Juliana Tironi Machado

N-acetilcisteína reduz o estresse de retículo endoplasmático e afeta seletivamente o efluxo de colesterol de macrófagos mediado por ABCA-1 e ABCG-1 na doença renal crônica

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

Programa de Endocrinologia
Área de concentração: Lípides
Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2014

Juliana Tironi Machado

N-acetilcisteína reduz o estresse de retículo endoplasmático e afeta seletivamente o efluxo de colesterol de macrófagos mediado por ABCA-1 e ABCG-1 na doença renal crônica

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

Programa de Endocrinologia
Área de concentração: Lípides
Orientadora: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo

2014

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Lípides (LIM 10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apoio financeiro FAPESP - 11/03773-5.

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 (0857/07).

Dedico esta dissertação aos meus pais, Vornei e Ana Maria que sempre me incentivaram a fazer o que eu gosto, me apoiando em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Marisa Passarelli, por todo o aprendizado, paciência e exemplo de profissional.

Ao meu amigo Dr. Sérgio Catanozi, que foi meu co-orientador durante o período de iniciação científica e que acabou se tornando um grande amigo. Agradeço a todos os conselhos, as nossas conversas, aos nossos árduos dias de cirurgia que resultava em muita sangria, mas também em boas risadas.

À Dra. Edna Nakandakare, chefe do laboratório, pela oportunidade do conhecimento científico e por sempre estar disposta a sanar minhas dúvidas.

Ao Dr. Éder Carlos Rocha Quintão, Professor emérito da FMUSP, por compartilhar conosco seu extraordinário conhecimento.

Ao Dr. Rodrigo Iborra, por toda sua paciência perante minhas infinitas dúvidas, por todo o companheirismo de bancada, por me ajudar a discutir os resultados, sempre me mostrando novas ideias que acabavam me animando, principalmente quando o resultado obtido não era aquele que eu almejava.

À Dra. Adriana Machado-Lima, por ser sempre prestativa me ajudando a solucionar os problemas da sala de cultura, principalmente, por me substituir nos congressos que não conseguia ir, e por ser amiga acima de tudo.

À minha querida amiga Tatiana Venâncio, por sempre estar presente tanto na minha vida de laboratório quanto na minha vida pessoal, por ser confidente, companheira, por me dar puxões de orelha e ao mesmo tempo ser parceira.

Ao meu querido amigo Diego Gomes, por alegrar meus dias com seu ótimo alto astral, com seus vídeos engraçadíssimos, por me ajudar a traduzir aulas, abstracts, papers, por todos os ensinamentos pessoais e por todas nossas conversas.

Às minhas queridas amigas Tchura, Paulete, Fefê e Karol que se tornaram muito mais do que amigas de bancada, por todo o companheirismo, o querer bem, as palavras e os ótimos momentos que passamos juntas, um agradecimento em especial a Karolzinha, por ter me proporcionado encontrar o André Luiz.

À Dra. Lígia Okuda por todas as ajudas e descontrações tanto no laboratório quanto nos congressos.

À secretária de laboratório mais competente que conheço Claudia de Souza, por ser sempre prestativa me ajudando nas burocracias relacionadas à pesquisa.

As técnicas de laboratório Fabiana Ferreira e Kelly, por toda a ajuda e as descontrações no dia a dia, em especial à Fabi, por viver comigo os problemas da sala de cultura sempre muito solícita.

À Maria Silvia Lavradouro, Liz, Eliton, Bruna, Guilherme, Patrícia Cazita, Valéria Nunes, Ana Maria Lottemberg, Gabriela Castilho, Raphael Pinto, Camila Canteiro, Jussara Rocha, Débora Rocco e Ana Rosa, por todo o apoio técnico e intelectual prestado neste trabalho e pelos ótimos momentos que compartilhamos não só no período do mestrado, mas também no período de iniciação científica.

À Rosibel Silva e a Dona Ana, por sempre deixarem tudo organizado e limpo para que pudéssemos desenvolver o projeto.

À Dra. Maria Heloisa Shimizu, ao Dr. Antônio Carlos Seguro e todos os amigos do LIM 12, que foram muito solícitos nos ajudando nas dúvidas relacionadas ao projeto.
Ao Walter Campestre e ao Antônio, por me ajudar a cuidar dos animais no biotério, sempre muito solícitos e atenciosos.

A todos meus amigos de fora do laboratório, em especial Karina de Souza, Jayana de Souza, Gabriela Berti, Simone Batista, Mariana Beu Rae e Elaine Oliveira que compartilharam comigo todos meus sentimentos em relação ao projeto e que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu namorado André Luiz, pelo incentivo, por ser sempre prestativo me ajudando a solucionar problemas referentes ao mestrado, por escutar meus desabafos e por ser parceiro.

Aos meus pais novamente, Vornei e Ana Maria e ao meu irmão Luiz Fernando, por acreditarem na minha capacidade sempre me apoiando.

A todos meus familiares que sempre rezaram e contribuíram de alguma forma para a minha formação.

À Deus, pela dádiva da sabedoria e do conhecimento, e por toda minha fé.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - pelo apoio financeiro.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.” *Benjamin Disraeli*

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.” *Eleanor Roosevelt*

“É impossível haver progresso sem mudança e, quem não consegue mudar a si mesmo, não muda coisa alguma.” *George Bernard Shaw*

“A persistência é o menor caminho do êxito.” Charles Chaplin

"Muitas vezes, esperar uma resposta faz parte da resposta." *John Blanchard*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. *Marthin Luther King*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Doença Renal Crônica e o risco Cardiovascular 1

1.2. Doença Renal Crônica e alterações no metabolismo glico-lipídico 3

1.3. Produtos de Glicação Avançada, Oxidação e Carbamilação na Doença Renal Crônica..... 8

1.4. Transporte reverso de colesterol na Doença Renal Crônica 16

1.5. Estresse de retículo endoplasmático 25

1.6. N-acetilcisteína.....29

2. JUSTIFICATIVA 34

3. OBJETIVO..... 35

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 36

4.1. Animais 36

4.2. Modelo Experimental 36

4.2.1. Nefrectomia 5/6..... 36

4.3. Protocolo de Tratamento 38

4.4. Dosagens Bioquímicas 38

4.5. Medida da pressão arterial sistólica caudal (PAS) 39

4.6. Determinação de pentosidina e de produtos de glicação avançada (AGE) 39

4.7. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) 40

4.8. Isolamento da Albumina do Soro dos Animais 40

4.9. Purificação de albumina sérica por extração alcoólica 42

4.10. Determinação do conteúdo celular dos receptores ABCA-1, ABCG-1 e de marcadores de estresse de retículo endoplasmático, Grp78/Bip, Grp94, PDI - Western Blotting 44

4.11. Obtenção de lipoproteínas de *pool* de plasma humano 45

4.12. Acetilação das LDL 46

4.13. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos 47

4.14. Teste de viabilidade celular 49

4.15. Análise Estatítica.....50

5. RESULTADOS 51

6. DISCUSSÃO 73

7. CONCLUSÃO..... 8**2**

8. REFERÊNCIAS.....83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transporte reverso de colesterol. 17

Figura 2. Modelo topológico dos transportadores ABCA-1 (A) e ABCG-1 (B)..... 19

Figura 3. Fórmula estrutural da N-acetilcisteína..... 30

Figura 4. Extração de albumina do *pool* do soro dos animais dos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC por FPLC, utilizando-se coluna HitraptmBlue. 42

Figura 5. Eletroforese de albumina isolada do pool dos animais dos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC. 43

Figura 6. Peso corporal (g) dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (DRC + NAC; n = 32) no período final……..…….....……....51

Figura 7. Pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) dos grupos Doença Renal Crônica (DRC; n = 6) e DRC + N-acetilcisteína (DRC + NAC; n = 6) nos períodos basal e final.....52

Figura 8. Concentração plasmática de ureia dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final..... 53

Figura 9. Concentração plasmática de creatinina dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doena Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final. 54

Figura 10. Excreção urinária de proteína de 24 h dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final do estudo. 55

Figura 11. Concentração plasmática de triglicérides dos grupos C (n = 31), C + NAC (n = 20), DRC (n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final do experimento..... 56

Figura 12. Concentração plasmática de colesterol total dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n=20), Doença Renal Crônica (DRC; n=74) e DRC+NAC (n=32) após 60 dias de estudo 57

Figura 13. Concentração plasmática de glicose dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença renal Crônica (DRC; n=74) e DRC + NAC (n = 32) no período final do estudo.....58

Figura 14. Determinação de produtos de glicação avançada (AGE).....59

Figura 15. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro dos animais dos grupos Controle (C; n = 7), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 7), Doença Renal Crônica (DRC; n = 7) e DRC + NAC (n = 7) após 60 dias de estudo.....61

Figura 16. Conteúdo da PDI em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C+NAC, albumina-DRC e albumina-DRC+NAC por 18 h. 62

Figura 17. Conteúdo das proteínas Grp 78 (painel A) e Grp 94 (painel B) em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC por 18 h. 63

Figura 18. Efluxo de 14C-colesterol de macrófagos J774 tratados com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC, mediado por apo A-I....6**5**

Figura 19. Conteúdo do receptor ABCA-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC por 18 h.....66

Figura 20. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos J774 tratados com albumina-C, albumina-C+NAC, albumina-DRC e albumina-DRC+NAC, mediado por HDL_2 67

Figura 21. Conteúdo do receptor ABCG-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C+NAC, albumina-DRC e albumina-DRC+NAC, por 18h. 68

Figura 22. Conteúdo do receptor ABCA-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com NAC nas concentrações 10mM, 20mM e 30mM por 8h (painel A) e 18h (painel B).....69

Figura 23. Conteúdo do receptor ABCG-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com NAC nas concentrações 10mM, 20mM e 30mM por 8h (painel A) e 18h (painel B).....71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento e classificação da doença renal crônica (DRC).....2

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCA-1 - ATP - *binding cassette transporter, subfamily A, member 1*

ABCG-1 - ATP - *binding cassette transporter, subfamily G, member 1*

ACAT - Acilcolesterol aciltransferase

AGE - Produto de glicação avançada

AGER1 **–** Receptor tipo 1 para produto de glicação avançada

ALE – Produtos avançados de lipoxidação

AMPc - *8-Bromoadenosine 3´, 5´-cyclic monophosphate*

Apo A-I - Apolipoproteína A-I

Apo A-II – Apolipoproteína A-II

Apo B - Apolipoproteína B

Apo C-II – Apolipoproteína C-II

Apo C-III – Apolipoproteína C-III

Apo E – Apolipoproteína E

ATF4 – Ativador de transcrição fator 4

ATF6 – Ativador de transcrição fator 6

AT1 – Angiotensina 1

ATP – Adenosina trifosfato

BCA – Ácido bincinconínico

Bcl-2 – Célula-B de linfoma 2

bZIP- *Basic Leucine Zipper Domain*

C – Controle

CD36 – *Cluster* de diferenciação 36 (receptor *scavanger*)

cdc42/rac – GTPase pertencente a família Rho

CE – Colesterol esterificado

CEL - Carboxietil-lisina

CETP - Proteína de transferência de colesterol esterificado

CHOP – Proteína homologa C/EBP

CL – Colesterol livre

CML - Carboximetil-lisina

C+NAC – Controle+N-acetilcisteína

CT – Colesterol total

C/EBP- CCAAT-*enhancer-binding proteins*

DG – 3-deoxiglicasona

DHE - Dihidroetídio

DM – Diabete melito

DMEM – Meio *Eagle* modificado por Dullbecco

dP/dt – Variação da pressão por intervalo de tempo

DRC - Doença renal crônica

DRC+NAC – Doença renal crônica+ N-acetilcisteína

DR – 4 – *Direct repeat 4*

DTAEP – Departamento técnico de apoio ao ensino e pesquisa

ECL- Reação de quimiluminescência

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

eIF2α – Fator de iniciação eucariótica 2α

EP – Erro padrão

ERAD – Degradação associada ao retículo endoplasmático

FAFA – Albumina isenta em ácido graxo

FEEL-1 - *Fasciclin EGF-like, laminin-type EGF-like, and link domain-containing scavenger receptor-1*

