia A, Ancona F, Spartera M, Mangieri A, Cianflone D. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(7):981-1004.

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357-1361.

Eberini I, Wait R, Calabresi L, Sensi C, Miller I, Gianazza E. A proteomic portrait of atherosclerosis. *Journal of Proteomics*. 2013;82:92-112.

Engelen L, Persson F, Ferreira I, Rossing P, Hovind P, Teerlink T, Stehouwer CD, Parving HH, Schalkwijk CG. Irbesartan treatment does not influence plasma levels of the advanced glycation end products Ne(1-carboxymethyl)lysine and Ne(1-carboxyethyl)lysine in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. A randomized controlled trial. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2011;26(11):3573-7.

Fernyhough P, Huang T, Verkhatsky A. Mechanism of mitochondrial dysfunction in diabetic sensory neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 2003;8:227-235.

Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, Perego C, Muscogiuri G. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus

micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev.* 2011;7(5):313-24.

Fujita M, Okuda H, Tsukamoto O, Asano Y, Hirata YLA, Kim J, Miyatsuka T, Takashima S, Minamino T, Tomoike H, Kitakaze M. Blockade of angiotensin II receptor reduces the expression of receptors for advanced glycation end products in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:e138-e142.

Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013;1830(12):5509-14.

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

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine.* 2008;264(3):224-36.

Galle J, Schneider R, Heinloth A, Wanner C, Galle PR, Conzelmann E, Dimmeler S, Heermeier K. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int.* 1999;55(4):1450-61.

Galle J, Mameghani A, Bolz SS, Gambaryan S, Görg M, Quaschnig T, Raff U, Barth H, Seibold S, Wanner C, Pohl U. Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(6):1471-9.

Gaut JP, Heinecke JW. Mechanisms for oxidizing low-density lipoprotein: Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2001;11(3-4):103-12.

Geronikaki A, Gavalas A, Dislian V, Giannoglou G. Inhibition of Renin-Angiotensin System and Advanced Glycation End Products Formation: A Promising Therapeutic Approach Targeting on Cardiovascular Diseases. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry.* 2007;5:249-264.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research.* 2010;107:1058-1070.

Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga B. S, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc.* 2004;104(8):1287-91.

Goldin A; Beckman JA; Schmidt AM; Creager MA. Advanced Glycation End Products – Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*. 2006;114:597-605.

Hammes HP, Du X, Edelstein D, Taguchi T, Matsumura T, Ju Q, Lin J, Bierhaus A, Nawroth P, Hannak D, Neumaier M, Bergfeld R, Giordino I, Brownlee M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med*. 2003;9(3):294-9.

Hanssen NM, Beulens JW, van Dieren S, Scheijen JL, van der A DL, Spijkerman AM, van der Schouw YT, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Plasma Advanced Glycation End Products Are Associated With Incident Cardiovascular Events in Individuals With Type 2 Diabetes: A Case-Cohort Study With a Median Follow-up of 10 Years (EPIC-NL). *Diabetes*. 2015;64(1):257-65.

Harijith A, Ebenezer DL, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front Physiol*. 2014;5:352.

Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):203-34.

Hegab Z, Gibbons S, Neyses L, Mamas MA. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World Journal of Cardiology*. 2012;4(4):90-102.

Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(10):1819-25.

Hellwig M, Henle T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014;53(39):10316-29.

Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slaterry T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM. RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell*. 1999;97:889-901.

Hsieh PS, Tai YH, Loh CH, Shih KC, Cheng WT, Chu CH. Functional interaction of AT1 and AT2 receptors in fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Metabolism*. 2005; 54(2):157–164.

Hua KF, Chou JC, Lam Y, Tasi YL, Chen A, Ka SM, Fang Z, Liu ML, Yang FL, Yang YL, Chiu YC, Wu SH. Polyenylpyrrole derivatives inhibit NLRP3 inflammasome activation and inflammatory mediator expression by reducing

reactive oxygen species production and mitogen-activated protein kinase activation. *PLoS One*. 2013;8:e76754.

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

Iborra RT, Machado-Lima A, Nakandakare ER, Yokoyama S, Passarelli M. Proteasomal degradation independently of surface calpains is involved in the reduction of macrophage abca1 protein level elicited by advanced glycation. 17th International Symposium on Atherosclerosis – Translating Atherosclerosis Research into Novel Therapies for Humans; 2015; Amsterdã.

Ihara Y, Egashira K, Nakano K, Ohtani K, Kubo M, Koga J, Iwai M, Horiuchi M, Gang Z, Yamagishi S, Sunugawa K. Upregulation of the ligand-RAGE pathway via the angiotensin II type I receptor is essential in the pathogenesis of diabetic atherosclerosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;43(4):455-64.

Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Molecular Cell Biology*. 2008;9:125-138.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000;49(11):1939-45.

Ishii H, Tsukada T, Yoshida M. Angiotensin II type-I receptor blocker, candesartan, improves brachial-ankle pulse wave velocity independent of its blood pressure lowering effects in type 2 diabetes patients. *Inter Med*. 2008;47:2013-2018.

Isoda K, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. AGE-BSA decreases ABCG1 expression and reduces macrophages cholesterol efflux to HDL. *Atherosclerosis*. 2007;192(2):298-304.

Jono T, Miyazaki A, Nagai R, Sawamura T, Kitamura T, Horiuchi S. Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) serves as an endothelial receptor for advanced glycation end products (AGE). *FEBS Lett*. 2002;511(1-3):170-4.

Jovanovic L, Peterson CM. The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am J Med*. 1981;70(2):331-8.

Kim KJ, Lee B. The Roles of Glycated Albumin as Intermediate Glycation Index and Pathogenic Protein. *Diabetes & Metabolism Journal* 36:98-107, 2012.

Koka V, Wang W, Huang XR, Kim-Mitsuyama S, Truong LD, Lan HY. Advanced glycation end products activate a chymase-dependent angiotensin II generating pathway in diabetic complications. *Circulation*. 2006;113(10):1353-60.

Koka V, Huang XR, Chung AC, Wang W, Truong LD, Lan HY. Angiotensin II up-regulates angiotensin I-converting enzyme (ACE), but down-regulates ACE2 via the AT1-ERK/p38 MAP kinase pathway. *Am J Pathol*. 2008;172(5):1174-83.

Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*. 2014;103:341-349.

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

Laurindo FR, Araujo TL, Abrahão TB. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2755-75.

Lee D, Lee KH, Park H, Kim SH, Jin T, Cho S, Chung JH, Lim S, Park S. The effect of Soluble RAGE on Inhibition of Angiotensin II-Mediated Atherosclerosis in Apolipoprotein E Deficient Mice. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e69669.

Leurs P, Lindholm B. The AGE-RAGE pathway and its relation to cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Archives of Medical Research* 2013; 44(8):601-10.

Li G, Scull C, Ozcan L, Tabas I. NADPH oxidase links endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and PKR activation to induce apoptosis. *J Cell Biol*. 2010;191(6):1113-25.

LIBBY P, RIDKER PM, HANSSON GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473(7347):317-25, 2011.

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.

Lu L, Pu LJ, Zhang Q, Wang LJ, Kang S, Zhang RY, Chen QJ, Wang JG, De Caterina R, Shen WF. Increased glycated albumin and decreased esRAGE levels are related to angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2009;206(2):540-5.

Ludovico-Martins H, Silva C, Teodoro WR, Martini Filho D, Noronha IL. Analysis of different staining techniques for c4d detection in renal allograft biopsies. *Transplant Proc.* 2009;41(3):862-5.

Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary Advanced Glycation End Products and Aging. *Nutrients.* 2010;2:1247-1265.

Machado-Lima A; Iborra RT; Pinto RS; Sartori CH; Oliveira ER; Nakandakare ER; Stefano JT; Ginaella-Neto D; Corrêa-Gianella ML; Passarelli M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1-mediated reverse cholesterol transport. *Diabetes Metabolism Research Reviews* 29(1):66-76, 2013.

Machado-Lima A; Iborra RT, Nakandakare ER, Corrêa-Giannella MLC, Schmidt AM, Passarelli M. RAGE mediates altered gene expression and impaired cholesterol efflux in macrophages elicited by advanced glycated albumin isolated from poorly controlled diabetes mellitus patients. *Crossroads of Lipid Metabolism and Diabetes (D6). Keystone Symposia on molecular and cellular biology – Accelerating life science discovery*; 2015; Copenhagen.

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.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10:417–426.

Matsui T, Nishino Y, Maeda S, Takeuchi M, Yamagishi S. Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mRNA levels in glomerular endothelial cells. *Microvasc. Res.* 2011;81(3):269-73.