FPLC – Cromatografia para separação rápida de proteína

GAD - Glicoaldeído

GO - Glioxal

GPx – Glutationa peroxidase

Grp78 – Proteína relacionada à glicose 78

Grp94 – Proteína relacionada à glicose 94

GSH – Glutationa reduzida

GSSG – Glutationa oxidada

HbA_{1c} – Hemoglobina glicada

HDL- Lipoproteína de densidade alta

HMGCoA – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase

HNE – 4-hidroxi-trans-2-nonenal

IDL- Lipoproteína de densidade intermediária

IL – 6 – Interleucina 6

IRE – *Inositol-requiring enzyme*

IκB – Inibidor do fator nuclear kappa B

JAK/STAT - Janus cinase 2/STAT

KDEL – Sequência Lisina-Ácido aspártico-Ácido glutâmico-Leucina

LCAT – Lecitina colesterol aciltransferase

LDH – Lactato desidrogenase

LDL - Lipoproteína de densidade baixa

LH – Lipase hepática

LOX-1 – Receptor de LDL modificada

Lp(a) – Lipoproteína (a)

LPL – Lipoproteína lipase

LRP – Proteína relacionada ao receptor de LDL

LXR - Receptor X do fígado

MAPkinase – Proteína cinase ativada por mitógenos

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein*

MDA - Malonildialdeído

MGO - Metilglioxal

mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro

NAC - N-acetilcisteína

NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NBD – Nucleotide binding domain

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NO - Óxido nítrico

PA – Pressão arterial

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Tampão fosfato

PDI – Proteína Isomerase Dissulfeto

PERK - *PK-like ER Kinase*

PEST – Prolina, ácido glutâmico, serina e treonina

PM – Peso molecular

PMSF – Fluoreto de fenil metila sulfonila

PI3kinase – Fosfatidil inositol 3 cinase

p21ras – GTPase p21ras

QM – Quilomícron

RAGE – Receptor para produto de glicação avançada

RE – Retículo endoplasmático

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute* (Meio)

ROS – Espécie reativa de oxigênio

RXR - Receptor X retinoide

SBCAL – Sociedade brasileira de ciência em animais de laboratório

Ser51 – Serina 51

SFB – Soro fetal bovino

SR-A – Receptor *scavanger* A

SR-BI – Receptor *scavanger* B tipo I

SRBP-2 – *Sterol regulatory element-binding protein 2*

SOD – Superóxido dismutase

S1P – Protease de sítio 1

S2P – Protease de sítio 2

S100B – *S100 calcium binding protein B*

TBARS – Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

TBS – Tampão Tris

TCA – Ácido tricloroacético

TG - Triglicérides

TNF – Fator de necrose tumoral

TRC – Transporte reverso do colesterol

UPR – Resposta a proteína mal enovelada

VCAM – *Vascular cell adhesion molecule*

VLDL- Lipoproteína de densidade muito baixa

XBP -1 – *X-box DNA-binding protein*

RESUMO

Machado J.T. ***N-acetilcisteína reduz o estresse de retículo endoplasmático e seletivamente afeta o fluxo de colesterol de macrófagos mediado por ABCA-1 e ABCG-1 na doença renal crônica*** **[dissertação].** São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 104p.

Produtos de glicação avançada, carbamilação e estresse oxidativo contribuem como fatores de risco não tradicionais para a aterosclerose na doença renal crônica (DRC), em parte, por prejudicarem o metabolismo lipídico e por representarem um mecanismo de injúria memorizado ao longo do desenvolvimento da doença renal. A albumina sérica, isolada de animais com DRC, reduz a remoção de colesterol mediado por apoA-I e subfrações de HDL, prejudicando o fluxo de colesterol de macrófagos arteriais ao fígado por meio do transporte reverso de colesterol. **Objetivo:** Avaliou-se a influência do tratamento com N-acetilcisteína (NAC) em ratos com DRC sobre a concentração plasmática de produtos de oxidação e glicação avançada e o reflexo sobre os efeitos da albumina sérica sobre o efluxo de colesterol e o estresse de retículo endoplasmático em macrófagos. **Métodos:** Ratos Wistar com 2 meses de idade, pesando aproximadamente 200-250g foram submetidos à nefrectomia 5/6 e mantidos por 60 dias (grupo DRC) com ou sem tratamento com N-acetilcisteína na água (600mg/L), após o 7° dia de indução da DRC (grupo DRC + NAC). Animais controles foram falso-operados (grupo C) e um subgrupo submetido ao tratamento com NAC (C + NAC). No início e no final do estudo foram determinadas as concentrações plasmáticas de glicose, colesterol (CT), triglicérides (TG), ureia, creatinina e na urina, excreção urinária de proteína de 24 h. AGE totais, pentosidina, TBARS (marcador de peroxidação lipídica) e pressão arterial sistólica (PAS) foram determinados no final do estudo. A albumina sérica foi isolada por cromatografia rápida para separação de proteínas e purificada por extração alcoólica. Macrófagos J774 foram incubados por 18 h com as albuminas dos diferentes grupos experimentais para determinação do conteúdo dos receptores de HDL (ABCA-1 e ABCG-1) e de marcadores de estresse de retículo endoplasmático (chaperonas Grp 78, Grp94 e proteína dissulfeto isomerase, PDI) por imunolbot e efluxo de colesterol, mediado por apo A-I e HDL_2. Para isto, as células foram previamente enriquecidas com LDL-acetilada e ^{14}C-colesterol. Macrófagos foram também incubados isoladamente com concentrações crescentes de NAC para avaliação do conteúdo dos receptores de HDL. **Resultados:** Ao final do estudo, o peso corporal foi 10% menor no grupo DRC em comparação ao C (p=0,006). Esta alteração foi prevenida pelo tratamento com

NAC. A PAS (mmHg) foi maior no grupo DRC (130±3) em comparação ao grupo DRC+NAC (109±3; p=0,0004). Ureia, creatinina, CT, TG (mg/dL), proteinúria (mg/24 h), AGE total, pentosidina (unidades arbitrárias de fluorescência) e TBARS (nmol/mL) foram maiores nos grupos DRC em comparação ao grupo C (122±8 *vs.* 41±0,9 ; 0,9±0,07 *vs.* 0,4±0,03; 151±6 *vs.* 76±2,7; 83±4 *vs.* 51,5±3; 46±2,5 *vs.* 14±0,9; 32620±673 *vs.* 21750±960; 16700±1370 *vs.* 5314±129; 6,6±0,5 *vs.* 2±0,2, respectivamente) (p<0,0001) e nos grupos DRC+NAC em comparação ao grupo C+NAC (91,4±5 *vs.* 40±0,9 ; 0,6±0,02 *vs.* 0,3±0,02; 126±7,5 *vs.* 76±2,6; 73±6 *vs.* 68±4; 51±3,5 *vs.* 18,4±1,5; 24720±1114 *vs.* 20040±700; 10080±748 *vs.* 5050±267; 4,5±0,5 *vs.* 1,8±0,2, respectivamente) (p<0,0001). No grupo DRC + NAC, PAS, CT, ureia, creatinina, AGE total, pentosidina e TBARS foram, respectivamente, 17% (p=0,0004), 17% (p=0,02), 25% (p=0,02), 33% (p=0,06), 24% (p<0,0001), 40% (p=0,0008), 28% (p=0,009) menores do que no grupo DRC. A glicemia foi maior nos grupos C + NAC (107±4,6) e DRC + NAC (107±2,6) em comparação ao C (96±1,8) e DRC (98±1,6), respectivamente. Macrófagos tratados com albumina-DRC apresentaram maior conteúdo de PDI (5 vezes; p=0,02 e 7 vezes p=0,02) e Grp94 (66 %; p =0,02 e 20 %; p=0,02) quando comparados aos tratados com albumina-C ou albumina-DRC + NAC, respectivamente. O conteúdo do receptor ABCA-1 foi menor 87% e 70% (p<0,01) nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC e albumina-DRC, respectivamente em comparação com albumina-C. O conteúdo de ABCG-1 foi, respectivamente, 4 e 7,5 vezes maior nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC e albumina-DRC+NAC em comparação as respectivas situações sem tratamento. O efluxo de colesterol mediado por apo A-I foi 59 % e 70 % (p<0,0001) menor nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC e albumina-DRC, respectivamente em comparação a albumina-C. O efluxo de colesterol mediado pela HDL_2 foi 52 % maior nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC em comparação as células tratadas com albumina-C. Não houve diferença no conteúdo do receptor ABCA-1 nos macrófagos tratados com concentrações crescentes NAC por 8 h. No entanto, após 18 h, o ABCA-1 diminuiu 50 %, 69 % e 72 % nos macrófagos tratados respectivamente com 10 mM, 20 mM e 30 mM de NAC isoladamente em comparação aos macrófagos controles. O conteúdo de ABCG-1 nos macrófagos tratados com NAC, em 8 h e 18 h não sofreu alteração. **Conclusão:** A N-acetilcisteína reduz produtos de oxidação e glicação avançada no plasma de animais com DRC e previne o estresse de RE em macrófagos, induzido pela albumina isolada destes animais. Apesar de diminuir o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol mediado por apo A-I, a NAC aumenta o conteúdo de ABCG-1. Desta forma, a NAC pode contribuir para atenuar os efeitos deletérios da albumina modificada na DRC sobre o acúmulo lipídico em macrófagos, contribuindo para a prevenção da aterosclerose.

ABSTRACT

Machado J.T. ***N-acetilcisteína reduces endoplasmic reticulum stress and selectively affects cholesterol efflux mediated by ABCA-1 and ABCG-1 in chronic kidney disease*** [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.104p.