Menden H, Tate E, Hogg N, Sampath V. LPS-mediated endothelial activation in pulmonary endothelial cells: role of Nox2-dependent IKK- β phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;304(6):L445-55.

Menu P, Pellegrin M, Aubert JF, Bouzourene K, Tardivel A, Mazzolai L, Tschopp J. Atherosclerosis in apoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis.* 2011;2:e137.

Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Tomita K, Otagiri M. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible

involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. *Hypertens. Res.* 2005;28(12):973-80.

Miyajima A, Kosaka T, Kikuchi E, Oya M. Renin-angiotensin system blockade: Its contribution and controversy. *Int J Urol.* 2015. doi: 10.1111/iju.12827.

Moan A, Høieggen A, Seljeflot I, Risanger T, Arnesen H, Kjeldsen SE. The effect of angiotensin II receptor antagonism with losartan on glucose metabolism and insulin sensitivity. *J Hypertens.* 1996; 14(9):1093-7).

Montecucco F, Pende A, Mach F. The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators of Inflammation.* 2009; 2009:752406. doi:10.1155/2009/752406.

Montezano AC, Nguyen Dinh Cat A, Rios FJ, Touyz RM. Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16(6):431.

Nagai R, Mera K, Nakajou K, Fujiwara Y, Iwao Y, Imai H, Murata T, Otagiri M. The ligand activity of AGE-proteins to scavengers receptors is dependent to their rate of modification by AGEs. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1772(11-12): 1192-8.

Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, Pamplona R, Portero-Otín M. Hyperglycemia and Glycation in Diabetic Complications. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2009;11(12):3071-3109.

Nishikawa T, Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Changes in diabetic retinal protein mRNA levels in a common transgenic mouse strain. *Curr Eye Res.* 2000;21(1):581-7.

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

Ohishi M, Dusting GJ, Fennessy PA, Mendelsohn FA, Li XC, Zhuo JL. Increased expression and co-localization of ACE, angiotensin II AT(1) receptors and inducible nitric oxide synthase in atherosclerotic human coronary arteries. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2010;2(2):111-124.

Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibazaki Y, Iwasaka T, Inada M. Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation.* 1997; 96: 3954-62.

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

Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-29.

Palinski W, Koschinsky T, Butler SW, Miller E, Vlassara H, Cerami A, Witztum JL. Immunological evidence for the presence of advanced glycosylation end products in atherosclerotic lesions of euglycemic rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995; 15(5):571-82.

Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, Pothieneni NV, Watts TE, Romeo F, Mehta JL. Inflammation and Atherosclerosis - Revisited. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2014;19(2):170-8.

Parrinello CM, Selvin E. Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycemic markers in diabetes diagnosis, prognosis, and management. *Curr Diab Rep*. 2014;14(11):548.

Patel S, Santani D. Role of NF-kappa B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep*. 2009;61(4):595-603.

Patton AR, Hill EG. Inactivation of nutrients by heating with glucosescience. *Science*. 1948;107,68.

Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiological Reviews*. 2006;86:747-803.

Passarelli M, Tang C, McDonald TO, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. *Diabetes*. 2005;54:2198-2205.

Pinto RS, Paim BA, Machado-Lima A, Inada N, Nakandakare ER, Vercesi AE, Passarelli M. Reduced ABCA-1 expression in macrophages submitted to glycoxidation relates to an increased mitochondrial and NADPH oxidase-mediated oxidative stress and to a diminished mitochondrial respiratory chain activity. *Atherosclerosis Supplement*. 2009;10(2):1139.

Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343-53.

Potter DD, Sobay CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD. Evidence That Macrophages in Atherosclerotic Lesion Contain Angiotensin II. *Circulation*. 1998;98:800-807.

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

Quintão ECR, Medina WL, Passarelli M. Reverse cholesterol transport in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2000;16:237-250.

Riteau N, Baron L, Villeret B, Guillou N, Savigny F, Ryffel B, Rassendren F, Le Bert M, Gombault A, Couillin I. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis*. 2012;3:e403.

Rodiño-Janeiro BK, González-Peteiro M, Ucieda-Somoza R, González-Juanatey JR, Alvarez E. Glycation albumin, a precursor of advanced glycation end-products, up-regulates NADPH oxidase and enhances oxidative stress in human endothelial cells: molecular correlate of diabetic vasculopathy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2010;26(7):550-8.