Advanced glycation, carbamylation and oxidative stress c contribute to atherosclerosis in chronic kidney disease (CKD) as nontraditional risk factors. They impair lipid metabolism and promote a long last injury during the development of CKD. Serum albumin isolated from CKD-animals reduces cholesterol efflux mediated by apoa A-I and HDl subfractions, impairing the cholesterol flux from arterial wall macrophage to the the liver by the reverse cholesterol transport (RCT).**Objective:** In the present study it was analyzed the influence of N-acetylcysteine treatment in CKD-rats in plasma concentration of lipid peroxides and advanced glycation end products and the effect of serum albumin in macrophage cholesterol efflux and endoplasmic reticulum stress development. **Methods:** Two months male Wistar weighting 200-250g were submitted to a 5/6 nephrectomized maintained for 60 days (CKD group) treated or not with N-acetylcysteine in water (600 mg/L), after the seventh day of CKD induction (CKD+NAC group). Sham animals were false-operated (SHAM group) and a subgroup was treated with NAC (SHAM+NAC group). In the basal and final periods it was determined plasma concentration of glucose, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), urea, creatinine and 24h-urinary protein excretion (UPE). Total AGE, pentosidine, thiobarbituric reactive substances (TBARS) levels and systolic blood pressure (SBP) were measured at the final period only. Serum albumin was isolated by fast protein liquid chromatography and purified by alcoholic extraction. J774 macrophage were incubated for 18 h with albumin isolated from the experimental groups in order to determine the content of HDL receptors and markers of endoplasmic reticulum stress (Grp78, Grp94 and protein dissulfide isomerase, PDI) by immunioblot and cholesterol efflux mediated by apo A-I and HDL_2. For this, cells were previously overloaded with acetylated LDL and ^{14}C-cholesterol. Macrophage were also incubated with different concentrations of NAC alone in order to measure HDL-receptors and cholesterole efflux. **Results:** In the end of the protocol, body weight was 10% lower in CKD group in comparison to SHAM group (p=0.006). This change was preserved by treatment with NAC. SBP (mmHg) was higher in CKD group (130±3) in comparison to CKD+NAC (109±3; p=0.0004). Urea, creatinine,

TC, TG (mg/dL), UPE (mg/24 h), total AGE, pentosidine (arbitrary units of fluorescence) and TBARS (nmol/mL) were higher in CKD group in comparison to SHAM (122±8 vs. 41±0.9; 0.9±0.07 vs. 0.4±0.03; 151±6 vs. 76±2.7; 83±4 vs. 51.5±3; 46±2.5 vs. 14±0.9; 32620±673 vs. 21750±960; 16700±1370 vs. 5314±129; 6.6±0.5 vs. 2±0.2, respectively) ($p<0.0001$) and in CKD+NAC in comparison to C+NAC (91.4±5 *vs.* 40±0.9 ; 0.6±0.02 *vs.* 0.3±0.02; 126±7.5 *vs.* 76±2.6; 73±6 *vs.* 68±4; 51±3.5 *vs.* 18.4±1.5; 24720±1114 *vs.* 20040±700; 10080±748 *vs.* 5050±267; 4.5±0.5 *vs.* 1.8±0.2, respectively) ($p<0.0001$). In CKD+NAC group, SBP, TC, urea, creatinine, total AGE, pentosidine and TBARS were, respectively, 17 % ($p=0.0004$), 17 % ($p=0.02$), 25 % ($p=0.02$), 33 % ($p=0.06$), 24 % ($p<0.0001$), 40 % ($p=0.0008$), 28 % ($p=0.009$) lower than CKD group. Glycemia was higher in SHAM+NAC (107±4.6) and CKD+NAC (107±2.6) in comparison to SHAM (96±1.8) and CKD group (98±1.6), respectively. Macrophages treat with CKD-albumin presented higher content of PDI (5 times; $p=0.02$ e 7 times $p=0.02$) and Grp94 (66 %; $p=0.02$ e 20 %; $p=0.02$) when compared to SHAM-albumin and CKD+NAC-albumin- treated cells, respectively. ABCA-1 protein content was 87 % and 70 % ($p<0.01$) lower in macrophages treated with SHAM+NAC-albumin and CKD-albumin, respectively compared with SHAM-albumin. ABCG-1 protein level was respectively 4 and 7.5 times higher in macrophages treated with SHAM+NAC-albumin and CKD+NAC-albumin in comparison to their respective controls without treatment. The cholesterol efflux mediated by apo A-I was 59 % and 70 % ($p<0.0001$) lower in macrophages treated with SHAM+NAC-albumin and CKD-albumin, respectively, when compared to SHAM-albumin. The HDL_2-mediated cholesterol efflux was 52 % higher in macrophages treated with SHAM+NAC-albumin compared to macrophages treated with SHAM-albumin. No difference was observed in the ABCA-1 protein level in macrophages treated with crescent concentrations of NAC alone for 8 h. Nonetheless, after 18 h, ABCA-1 was 50 %, 69 % and 72 % reduced in macrophages treated, respectively, with 10 mM, 20 mM and 30 mM NAC in comparison to control cells. ABCG-1 content in macrophages treated with NAC for 8 h and 18 h was not changed.

Conclusion: NAC reduces plasma lipid peroxidation and AGE in CKD animals and prevents the endoplasmic reticulum stress induced by CKD-albumin in macrophages. Despite diminishing ABCA-1 and apo A-I-mediated cholesterol efflux, NAC increases ABCG-1. Then, NAC may contribute to attenuate the deleterious effects of the in vivo modified albumin on lipid accumulation in macrophages helping to prevent atherosclerosis in CKD.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença Renal Crônica e o Risco Cardiovascular

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada por perda lenta, progressiva e irreversível das funções regulatórias, excretoras e endócrinas dos rins. (*K/DOQI (NKF)*, 2002; JBN, 2004). Ela progride ao longo de 5 estágios, de acordo com a crescente diminuição da taxa de filtração glomerular. No estágio 1 ou fase de lesão com função renal normal, a taxa filtração glomerular encontra-se preservada (> 90 mL/min/1,73 m^2). No estágio 2 ou fase de insuficiência renal funcional ou leve inicia-se a perda de função do rim. No entanto, as concentrações plasmáticas de ureia e creatinina apresentam-se dentro dos valores de referência e somente métodos acurados de avaliação de função renal (método de depuração e *clearance,* por exemplo) são capazes de detectar estas anormalidades. A taxa de filtração glomerular permanece entre 60 e 89 mL/min/1,73 $m^{2.}$ No estágio 3 ou fase de insuficiência renal laboratorial ou moderada, os sinais e sintomas da uremia podem estar presentes de maneira discreta; o paciente mantém-se clinicamente bem. No entanto, pode apresentar sinais e sintomas da causa inicial, como: lúpus eritematoso sistêmico, hipertensão arterial, diabete melito, infecções urinárias, glomerulonefrites, e outros, aos quais se sucedeu a lesão renal. As concentrações plasmáticas de ureia e creatinina apresentam-se elevadas (a taxa de filtração glomerular permanece entre 30 e 59 mL/min/1,73 m^2). No estágio 4 ou fase de insuficiência renal clínica ou grave, há manifestação acentuada do quadro de

uremia, com anemia, hipertensão arterial, edema, fraqueza, mal-estar e sintomas digestivos. Nesta etapa, a taxa de filtração glomerular permanece entre 15 a 29 mL/min/1,73 m^2. No estágio 5 ou fase terminal da insuficiência renal crônica, o paciente manifesta-se intensamente sintomático e a taxa de filtração glomerular permanece inferior a 15 mL/min/1,73 m^2. As opções terapêuticas são os métodos de depuração artificial do sangue (diálise peritoneal ou hemodiálise) ou o transplante renal (ROMÃO, 2004; BASTOS & KIRSZTAJN, 2011) (**Tabela 1.**).

Tabela 1. Estadiamento e classificação da doença renal crônica

Estágios	Filtração Glomerular (mL/min/1,73 m^2)	Descrição
1	>90	Lesão com função renal normal
2	60-89	Insuficiência renal funcional ou leve
3	30-59	Insuficiência renal laboratorial ou moderada
4	15-29	Insuficiência renal clínica ou grave
5	<15	Fase terminal de insuficiência renal crônica

A DRC está associada à maior prevalência de aterosclerose e aumento da morbidade e mortalidade por doença cardiovascular (MOODY *et al.,* 2013). Fatores de risco tradicionais, como dislipidemia e hipertensão arterial encontram-se presentes na DRC, contribuindo para a aterosclerose. No entanto, mesmo

após normalização dos lípides plasmáticos, por exemplo, pelo uso de estatinas e correção para fatores de risco, persiste o risco cardiovascular em pacientes com DRC.

Com a diminuição da taxa de filtração glomerular ocorre o acúmulo de toxinas urêmicas, intermediários reativos derivados da ureia e compostos carbonila que contribuem para o estabelecimento de fatores de risco não tradicionais, como inflamação, estresse oxidativo e formação de produtos de glicação avançada (AGE) e de carbamilação. Esses exacerbam o risco cardiovascular primário, aumentado 30 vezes em pacientes com DRC, em comparação à população geral (MORADI *et al.*, 2009a; APOSTOLOV *et al.*, 2010; HORL *et al.,* 2004).

1.2. Doença Renal Crônica e alterações no metabolismo glico-lipídico

As alterações no metabolismo glico- lipídico contribuem para as complicações cardiovasculares típicas da DRC. Seu estabelecimento vincula-se diretamente à progressão da DRC, caracteristicamente pela elevação da proteinúria (YAMAGATA *et al.;* 2007; SCHAEFFNER *et al.,*2003; MANTTARI *et al.,* 1995; TOZAWA *et al.,* 2002) e favorece a evolução da doença.

Alterações multifatoriais na homeostase da glicose ocorrem concomitantemente ao declínio da função renal. Em decorrência dessas alterações, nota-se o acúmulo de toxinas urêmicas e AGE, inflamação crônica,

estresse oxidativo, excesso de gordura visceral, acidose metabólica e deficiência de vitamina D, o que leva ao aumento de resistência insulínica em pacientes com DRC (WILLIANS & GARG, 2014).

Na uremia, o estímulo da insulina sobre a utilização periférica da glicose pelos tecidos adiposo e muscular é prejudicado. A captação hepática mantém-se preservada, embora o débito de glicose pelo fígado possa ser suprimido (ADROGUE, 1992). Contudo, a partir do início da terapia dialítica, é observada uma melhora acentuada na sensibilidade à insulina, uma vez que diminui a concentração de toxinas na circulação (DEFRONZO *et al.,* 1978, SCHIMTZ, 1985).

Outros fatores também podem contribuir para a resistência insulínica em indivíduos com DRC, como por exemplo, diminuição da concentração de adiponectina e deficiência de eritropoietina (MANOLESCU *et al.*, 2008; GUO, PAN & JIN, 2009; KHEDR *et al.,* 2009).

SHURRAW *et al.,* (2011) demonstraram que maiores valores de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) associam-se com a progressão da doença renal em pacientes com diabete melito e DRC em estágios moderados e graves, mas sem tratamento dialítico.

O *US Renal Data System* (USRDS) demonstrou que pacientes com DRC em estágios iniciais apresentam HbA_{1c} elevada em comparação aos pacientes com DRC em estágios graves. A variação da HbA_{1c} pode estar associada à anemia, já que nesses pacientes há uma redução de 30% a 40% nos eritrócitos

(COLLINS *et al.,* 2014). Assim, os valores de HbA_{1c} tendem a estar diminuídos em pacientes com diabete que apresentam redução da função renal ou que são dependentes de diálise.

A dislipidemia da DRC é caracterizada por alterações quantitativas dos lípides plasmáticos e na distribuição destes nas diversas classes de lipoproteínas. Além disso, observa-se modificações químicas das lipoproteínas, o que condiciona alteração em seu metabolismo plasmático e tecidual. O perfil é semelhante ao da dislipidemia diabética e se vincula, em grande parte, ao estabelecimento de resistência à insulina. Caracteriza-se pela elevação da trigliceridemia, à custa da maior produção e menor metabolização de quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e seus remanescentes. Conforme comentado, a intensidade da hipertrigliceridemia é agravada pela perda urinária de proteínas, graças à maior produção hepática de apolipoproteína B-100, proteína constitutiva das VLDL secretadas pelo fígado. Salienta-se, ainda, a redução da atividade da lipoproteína lipase (LPL), enzima que hidrolisa os triglicérides de QM e VLDL (MASUDA, 2013; VAZIRI & MORADI, 2006). Isto se deve à resistência insulínica que também diminui a razão entre apolipoproteína CII (apo CII) e apolipoproteína CIII (apo CIII) que é um determinante da atividade da LPL.

Condicionada à elevação dos triglicérides plasmáticos, observa-se a formação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas, as quais são mais aterogênicas por terem maior acesso à intima arterial e serem mais suscetíveis à modificação oxidativa e captação por macrófagos. Isso ocorre

independentemente da variação do conteúdo de colesterol nesta lipoproteína, embora o aumento do LDL-colesterol possa ser observado em fases avançadas da DRC. Neste caso, há aumento na atividade da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMGCoA redutase), a qual promove maior síntese hepática de colesterol e geração subsequente de LDL. Assim, há importante elevação da colesterolemia, o que se associa com a redução na expressão do receptor de LDL (VAZIRI *et al.*, 1995; VAZIRI *et al*., 1996).

A lipoproteína (a) ou Lp(a) - fator de risco independente para a aterosclerose - apresenta-se elevada nesses pacientes e sua concentração correlaciona-se negativamente com a taxa de filtração glomerular. A Lp(a) associa-se com o aumento do risco cardiovascular, principalmente por induzir alterações hemostáticas, competindo com o receptor do plasminogênio em células endoteliais e induzindo quimiotaxia de monócitos na parede arterial e proliferação de células musculares lisas (LONGENCKER *et al*., 2005; RAO *et al*., 2010; MILES *et al.,* 1989, MALAGUARNERA *et al.,* 2013).

Redução na concentração de apolipoproteína A-I (apo A-I) e apolipoproteína A-II (apo A-II) também ocorre na DRC, o que se vincula à menor ação da LPL e à maior atividade da lipase hepática (LH) e promove deficiência e disfunção da lipoproteína de densidade alta (HDL).

A HDL executa um papel importante no metabolismo de lipoproteínas ricas em triglicérides (VLDL e QM), pois serve como doadora de apo E e apo C-II, que modulam positivamente a atividade da LPL e do receptor de VLDL (VAZIRI & LIANG,1997). No entanto, a menor concentração de HDL decorre da diminuição

da metabolização das lipoproteínas ricas em TG, embora a redução da taxa de síntese de apo A-I conforme descrito acima e o aumento na atividade da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) também contribuam para sua diminuição no plasma (VAZIRI, 2010).

A metabolização plasmática das HDL também se encontra prejudicada na DRC, em função da menor atividade da enzima que esterifica o colesterol, lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). LIANG, KIM & VAZIRI (2005) demonstraram que a redução da atividade da LCAT no plasma de ratos urêmicos está associada com a diminuição da transcrição gênica de *Lcat* no fígado destes animais.

Em contrapartida, a CETP que medeia à troca de colesterol esterificado (CE) das HDL para as lipoproteínas que contêm apo B em troca de TG, encontra-se elevada em pacientes renais crônicos a partir do estágio 3 (ATTMAN, SAMUELSSON & ALLAUPOVIC, 1993; SHOJI *et al.,*1997; DE SAIN-VAN DER VELDEN *et al.,* 1998). Isto favorece a redução do HDL-colesterol, enquanto eleva a concentração de colesterol em lipoproteínas nas VLDL e LDL (TALL, 2007).

Considerando-se o papel protetor das HDL contra o desenvolvimento da aterosclerose e a contribuição de LDL pequenas e densas e de remanescentes de lipoproteínas para o acúmulo de colesterol arterial, não surpreende que portadores de DRC sejam considerados, do ponto de vista terapêutico, como coronariopatas (KIMURA *et al.*, 2003; ATTMAN *et al.*, 1993).

1.3. Produtos de Glicação Avançada, Oxidação e Carbamilação na Doença Renal Crônica

Produtos de glicação avançada (AGE) associam-se independentemente com o desenvolvimento da doença macrovascular aterosclerótica (BUSCH *et al.*, 2010; NISHIZAWA, KOYAMA, INABA, 2012). Embora seja prevalente em situações de hiperglicemia, a formação dos AGE também ocorre na DRC e em estados inflamatórios crônicos, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, Alzheimer, aterosclerose, entre outras (ARSOV *et al*.,2013; TAM *et al*., 2013; KATO *et al*., 2008).

A reação de glicação não enzimática, cuja evolução favorece a formação irreversível dos AGE, caracteriza-se pela ligação covalente entre açúcares redutores e a porção amino- terminal dos ácidos nucleicos, certos fosfolípides e dos resíduos de lisina e arginina das proteínas. A base de Schiff resultante é um composto instável, a qual pode progredir para Produto Amadori (MONNIER & CERAMI, 1981; ARSOV *et al.,* 2013).

Rearranjos inter e intramoleculares da base de Schiff e do produto Amadori que envolvem reações de oxidação, ciclização, desidratação e condensação, assim como, a oxidação da glicose, ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos e reações inflamatórias levam à formação de oxoaldeídos reativos, como glioxal (GO), metilglioxal (MGO), 3- deoxiglicosona (3-DG) e glicolaldeído (GAD). Estes precursores de AGE são cerca de 300 vezes mais reativos do que a glicose e propagam a reação de glicação muito rapidamente, com a formação de

carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL), pentosidina, pirralina, hidroimidazolona, carboximetilarginina, entre outros (MIYATA *et al.,* 1998; JONO *et al.,* 2002; THORNALLEY, 2005). Macromoléculas modificadas por AGE apresentam alteração estrutural importante e irreversível que compromete sua função biológica (DYER *et al*., 1991; ARSOV *et al*., 2013).

Na DRC prevalece o estresse carbonila em consequência da menor depuração renal de intermediários da reação de glicação e por meio da diminuição do catabolismo de compostos carbonila como, 3- DG por deficiência de sistemas de destoxificação (MEERWALD *et al*.,2009). MGO, GO, 3- DG, encontram-se elevados na circulação de indivíduos urêmicos não diabéticos (HENLE *et al.*, 2003), acarretando a geração de AGE e produtos avançados de lipoxidação (ALE), independentemente da glicemia (KALOUSOVÁ *et al.*, 2005; MIYATA *et al.*, 1999).

A glicação de macromoléculas invariavelmente associa-se à modificação das mesmas por processos oxidativos, exacerbando o estresse oxidativo na DRC. Cria-se um ciclo no qual o estresse oxidativo favorece a glicação e vice-versa (KOYAMA & NISHIZAWA, 2010b).

Proteínas modificadas por AGE são descritas como moléculas mais resistentes à degradação enzimática e, constantemente, resultam na formação de produtos de glicação de baixo peso molecular, os quais são facilmente filtrados pela barreira glomerular e reabsorvidos pelas células tubulares (MIYATA *et al.*, 1996; WINNIE *et al.*, 2001).

O processo dialítico é ineficaz na remoção de precursores que propagam a formação dos AGE (MERA *et al.*, 2005). Além disso, geração dos AGE pode ser exacerbada na terapia de diálise peritoneal, em decorrência da composição e temperatura do dialisato (JIANG *et al.,* 2012; LINDNER *et al.,* 1974).

Diversas vias enzimáticas de destoxificação de compostos carbonila já foram descritas, entre elas, o sistema glioxalase (CRAWFORD *et al.*, 2011), a via da aldose redutase (SRIVASTAVA *et al.*, 2000; SRIVASTAVA *et al.*, 1999) e a via da aldeído desidrogenase (XIE *et al*., 2013), todas dependentes de coenzimas, como a glutationa peroxidase (GPx) e a nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) (NIWA & TSUKUSHI, 2001). No entanto, o prejuízo ou inibição da ativação dessas vias, como observado na DRC, acabam exacerbando a formação de AGE.

Acredita-se que na uremia possa ocorrer aumento significativo de oxoaldeídos reativos, devido a um desbalanço oxidativo, já que esta condição é marcada pela maior produção de ROS e por mecanismos antioxidantes pouco eficientes (MIYATA *et al.*, 2000; SCHWEDLER *et al.*, 2001; BAYNES & THORPE, 1999; MIYATA *et al.*, 2001; SHIRAI *et al.*, 2005). A peroxidação lipídica favorece a geração de malonildialdeído (MDA) e 4- hidroxinonenal (4-HNE), exacerbando a formação de GO e MGO (SELL & MONNIER, 1989). Os produtos gerados são mais especificamente, denominados de ALE (MIYATA *et al.*, 1998; CANESTRARI *et al*., 1994; VAZIRI, 2004).

A concentração sanguínea de MGO e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicativa de peroxidação lipídica é, respectivamente, 3,8

e 2 vezes maior em portadores de DRC em comparação a controles saudáveis (DYER *et al.,* 1993; MIYATA *et al*., 1998).

CML e pentosidina são os AGE mais comumente encontrados na DRC e em associação à área de lesão aterosclerótica, onde prejudicam o metabolismo de lípides e exacerbam a resposta inflamatória (KOYAMA, NISHIZAWA, 2010a,b). A grande heterogeneidade destes compostos torna difícil sua mensuração exata no compartimento plasmático e tecidual, sendo possível a existência de outros compostos não totalmente elucidados.

Os AGE interagem com receptores para produtos de glicação avançada (RAGE) os quais levam a vias de transdução de sinal que culminam na geração de espécies reativas de oxigênio. A consequente ativação do fator nuclear KB (NF-KB) promove a transcrição de genes inflamatórios e relacionados ao dano vascular, bem como a própria expressão do RAGE (KISLINGER *et al.*, 1999; SCHIMIDT. *et al.*, 1995; WAUTIER *et al.*, 1996; MUKHERJEE *et al.*, 2005). A cronicidade e a intensidade do estímulo podem favorecer diferentes vias de sinalização, envolvendo múltiplos efetores como p21ras, MAP cinases, PI3 cinase, cdc42/rac, Jak/STAT, NAD(P)H oxidase, entre outros (WAUTIER . *et al.*, 2001; LANDER *et al.,* 1997; TAGUCHI *et al*., 2000; ZHOU *et al*., 2012; HUANG *et al*., 2001).

Os AGE aumentam a expressão de CD-36 e SR-A, os quais favorecem a captação de lipoproteínas modificadas por macrófagos localizados na parede arterial e células mesangiais. Além disso, a ativação do RAGE converge para vias

de estresse oxidativo que contribuem para modificação de LDL e prejuízo no transporte reverso de colesterol (de SOUZA-PINTO *et al.*, 2012).

A expressão do RAGE é aumentada no diabete melito e na uremia (GRETEN *et al.*, 1996) e seu bloqueio a partir do anticorpo que neutraliza sua ação reduz a área de lesão aterosclerótica em camundongos dislipidêmicos (apo E *knockout*) e urêmicos por diminuir o estresse oxidativo (BRO *et al.*, 2008).

Formas truncadas do receptor, solúveis na circulação, apresentam o domínio extracelular do receptor nativo, embora sejam desprovidas da porção transmembrânica e citoplasmática. Em decorrência, apesar de se ligarem aos AGE, são incapazes de transduzir sinal e antagonizam a ação do RAGE nativo (YONEKURA *et al.*, 2003).

Na DRC, a forma solúvel do RAGE encontra-se reduzida, sendo considerado elemento preditivo para a doença cardiovascular nestes indivíduos (NISHIZAWA & KOYAMA, 2008). Por outro lado, KALOUSOVÁ *et al.,* (2007) demonstraram que as concentrações de RAGE solúvel estão aumentadas em pacientes submetidos à hemodiálise, relacionando tal fato com a diminuição da função renal. Deste modo, não fica claro o eventual papel protetor da forma solúvel do RAGE.

A via de sinalização do RAGE é contraposta pelo receptor AGER-1, cuja expressão encontra-se diminuída em modelos animais de diabete melito e em células linfomononucleares de diabete melito tipo1, correlacionando-se com a severidade da nefropatia (HE *et al.*, 2001). Ao contrário do RAGE, o AGER-1 promove a transcrição de genes antioxidantes (VLASSARA *et al*., 2009).