Rojas A, Delgado-López F, González I, Pérez-Castro R, Romero J, Rojas I. The receptor for advanced glycation end-products: a complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cell Signal*. 2013;25(3):609-14.

Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. *Biochimie*. 2011;93(4):645-58.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kB through AT1 and AT2 in vascular smooth muscle cells: Molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000;86(12):1266-72.

Rüster C, Bondeva T, Franke S, Tanaka N, Yamamoto H, Wolf G. Angiotensin II upregulates RAGE expression on podocytes: Role of AT2 receptors. *Am J Nephrol*. 2009;29:538-50.

Rüster C, Franke S, Wenzel U, Schmidhaupt R, Fraune C, Krebs C, Wolf G. Podocytes of AT2 receptor knockout mice are protected from angiotensin II-mediated RAGE induction. *American Journal of Nephrology*. 2011;34(4):309-17.

Safi SZ, Qvist R, Kumar S, Batumalaie K, Ismail IS. Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets. *Biomed Res Int*. 2014; doi: 10.1155/2014/801269.

Saito A, Kaseda R, Hosojima M, Sato H. Proximal Tubule Cell Hypothesis for Cardiorenal Syndrome in Diabetes. *Int J Nephrol*. 2010;2011:957164.

Sakata N, Uesugi N, Takebayashi S, Nagai R, Jono T, Horiuchi S, Takeya M, Itabe H, Takano T, Myint T, Tanigushi N. Glycooxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis. *Cardiovascular Research*. 2001;49:466-475.

Sawamura T, Wakabayashi I, Okamura T. LOX-1 in atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta*. 2015 Feb 2;440:157-63.

Sayer G, Bhat G. The Renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure *Cardiology Clinics*. 2014;32(1):21-32.

Schalkwijk CG. Vascular AGE-ing by methylglyoxal: the past, the present and the future. *Diabetologia*. 2015. [Epub ahead of print].

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140(6):821-32.

Schupp N, Schinzel R, Heidland A, Stopper H. Genotoxicity of advanced glycation end products – Involvement of oxidative stress and of angiotensin II type 1 receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1043:685-695.

Selvin E, Francis LMA, Ballantyne CM; Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL, Stefes MW. Nontraditional Markers of Glycemia: Associations with microvascular conditions. *Diabetes Care*. 2011;34:960-967.

Senador D, Kanakamedala K, Irigoyen MC, Morris M, Elased KM. Cardiovascular and autonomic phenotype of db/db diabetic mice. *Exp Physiol*. 2009; 94(6):648–658.

Sevillano N, Gitón 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. *Journal of Biochemistry*. 2009;145(1):21-30.

Shi L, Yu X, Yang H, Wu X. Advanced glycation end products induce human corneal epithelial cells apoptosis through generation of reactive oxygen species and activation of JNK and p38 MAPK pathways. *PLoS One*. 2013;8(6):e66781.

Shiu SW, Wong Y, Tan KC. Effect of advanced glycation end products on lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells. *J. Atheroscler Thromb*. 2012;19(12):1083-92.

Singh, R; Barden, A; Mori, T; Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44:129-146.

Siriopol D, Hogas S, Veisa G, Mititiuc I, Volovat C, Apetrii M, Onofriescu M, Busila I, Oleniuc M, Covic A. Tissue advanced glycation end products (AGEs), measured by skin autofluorescence, predict mortality in peritoneal dialysis. *Int Urol Nephrol*. 2015;47(3):563-9.

Song SO, Kim KJ, Lee BW, Kang ES, Cha BS, Lee HC. Serum glycated albumin predicts the progression of carotid arterial atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012;225(2):450-5.

Soro-Paavonen A, Watson AM, Li J, Paavonen K, Koitka A, Calkin AC, Barit D; Coughlan MT; Drew BG; Lancaster GI; Thomas M; Forbes JM; Nawroth PP; Bierhaus A; Cooper ME; Jandeleit-Dahm KA. Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Deficiency Attenuates the Development of Atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(9):2461-9.

Sourris KC, Morley AL, Koitka A, Samuel P, Coughlan MT, Penfold SA, Thomas MC, Bierhaus A, Nawroth PP, Yamamoto H, Allen TJ, Walther T, Hussain T, Cooper ME, Forber JM. Receptor for AGEs (RAGE) blockade may exert its renoprotective effects in patients with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin II type 2 (AT2) receptor. *Diabetologia*. 2010;53:2442-2451.