Outros receptores para AGE incluem os da família *scavenger*, como SR-A e SR-BI, CD-36, FEEL-1 e 2, LOX-1 e galectina. Tais receptores são expressos principalmente em macrófagos, células endoteliais e mesangiais. As vias de sinalização suscitadas por tais receptores de superfície, após interação com os AGE, não estão totalmente elucidadas.

A albumina glicada corresponde a 80 % de todas as proteínas circulantes modificadas por glicação (GARLICK & MAZER, 1983; IBERG & FLUCKIGER, 1986), sendo apontada como importante indicador do controle glicêmico em pacientes diabéticos submetidos à hemodiálise em relação à hemoglobina glicada (SELVIN *et al.,* 2011; HEGAB *et al*., 2012).

KUMEDA *et al.,* (2008) demonstraram que a concentração de albumina glicada apresenta correlação positiva com o enrijecimento da artéria de pacientes DM em hemodiálise, sugerindo que o valor de albumina glicada reflita as complicações vasculares destes pacientes.

Concentrações aumentadas de compostos carbonila são correlacionados com a oxidação da albumina em pacientes em hemodiálise. Diante disso, a albumina sérica é a principal proteína- alvo de estresse oxidativo na uremia (ANRAKU *et al.,* 2004), o que contribui para a progressão do estresse oxidativo (PAPANASTASIOU *et al.,* 1994; WITKO-SARSAT *et al.,*1998; MERA *et al.,* 2005).

Estudos epidemiológicos indicam uma relação inversa entre a concentração sérica de albumina em pacientes mantidos em hemodiálise e o risco de mortalidade (TOJO *et al.,*2003; GOLDWASSER & FIELDMAN, 1997; ISHIMITSU *et al.,* 2000; KOHARA *et al.,* 2004), já que a albumina é o principal

antioxidante no fluído extracelular. No entanto, sabe-se que modificações na albumina na DRC alteram sua função e estrutura (MERA *et al.,*2005; MATSUYAMA *et al.,* 2009).

Além da glicação e oxidação, a carbamilação é uma modificação química de macromoléculas prevalente na DRC. Pacientes com DRC principalmente no estágio final apresentam concentrações elevadas de ureia no plasma. Embora terapias substitutivas reduzam a uremia desses pacientes, ainda são mantidas concentrações elevadas de ureia na circulação (BERG *et al.,* 2013).

A concentração de albumina carbamilada é apontada como preditora de mortalidade em pacientes com DRC em estágio final (BERG *et al.,* 2013).

O cianato (forma quimicamente ativa do ácido isociânico) é derivado da deaminação da ureia e reage, irreversivelmente, com grupos amino das proteínas, alterando a polaridade dos grupos lisina e aumentando a mobilidade eletroforética das mesmas (WEISGRABER *et al.*,1978).

A carbamilação de proteínas mesangiais e de matriz extracelular piora a função renal (OK *et al.,* 2005) e prejudica o metabolismo celular (SATAKE *et al.,* 1990).

OK *et al.,* (2005) demonstraram efeitos citotóxicos de LDL carbamiladas em células endoteliais da artéria coronariana, com maior porcentagem de proliferação de células musculares e apoptose. De modo análogo às demais modificações de lipoproteínas, a carbamilação, embora pouco estudada, contribui para a aterogênese na DRC.

APOSTOLOV *et al.,* (2010) evidenciaram, em animais *knockout* para apo E urêmicos, alimentados com dieta rica em gordura, elevação em cerca de três vezes na concentração plasmática de LDL oxidada e carbamilada. Além disso, houve maior desenvolvimento de lesão aterosclerótica, com acúmulo de LDL carbamilada na parede aórtica e colocalização desta com moléculas de adesão em infiltrados macrofágicos. Nesse mesmo modelo animal, quando submetido à nefrectomia e à administração de ureia na água observou-se aumento de duas vezes no desenvolvimento de aterosclerose (BERG *et al.,* 2013).

A modificação de lipoproteínas por glicação, carbamilação e oxidação, principalmente na partícula de LDL, tem sido reconhecida como evento chave no processo de aterosclerose (DRÜEKE *et al.*, 2001; MATHUR *et al.*, 2002). A modificação estrutural da apo B por estas reações químicas confere à LDL meia-vida mais longa, já que esta deixa de ser reconhecida e captada pelo receptor B/E (KRAUS & KRAUS, 2001). Desta forma, a partícula torna-se mais susceptível à captação por macrófagos arteriais, por meio dos receptores *scavenger*. De modo análogo, prolonga-se a meia-vida das VLDL e QM, os quais são metabolizados mais lentamente pela lipoproteína lipase e menos reconhecidos por receptores celulares, o que favorece a geração de remanescentes aterogênicos (LIU & ROSNER, 2006; MARTHUR *et al.*, 2002; MOESTRUP & NIELSEN, 2005; WANNER & KRANE, 2002).

1.4. Transporte reverso de colesterol na Doença Renal Crônica

O transporte reverso de colesterol (TRC) é o sistema pelo qual o excesso de colesterol celular é retirado das células periféricas, incluindo macrófagos arteriais, e transportado ao fígado sendo eliminado na bile e excretado nas fezes, ou aos tecidos esteroidogênicos para a síntese hormonal. Por garantir um fluxo contínuo de colesterol da parede arterial ao fígado, o TRC é considerado um processo antiaterogênico e alterações em qualquer uma de suas etapas podem predispor à aterosclerose (BELLOSTA *et al.*, 1995; QUINTÃO *et al*., 2000).

A primeira etapa do transporte reverso de colesterol consiste no efluxo de colesterol celular, caracterizado pela retirada do excesso de colesterol celular pelas apo A-I e pré-beta HDL ou HDL maduras (HDL_2 ou HDL_3), as quais interagem, respectivamente com os receptores ABCA-1 e ABCG-1 (**Figura 1**).

Após se enriquecerem em lípides por sua interação com o ABCA-1, as apo A-I formam partículas nascentes e discoidais de HDL, denominadas pré-beta HDL. Esta é convertida em HDL esférica, como as HDL_3 e HDL_2 que abriga o colesterol esterificado em seu núcleo hidrofóbico pela ação da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). A HDL madura resultante também pode remover colesterol celular por meio da interação com o receptor ABCG-1 (FORTE *et al.,* 1995; WRÓBLEWSKA, 2011) (**Figura 1**).

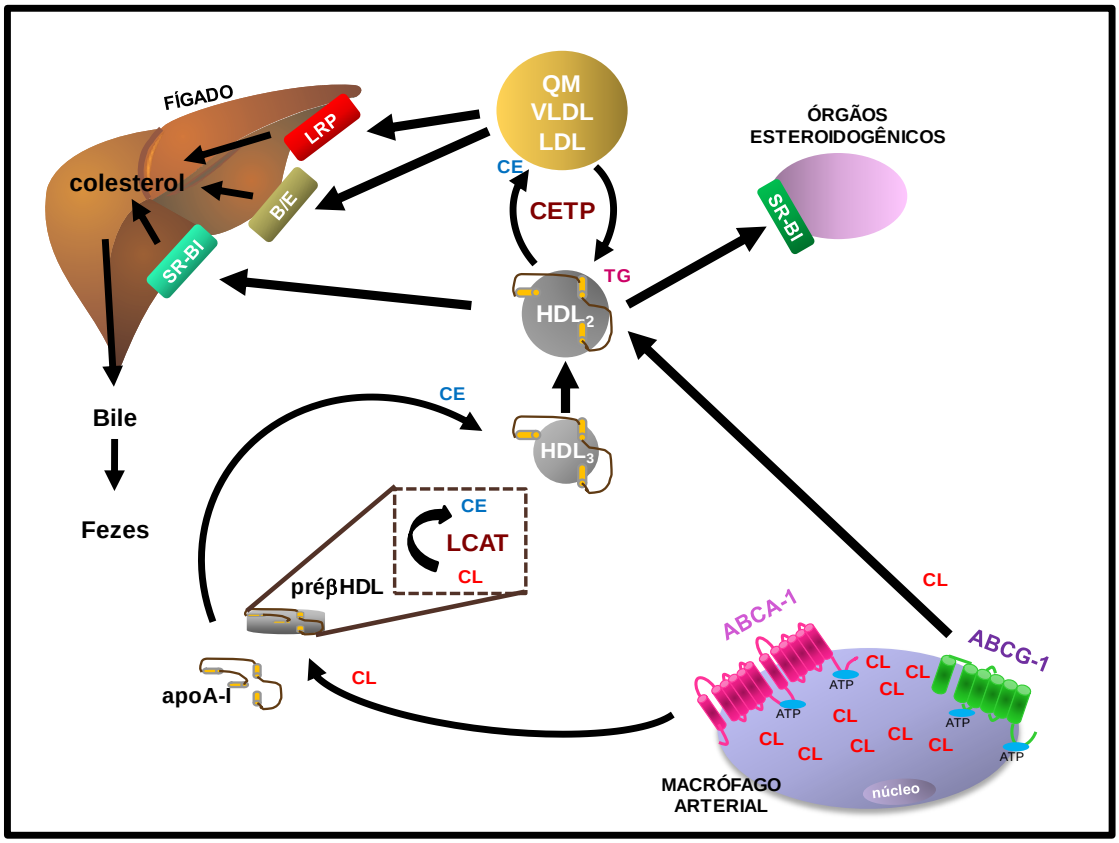


Figura 1. Transporte reverso de colesterol. *Apo A-I e partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) removem o excesso de colesterol celular por meio da interação com o receptor ABCA-1. Após a esterificação do colesterol pela LCAT (presente nas pré-betas HDL), formam-se partículas maiores de HDL, primeiramente* HDL_3 *e, em seguida,* HDL_2*. Estas últimas, por interação com o ABCG-1 removem colesterol e óxidos de colesterol das células. O colesterol esterificado (CE) contido nas HDL pode ser diretamente removido pelo receptor SR-BI no fígado ou órgãos esteroidogênicos, podendo ser convertido em ácidos biliares ou hormônios esteroídicos. Por intermédio da CETP, o CE é transfetrido para QM, VLDL e LDL, as quais podem ser removidas pelos receptores B-E ou LRP no fígado.*

O transportador ABCA-1 pertence à subclasse dos transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*), proteínas que utilizam a energia liberada pela hidrólise do ATP para mediarem o transporte de diferentes substâncias. O ABCA-1 é uma proteína de 2.261 aminoácidos e, aproximadamente, 220 kDa. Consiste em

uma cadeia polipeptídica longa organizada em duas metades homólogas. Cada um dos dois domínios transmembrânicos possui 6 hélices e um sítio de ligação a nucleotídeos (NBD), contendo duas sequências peptídicas altamente conservadas evolutivamente projetadas para a porção citoplasmática. As alças extracelulares do transportador são ligadas por uma ou mais pontes dissulfeto (SAMUNI *et al.,* 2013), as quais estabilizam sua estrutura e regulam sua funcionalidade (BUNGERT, MOLDAY & MOLDAY, 2001) (Figura 2. A).

O transportador ABCG-1 possui 674 aminoácidos e, aproximadamente, 60 kDa, sendo composto por apenas um segmento com 6 hélices transmembrânicas e um sítio NBD, contendo três domínios conservados evolutivamente na sua porção intracelular. O receptor ABCG-1 apresenta um sítio de ligação ao ATP e sua atividade depende de homodimerização na membrana plasmática. É altamente expresso em macrófagos enriquecidos em colesterol, bem como em células do cérebro, timo, adrenais e baço de camundongos e humanos (TARLING, 2013) (Figura 2. B).

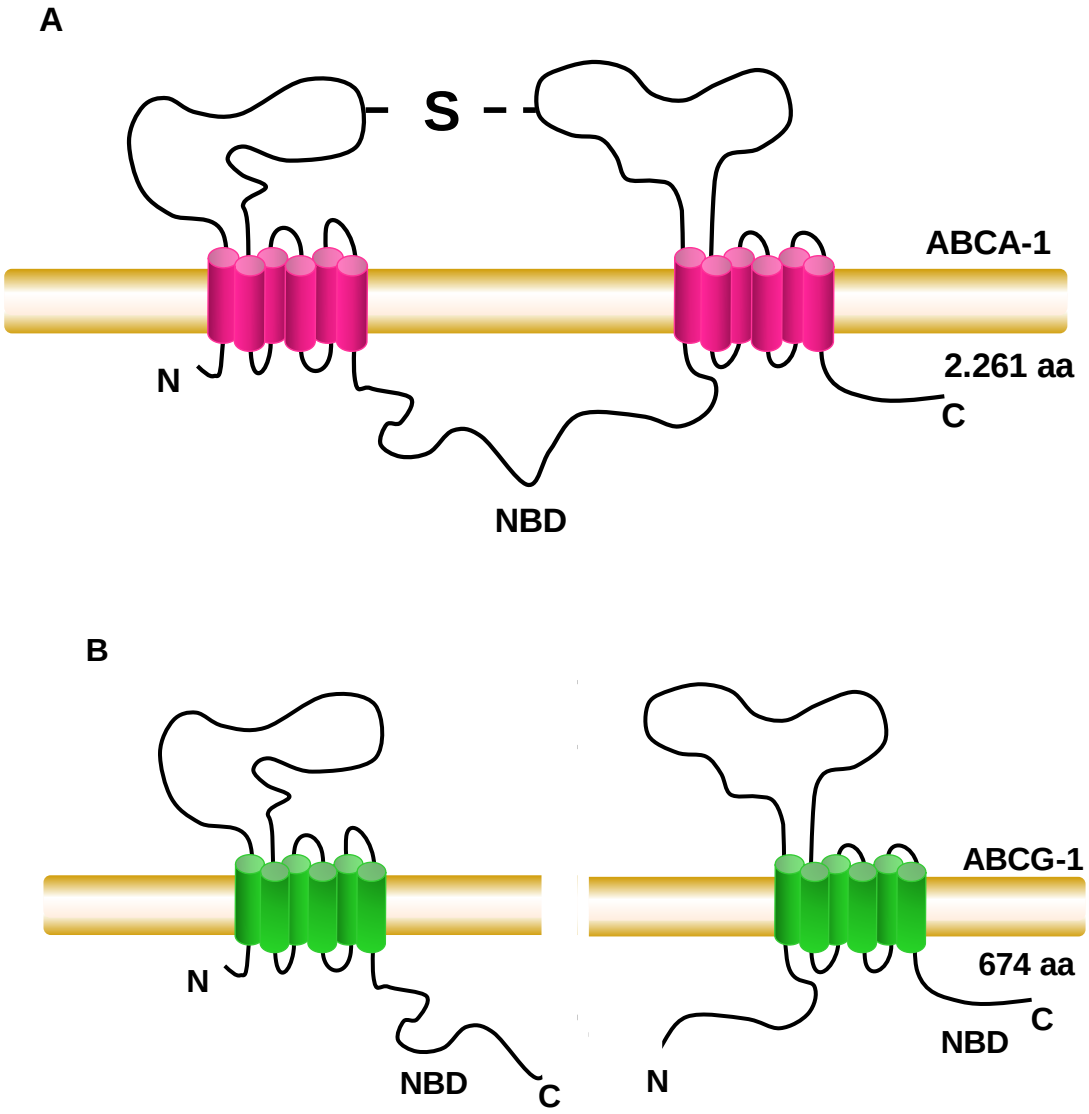


Figura 2. Modelo topológico dos transportadores ABCA-1 (A) e ABCG-1 (B). *O receptor ABCA-1 é uma proteína de 2.261 aminoácidos organizada em dois domínios transmembrânicos homólogos que contêm, cada um, 6 hélices e um sítio de ligação a ATP (nucleotide binding domain, NBD). As alças extracelulares são ligadas por uma ou mais pontes dissulfeto. O receptor ABCG-1 é uma proteína de 674 aminoácidos caracterizada por apenas um segmento com seis hélices transmembrânicas e um sítio de ligação a ATP (NBD). A atividade desse receptor depende de sua homodimerização (*baseado em ORAM & VAUGHAN, 2006).

Tanto o receptor ABCA-1 quanto o ABCG-1 são regulados pelo influxo celular de colesterol advindo das LDL, o qual gera óxidos de colesterol, que são ligantes naturais do receptor nuclear hepático X (LXR).

Numa primeira etapa, o aumento da concentração intracelular de colesterol favorece a ligação de óxidos de colesterol ao LXR, o que promove sua dissociação do ABCA-1 o qual passa a mediar o efluxo de colesterol para apo A-I ou pré-beta HDL (HOZOJI-INADA *et al.*, 2011). O inverso ocorre quando o conteúdo celular de colesterol é reduzido; neste caso, a subunidade beta do LXR dimeriza-se com o receptor RXR, formando um complexo que se liga aos receptores ABCA-1 e ABCG-1 o que impede a hidrólise de moléculas de ATP nestes receptores e, consequentemente, sua atividade. Deste modo, não há interação com as partículas aceptoras de colesterol e não ocorre o efluxo de colesterol celular (INADA-HOZOJI *et al.,* 2011). Este constitui um mecanismo rápido de modulação da atividade do ABCA-1 e, portanto, de ajuste de colesterol intracelular.

A ativação de LXR também induz a transativação dos genes *ABCA1* e *ABCG1*. Isto ocorre pela ligação do heterodímero LXR/RXR ao elemento responsivo (DR-4) na região promotora proximal do gene *ABCA1* (ZHU *et al*., 2012; COSTET *et al.,* 2000). Além disso, AMP cíclico também eleva a expressão de ABCA-1, por mecanismos distintos da via do LXR, mas ainda não caracterizados (ORAM & VAUGHAN, 2006).

O conteúdo proteico final de ABCA-1 é, entretanto, finamente regulado por mecanismos pós-traducionais, principalmente relacionados à ação de compartimentos que determinam a meia-vida do receptor, como sistema ubiquitina-proteasoma, autofagia lisossomal, via de complexos endossomais de distribuição requeridos para transporte e ação de calpaínas de superfície celular (ARAKAWA *et al.,* 2002; OGURA *et al.,* 2011; MIZUNO *et al.,* 2011; WANG *et al.,* 2003; MARTINEZ *et al.,* 2003). Ácidos graxos poli-insaturados induzem a degradação de ABCA-1 por promoverem a fosforilação, dependente de fosfolipase D, da sequência PEST do receptor e, portanto, a ação específica de calpaínas (WANG *et al.,* 2005; ORAM, 2006).

Mutações no ABCA-1 com consequente diminuição na concentração de HDL no plasma descritas na Doença de Tangier e na Deficiência Familiar de HDL associam-se a aterosclerose prematura (WANG *et al.*, 2013; FASANO *et al*., 2012).

Por intermédio da CETP, parte do colesterol esterificado (CE) das HDL é transferida para as lipoproteínas que contêm apo-B (VLDL, IDL, LDL), as quais são removidas pelos receptores de LDL (B/E) e proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP) no fígado. O CE da HDL também pode ser diretamente removido pelo fígado, por meio dos receptores SR-BI, sendo convertido a ácidos biliares ou eliminado na forma livre na bile (BALDAN *et al*., 2006)

Além da principal via de retirada de colesterol celular pelos receptores ABC, o colesterol também pode ser removido por difusão, graças à interação dos lípides

da HDL com a membrana celular. Este é um processo lento que pode ser facilitado pelo receptor SR-BI. Além do seu papel no fígado, o SR-BI em células periféricas, inclusive em macrófagos da parede arterial, estimula a saída de colesterol livre (CL) para partículas de HDL (OHASHI *et al.*, 2005).

Alterações no TRC são descritas em modelos experimentais de uremia e na DRC em humanos (VAZIRI, 2010; GLODNY *et al.*, 2010). Grande parte resulta do aumento na concentração de triglicérides e colesterol séricos o que, por exemplo, favorece a atividade da CETP e o enriquecimento de lipoproteínas potencialmente aterogênicas em colesterol esterificado, como as LDL. Terapias medicamentosas e o processo de diálise, por sua vez, também implicam na modificação da expressão e atividade de enzimas e proteínas envolvidas no trânsito de colesterol ao fígado e na modificação glicoxidativa de lipoproteínas e albumina (ATTMAN *et al.,* 2003; DEIGHAN *et al.,* 2000; MORADI *et al.,* 2009a; STENVINKEL & ALVESTRAND, 2002).

Além disso, o fluxo de colesterol ao longo do TRC encontra-se alterado face à modificação química de lipoproteínas por glicação ou oxidação. PASSARELLI *et al.,* (1997) observaram redução na atividade da LCAT e aumento na atividade da CETP frente à modificação, *in vivo* e *in vitro*, de HDL, LDL e VLDL por glicação. A maior atividade da CETP enriquece as LDL glicadas em colesterol, as quais são mais facilmente captadas por macrófagos arteriais.

Recentemente, demonstramos em nosso laboratório que a albumina modificada por glicação avançada, isolada do soro de portadores de diabete melito

com controle glicêmico inadequado, reduz o efluxo de colesterol de macrófagos mediado por apo A-I e subfrações de HDL. Este evento decorre do menor conteúdo dos receptores ABCA-1 e ABCG-1, embora nenhuma alteração tenha sido evidenciada no mRNA de ABCA-1. A análise da expressão diferencial de genes em macrófagos tratados com estas albuminas demonstrou aumento da expressão de genes relacionados à resposta oxidante e à expressão da estearoil CoA dessaturase, enzima que promove a insaturação de ácidos graxos, e que se relaciona à instabilidade do ABCA-1. Além disso, em macrófagos tratados com albumina isolada de indivíduos portadores de DM 2 observou-se redução na expressão gênica da janus cinase 2, a qual estabiliza a ligação do ABCA-1 com a apo A-I, favorecendo o efluxo de colesterol (MACHADO-LIMA *et al.,* 2013).

O prejuízo no fluxo de lípides, induzido por albumina AGE, foi associado à maior expressão de marcadores do estresse do retículo endoplasmático, como chaperonas (Grp 78 e Grp94) e componentes da via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), como eIF2α e ATF-6. Interessante que o bloqueio do estresse do retículo endoplasmático, pelo uso de chaperona química (ácido fenilbutírico - PBA), foi capaz de prevenir alterações no efluxo de colesterol celular, por normalizar a expressão de ABCA-1 em macrófagos tratados com albumina-AGE (CASTILHO *et al.*, 2012).

Em virtude de sua maior captação de colesterol por macrófagos, a albumina-AGE eleva a geração de espécies reativas de oxigênio, com aumento da expressão dos receptores CD-36 e RAGE (PINTO *et al.*, 2007). Deste modo, tais

dados evidenciam que a albumina modificada favorece maior influxo de colesterol aos macrófagos, em detrimento de sua remoção pelas HDL.