Suganuma E, Babaev VR, Motojima M, Zuo Y, Ayabe N, Fogo AB, Ichikawa I, Linton MF, Fazio S, Kon V. Angiotensin inhibition decreases progression of advanced atherosclerosis and stabilizes established atherosclerotic plaques. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2007;18:2311-2319.

Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi Y. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc. Res*. 2009;82(2):371-81.

Tan KC, Chow WS, Ai VH, Metz C, Bucala R, Lam KS. Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(6):1055-9.

Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H. The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- α through nuclear factor- κ B, and by 17 β -Estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000;275(33):25781-90.

Tang C, Kanter JE, Bornfeldt KE, Leboeuf RC, Oram JF. Diabetes reduces the cholesterol exporter ABCA1 in mouse macrophages and kidneys. *J. Lipid Res*. 2010;51:1719–1728.

Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus *Frontiers in Pharmacology*. 2012;3:87.

Tiyerili V, Mueller CFH, Becher UM, Czech T, Van Eickels M, Daiber A, Nickenig G, Wassmann S. Stimulation of the AT2 receptor reduced atherogenesis in apoE-/-/AT1A-/- double knockout mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52:630-637, 2012.

Tomono Y, Iwai M, Inaba S, Mogi M, Horiuchi M. Blockade of AT1 Receptor Improves Adipocyte Differentiation in Atherosclerosis and Diabetic Models. *American Journal of Hypertension* 21:206-212, 2008.

Uehara Y, Miura S, Yahiro E, Saku K. Non-ACE pathway-induced angiotensin II production. *Curr Pharm Des*. 2013;19(17):3054-9.

Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. 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.

Uribarri J, Cai W, Ramdas M, Goodman S, Pyzik R, Chen X, Zhu L, Striker GE, Vlassara H. 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.

van Thiel BS, van der Pluijm I, Te Riet L, Essers J, Danser AH. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol*. 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.090.

Vlassara H, Uribarri J. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both?. *Current Diabetes Reports*. 2014;14(1):453.

Vohra RS, Murphy JE, Walker JH, Ponnambalam S, Homer-Vanniasinkam S. Atherosclerosis and the lectin-like oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16:60-64.

Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, Chen D. Advanced glycation end-product N ϵ -carboxymethyl-Lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis*. 2012;221:387-396.

Wassmann S, Czech T, Van Eickels M, Fleming I, Böhm M, Nickenig G. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/Angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation*. 2004;110:3062-67.

West RK, Moshier E, Lubitz I, Schmeidler J, Godbold J, Cai W, Uribarri J, Vlassara H, Silverman JM, Beeri MS. Dietary advanced glycation end products are associated with decline in memory in young elderly. *Mech Ageing Dev.* 2014;140:10-2.

Xu S, Huang Y, Xie Y, Lan T, Le K, Chen J, Chen S, Gao S, Xu X, Shen X, Huang H, Liu P. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and Dil-oxLDL uptake. *Cytotechnology.* 2010;62:473-481.

Xu YM, Sharma D, Li GP, Zhao YN. Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist, Losartan on Inflammatory Factor in Atherosclerotic Rabbits. *Res Cardiovasc Med.* 2013;2(3):127-32.

Yamagishi S, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012;1820(5):663-71.

Yamazaki KG, Gonzalez E, Zambon AC. Crosstalk Between the Renin–Angiotensin System and the Advance Glycation End Product Axis in the Heart: Role of the Cardiac Fibroblast. *Journal of Cardiovascular Translational Research.* 2012;5(6):805-813.

Yang H, Mohamed ASS; Zhou S. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease.* 2012;11:85-93.

Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes.* 2010;59(1):249-55.

Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta.* 2010;411:1875-1882.

Yu X, Fu Y, Zhang D, Yin K, Tang C. Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta.* 2013;424:245-252.

Zhang YH, Hao QQ, Wang XY, Chen X, Wang N, Zhu L, Li SY, Yu QT, Dong B. ACE2 activity was increased in atherosclerotic plaque by losartan: Possible relation to anti-atherosclerosis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2014. pii: 1470320314542829.

Zheng F, Xing S, Gong Z, Mu W, Xing Q. Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:507208.

Zhu WW, Liu XP, Wu N, Zhao TT, Zhao Y, Zhang J, Shao JH. Beneficial effects of losartana on vascular injury induced by advanced glycosylation end products and their receptors in spontaneous hypertension rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 304:35-43, 2007.