ZHOU *et al.,* (2008), demonstraram que o soro de pacientes portadores de diabete melito com micro e macroalbuminúria apresenta menor capacidade de remoção de colesterol de células hepáticas. Em contrapartida, VOGT *et al*.,(2006), demonstraram que o plasma de indivíduos com DRC apresentaram maior remoção de colesterol de fibroblastos. Neste sentido, não fica claro quais componentes do soro ou do plasma poderiam contribuir para alterar o efluxo de colesterol celular.

Redução no efluxo de colesterol, mediado por apo A-I e HDL_2, foi observada em macrófagos tratados com albumina isolada de animais urêmicos, em comparação aos controles falso-operados (MACHADO *et al*., 2012). A albumina urêmica apresentou, por si, maior capacidade de remoção de colesterol (MACHADO *et al.,* 2010), embora sua contribuição ao TRC pareça ser limitada, frente à pequena esterificação do colesterol na partícula de albumina pela LCAT. Além disso, a albumina isolada de animais urêmicos promoveu maior captação de LDL colesterol pelos macrófagos, o que pode agravar o acúmulo intracelular de lípides (CARREIRO *et al.,* 2010).

Aumento na atividade da enzima acilcolesterol aciltransferase 1 (ACAT-1) foi observada em animais urêmicos, reduzindo o efluxo de colesterol celular e promovendo a formação de células espumosas, por catalisar a esterificação do colesterol livre intracelular e sequestrar os ésteres de colesterol dentro das

vesículas citoplasmáticas (VAZIRI & LIANG, 2004; ROSEBURY *et al.,* 2000; VAZIRI & MORADI, 2006). Conjuntamente com o aumento da expressão de receptores *scavenger*, a atividade da ACAT favorece o acúmulo de colesterol no tecido renal. A administração do inibidor da ACAT reduziu a proteinúria, melhorando a função renal em modelo animal de DRC (BOCAN *et al*, 2000).

Em modelo experimental de uremia, induzida por nefrectomia 5/6, a atividade da LCAT encontra-se reduzida (VAZIRI. *et al.*, 2004; VAZIRI*,* 2009). A deficiência dessa enzima pode diminuir meia-vida da HDL, por comprometer a maturação destas lipoproteínas, favorecendo o acúmulo de partículas mais instáveis como as pré-beta HDL.

Outros estudos mostram que em pacientes com proteinúria, a produção hepática e a concentração plasmática de CETP estão significantemente elevadas, porém existem controvérsias na literatura (DE SAIN-VAN DER VELDEN *et al.,* 1998; VAZIRI, 2004).

1.5. Estresse do retículo endoplasmático

Estresse oxidativo, AGE, acúmulo intracelular de colesterol e peroxinitritos - situações prevalentes na DRC - favorecem o estabelecimento do estresse do retículo endoplasmático (RE). Esta condição é caracterizada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen da organela o que desencadeia uma

resposta adaptativa que garante o enovelamento proteico adequado evitando a sobrecarga da organela e a secreção de proteínas com função inadequada. As chaperonas, Grp 78/BiP(*glucose-regulated protein*-78), Grp 94 (*glucose-regulated protein*-94) e proteína dissulfeto isomerase (PDI; *protein disulfide isomerase*) são proteínas presentes no lúmen do RE e responsáveis por auxiliar a formação da estrutura terciária das proteínas e aumentar a capacidade de enovelamento proteico (DICKHOUT & KREPINSKY, 2009).

A dissociação de chaperonas, como a Grp78 de proteínas da membrana do RE desencadeia a resposta a proteínas mal enoveladas (UPR; *unfolding protein response*) (CHIANG *et al.,* 2011). A UPR é caracterizada pela ativação da PERK (*PK RNA-like ER kinase*), ATF 6 (*activating transcription factor 6*) e IRE1 (*inositol-requiring enzyme - 1*) (HARDING *et al*., 2005; YOSHIDA *et al*., 2001; YOSHIDA *et al*., 1998). A consequente cascata de sinalização leva à diminuição da síntese global das proteínas e degradação de proteínas mal enoveladas.

A ativação da PERK fosforila o resíduo de serina 51 (Ser51) da subunidade α do fator eucariótico de iniciação traducional (eIF2), o qual atenua rapidamente a tradução total de proteínas, diminuindo o influxo de novos polipeptídeos ao lúmen do RE (CAO & KAUFMAN, 2012; DICKHOUT & KREPINSKY, 2009). A eIF2α fosforilada traduz subconjuntos de genes que incluem o ATF4 (*activating transcription factor 4*) (HARDING *et al*., 2000) que direciona a transcrição de genes específicos na via da UPR, como proteínas homólogas de C/EBP (MA *et al*., 2001), ligante do NF-KB (AMERI & HARRIS,

2008) e genes importantes no metabolismo de aminoácidos (HARDING *et al*., 2003).

A CHOP (*C/EBP homologus protein*), por exemplo, está relacionada aos homólogos de C/EBP e é considerada um indutor de apoptose (OYADOMARI & MORI., 2004; ZINSZNER *et al.,* 1998). Ela diminui a expressão de Bcl-2, o que leva à maior sensibilização das células e ao aumento do prejuízo oxidativo, além de ativar caspases mediadoras da morte celular (MCCULOUGH *et al*., 2001; MORSE *et al*., 2010).

Na vigência de estresse de RE, o ATF6 - que é dependente da ativação da proteína homóloga C/EBP- é ativado e transportado ao complexo de Golgi, onde é clivado por duas proteases (S1P e S2P). Forma-se um domínio citoplasmático (bZIP) que é direcionado ao núcleo, induzindo a transcrição de genes-alvo da UPR, como chaperonas Grp78 e Grp 94 (YOSHIDA *et al*.,1998) mas também a CHOP (TSUKANO *et al.,* 2010).

Por fim, a IRE1 quando ativada, exerce sua atividade de endonuclease, ou seja, cliva pequenas porções intrônicas do mRNA do XBP-1 (*X-box DNA-binding protein*). A remoção destes nucleotídeos induz a transcrição de genes-alvo da UPR. Além disso, a XBP-1 está envolvida na manutenção do RE e na degradação associada ao RE (ERAD; *ER-associated degradation*) (COX, SHAMU & WALTER,1993; ACOSTA-ALVEAR *et al*., 2007; LEE, IWAKOSHI & GLIMCHER., 2003).

A PDI é uma proteína multifuncional da superfamília tiorredoxina. Ela apresenta atividade redox- isomerase dependente de tiol favorecendo a formação de pontes dissulfeto nas proteínas, o que exerce papel determinante na manutenção da conformação das proteínas recém-formadas (LAURINDO *et al*., 2012). Por possuir sítios com afinidade por cadeias polipeptídicas mal-enoveladas, a PDI promove a translocação de peptídeos, do lúmen do RE ao citosol, favorecendo sua ubiquitinação e degradação proteasomal por meio da ERAD (Appenzeller-Herzog & Ellgaard, 2008).

A captação de LDL oxidada pelo receptor *scavanger* CD36 nos macrófagos arteriais desencadeia estresse de RE, o que, por sua vez, contribui para a maior expressão do CD36. Deste modo, o estresse de RE, pode contribuir para a progressão da aterosclerose por aumentar a formação de células espumosas e a vulnerabilidade da placa (YAO *et al.,* 2014).

ROHRL *et al.,* (2014) relatam que não há mudança na concentração de colesterol celular durante o estresse de RE em células hepáticas, devido ao prejuízo da síntese “de novo” de colesterol, pela redução da atividade da HMGCoA redutase, embora a atividade da SRBP-2 tenha sido induzida. Além disso, há redução do efluxo de colesterol celular mediado por ABCA-1. Contudo, o estresse de RE nos hepatócitos, influencia negativamente a biogênese da HDL e o desenvolvimento da dislipidemia, assim esses processos parecem estar vinculados ao prejuízo da doença cardiovascular na DRC.

Antioxidantes, como a N-acetilcisteína, piridoxamina, probucol, entre outros, são investigados na prevenção do insulto oxidativo, estresse de RE e restauro das funções celulares na DRC e outras condições em que prevalece o estresse glico-oxidativo (MULLER *et al*., 2013; MALHOTRA *et al.,* 2008).

1.6. N-acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é derivada da cisteína, apresentando um grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio e, como muitos tióis, pode ser oxidada por uma variedade de radicais. Isto confere seu uso como potente antioxidante, além de ser clinicamente empregada como agente mucolítico e para o tratamento de muitas condições como: intoxicação por acetominofeno, cardiotoxicidades específicas, angina pectoris, injúria cardíaca por isquemia-reperfusão, síndrome respiratória aguda, toxicidade por quimioterápicos, nefropatia por contraste e algumas desordens psiquiátricas (SAMUNI *et al*., 2013, HOSSEINJANI, MOGHADDAS & KHALILI, 2013; MAZZON *et al*., 2001, EFRATI *et al*., 2005, WANG *et al.*, 2011, OCAK *et al.,* 2007, BERNIAKOVICH *et al.,* 2012).

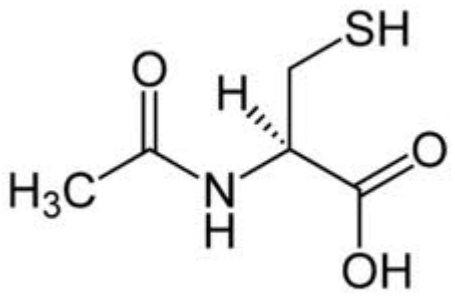


Figura 3. Fórmula estrutural da N-acetilcisteína

Na circulação, a NAC reage com resíduos de cisteína e cistina produzindo NAC-cisteína, NAC-NAC e cisteína. Atravessa a membrana celular e propicia a síntese e a manutenção da concentração intracelular de glutationa, uma das principais enzimas antioxidantes intracelulares (POWELL & MCCAY, 1988). Além disso, a NAC liga-se a metais de transição e sequestra radicais livres, atuando como quelante de metais tóxicos por meio da formação de estruturas que são rapidamente eliminadas do organismo. A NAC reduz ligações dissulfeto o que confere sua habilidade como mucolítico pela dissolução de pontes dissulfeto de proteínas mucosas. Outras ações decorrentes da modificação de proteínas pela NAC incluem a diminuição da ligação de angiotensina II ao seu receptor, inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina, redução da afinidade do TNF-α pelo seu receptor e modificação do estado redox de proteínas funcionais de membrana com grupamento -SH crítico para sua atividade (SAMUNI *et al*., 2013).

O tratamento com NAC atenua a maior parte dos danos causados pelas ROS, graças à rápida reação com ânion superóxido e à estabilização do NO (BERNIAKOVICH *et al*., 2012; BOESGAARD *et al*., 1993).

Em camundongos knockout para apo E, o tratamento com NAC reduz o estresse oxidativo e o acúmulo de macrófagos na parede da aorta (SHIMADA *et al.*, 2009). A administração de NAC também melhora a função endotelial, a inflamação e a fibrose (ZAFARULLAH *et al.*, 2003) e, em indivíduos com DRC submetidos à hemodiálise confere proteção cardiovascular (TEPEL, 2003; HOLT *et al.,* 1999). A diminuição da expressão de nitrotirosina, marcador de geração de peroxinitrito, na aorta de camundongos dislipidêmicos (knockout para apo E) e urêmicos, é observada com o tratamento da NAC, favorecendo a redução na progressão da lesão ateromatosa (IVANOVSKI *et al.*, 2005).

A citotoxicidade e consequente morte celular promovida por proteínas modificadas por AGE foram atenuadas na presença de NAC (LOSKE *et al.,* 1998). Em camundongos knockout para apo E (LU *et al.,* 2011) foi mostrado que o tratamento com NAC estabilizou as placas ateroscleróticas, por seu efeito inibitório sobre a expressão de RAGE na àrea da lesão vascular associada à supressão de metaloproteinase de matriz e NF-κB. Apesar da redução na infiltração de macrófagos e o aumento no conteúdo de colágeno no sítio da lesão não houve, redução no tamanho da placa aterosclerótica. A NAC inibe a ativação de NF-κB por impedir a degradação proteasomal de IKB (inibidor da translocação nuclear de

NF-κB) e a consequente produção de citocinas induzida por este fator transcricional (LI *et al.,* 2006).

O tratamento precoce ou tardio com NAC, em ratos com DRC induzida por nefrectomia, reduz a progressão da doença, por diminuir a formação de peróxidos lipídicos (TBARS) na urina, reduz a proteinúria, aldosterona plasmática e pressão arterial. Além disso, melhora o *clearance* de inulina e inflamação renal. Menor infiltrado de macrófagos e linfócitos T também foi observado no córtex renal em ratos urêmicos tratados com NAC, o que caracteriza proteção à filtração glomerular e consequentemente diminuição da perda da função renal em ratos com DRC (SHIMIZU *et al.*, 2005).

Diversos estudos já demonstraram o papel benéfico da NAC sobre a injúria renal em ratos (SHIMIZU *et al.,* 2008; DANILOVIC *et al.,* 2013; CAMPOS *et al.,* 2012; PEREIRA *et al*., 2012; SHIMIZU *et al*., 2013; PANCHE DE FARIAS GUIMARÃES *et al.,* 2014). Em todos esses estudos, a NAC foi capaz de atenuar o estresse oxidativo, levando à melhora da taxa de filtração glomerular, do fluxo sanguíneo renal e diminuição da peroxidação lipídica evidenciada por TBARS (SHIMIZU *et al.,* 2008; PEREIRA *et al.,* 2012). A NAC também minimizou as alterações renais decorrentes da senescência de ratos graças à diminuição da inflamação renal (SHIMIZU *et al.,* 2013).

A NAC também foi eficaz quando células endoteliais foram expostas ao soro de pacientes urêmicos, diminuindo a resistência insulínica, por aumentar a síntese e a atividade de óxido nítrico e por reduzir o estresse de retículo

endoplasmático, causado pela exposição de toxinas urêmicas presentes no soro dos pacientes com DRC (ZHOU *et al*., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Alterações no metabolismo de lípides e, em particular, no transporte reverso de colesterol são associadas com a maior incidência de doença cardiovascular em indivíduos portadores de doença renal crônica. Além disso, o estresse oxidativo e a formação de AGE contribuem como fatores de risco não clássicos que exacerbam o risco cardiovascular nesta condição. A HDL isolada de animais urêmicos, sem influência de medicamentos ou terapia dialítica, mantém sua habilidade de remover colesterol celular (MACHADO *et al.,* 2010). Não obstante, a albumina sérica, isolada destes animais, reduz o efluxo de colesterol de macrófagos, mediado por apoA-I e subfrações de HDL (MACHADO *et al.,* 2012). Com isso, as alterações no transporte reverso de colesterol, que são atribuídas a diversos componentes do soro na DRC, parecem refletir o impacto da albumina do animal com DRC sobre o fluxo de lípides em macrófagos e, não propriamente, o da partícula de HDL. Até o momento, não se sabe como a albumina isolada da DRC diminui a remoção de colesterol de macrófagos, contribuindo para o acúmulo de lípides nestas células, evento chave para o desenvolvimento da aterosclerose. Nossa hipótese é de que a N-acetilcisteína possa prevenir os efeitos deletérios da albumina isolada de animais com DRC sobre efluxo de colesterol em macrófagos, graças à redução do estresse glicoxidativo e de retículo endoplasmático. Os achados serão importantes para pormenorizar o papel da modificação de albumina *in vivo* na DRC e seu impacto sobre o transporte reverso de colesterol e o risco de aterosclerose.

3. OBJETIVO

Avaliar, em ratos com doença renal crônica, o efeito da N-acetilcisteína (NAC) sobre a concentração plasmática de produtos de oxidação e glicação avançada e o reflexo sobre a influência da albumina no transporte reverso de colesterol de macrófagos.

Para isso, foram determinados em macrófagos tratados com albumina isolada de animais controles e com DRC tratados ou não com NAC:

1. o efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos mediado por apo A-I e subfrações de HDL controles;

2. o conteúdo dos receptores ABCA-1 e ABCG-1;

3. o conteúdo de proteínas marcadoras de estresse de RE (chaperonas Grp78 e Grp94 e PDI)

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.1. Animais

Ratos Wistar com 2 meses de idade, pesando aproximadamente 200-250 g foram obtidos no Departamento Técnico de Apoio ao Ensino e Pesquisa (DTAEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os protocolos experimentais com a utilização dos animais estavam de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq 0857/07) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos controle (C), e com doença renal crônica induzida (DRC) tratados ou não com NAC. Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério setorial da Clínica Médica, com ciclo de 12 h claro/12 h escuro, a 22 ± 2 °C, recebendo água ou o tratamento (NAC diluído em água) e ração padronizada *ad libitum.*

4.2. Modelo Experimental

4.2.1. Nefrectomia 5/6

Cloridrato de tramadol foi injetado subcutaneamente (12,5 mg/Kg) 1 h antes da anestesia como procedimento de analgesia preventiva (MOUEDDEN & MEERT, 2007).

Para indução da insuficiência renal crônica os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketalar ®) (60 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (Rompun ®) (10 mg/kg de peso corporal). O acesso cirúrgico foi realizado por meio de laparotomia crânio-caudal na linha média da cavidade abdominal para isolamento do pedículo renal esquerdo com subsequente ligadura de 2 ramificações da artéria renal esquerda para obtenção de isquemia em 2/3 do parênquima renal ipsilateral. Em seguida, realizou-se ligadura nos vasos do rim contralateral acompanhada de nefrectomia total. Ao final do procedimento, a musculatura abdominal e a pele foram suturadas e os animais mantidos em ambiente moderadamente aquecido durante o período pós-operatório imediato. Injeção subcutânea de cloridrato de tramadol foi mantida a cada 8 h durante 48 h, após o procedimento cirúrgico, como protocolo de analgesia. Nos dias subsequentes, administrou-se cloridrato de tramadol (12,5 mg/Kg) no bebedouro até completar uma semana de período cirúrgico. Como antibioticoterapia preventiva pós-operatória, foi administrado subcutaneamente enrofloxacino (Chemitril ® injetável 10 %) (1 mL/40 Kg de peso corporal) uma vez ao dia, durante 3 dias.

Os grupos controle (C) e controle tratado com NAC (C+NAC) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos com exceção da ligadura dos ramos arteriais do rim esquerdo e da nefrectomia do rim direito, tomando-se cuidado para não causar lesão nos tecidos renais.

4.3. Protocolo do Tratamento

Após uma semana da realização da cirurgia, os animais C e com DRC foram divididos nos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC. O tratamento com N-acetilcisteína (EMS S/A., São Bernardo do Campo/SP, Brasil)(1 envelope = 200 mg/5 g de excipiente) foi administrado na água dos bebedouros na concentração de 600 mg/L. A solução foi protegida da luz por meio de bebedouros âmbares e refeita a cada dois dias para não ocorrer alterações organolépticas. A administração oral de NAC é segura e apresenta efeitos semelhantes aos da administração endovenosa (SHALANSKY *et al.,* 2005). Os animais receberam este tratamento durante 7 semanas, completando os 60 dias pós-cirurgia (SHIMIZU *et al.,*2005).

4.4. Dosagens Bioquímicas

As medidas de colesterol total (CT), triglicérides (TG), glicose, ureia e creatinina no plasma foram realizadas por método enzimático colorimétrico (Roche do Brasil e Labtest do Brasil). A leitura foi realizada no Thermo/Milton Roy Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer, (Thermo Electron Corporation, Verona, EUA). Para a excreção urinária de 24 h, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, com água ou tratamento (NAC) e ração *ad libitum.* Após 24 h a urina de cada animal foi coletada e centrifugada a 1500 rpm por 5 min a 4ºC para dosagem de proteína (*kit* Sensiprot - Labtest do Brasil).

4.5. Medida da pressão arterial sistólica caudal (PAS)

A medida da pressão sistólica caudal foi baseada no princípio da detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso do sangue que flui através da cauda. Um sensor pizoelétrico altamente sensível detectou a distensão causada pelos pulsos e forneceu 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. O aparelho utilizado foi da marca Kent Scientific Corporation, EUA, modelo RTBP 2045. A medida da PAS foi obtida por meio da média de seis aferições consecutivas, durante dois dias consecutivos.

4.6. Determinação de pentosidina e de produtos de glicação avançada (AGE)

Os conteúdos de AGE total e pentosidina foram determinados por método de fluorescência. Cem microlitros (µL) de plasma foram adicionados a 100 µL de PBS em microplacas de 96 poços (Costar, Black). A análise foi realizada em fluorímetro (Synergy HT multi-Mode Microplate Reader). As amostras foram excitadas no comprimento de onda de 370 nm e 328 nm e a fluorescência emitida em 440 nm e 378 nm, respectivamente (PAGEON *et al*., 2007).

4.7. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Concentrações séricas de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram determinadas como marcadores de peroxidação lipídica. Quatrocentos microlitros de soro foram diluídos em 0,8 mL de água destilada. Imediatamente, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 17,5 %, seguindo-se 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6 %, pH = 2. As amostras foram colocadas em banho de água fervente, por 15 min, e a seguir resfriadas. Subsequentemente, 1 mL de ácido tricloroacético 70 % foi adicionado, incubando-se a amostra por 20 min. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 2000 rpm. A densidade óptica do sobrenadante foi lida em 543 nm contra um branco do reagente. A quantidade de TBARS foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5$ M^{-1} cm^{-1}. A concentração sérica de TBARS foi expressa em nmol/mL (OHKAWA . *et al.*, 1979).

4.8. Isolamento da Albumina do Soro dos Animais

As amostras de sangue dos animais foram coletadas em tubos secos e, imediatamente, centrifugadas a 3000 rpm, por 20 min, a 4 ºC, para obtenção do soro. A partir do soro, foi feito *pool* de cada grupo e adicionados os seguintes conservantes (μL / mL de plasma): 20 μL de gentamicina, 5 μL de benzamidina (2 mM) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha), 5 μL de aprotinina (Sigma- Aldrich,

Steinheim, Alemanha) e 0,5 μL de PMSF (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30 mM de DMSO (dimetilsulfídico) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras foram estocadas a -70 ºC até posterior processamento.

A albumina foi extraída a partir do *pool* do soro dos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC por cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (*fast protein liquid chromatography*, FPLC), utilizando-se coluna HiTrap^{tm}Blue (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Primeiramente, o *pool* de soro de cada grupo foi dialisado contra solução de 50 mM de KH_2PO_4, pH 7,0 (Tampão A). A coluna HiTrap^{tm}Blue conectada ao FPLC foi equilibrada com o Tampão A. Um mL de *pool* de soro de cada grupo foi injetado no FPLC, em uma taxa de fluxo de 1 mL / min. As amostras foram eluídas com o Tampão B (50 mM KH_2PO_4, 1,5 M KCl, pH 7,0). Ao final de cada *pool* de soro de cada grupo, a coluna HiTrap^{tm}Blue (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) foi trocada por outra e reequilibrada com o Tampão A (**Figura 4**).

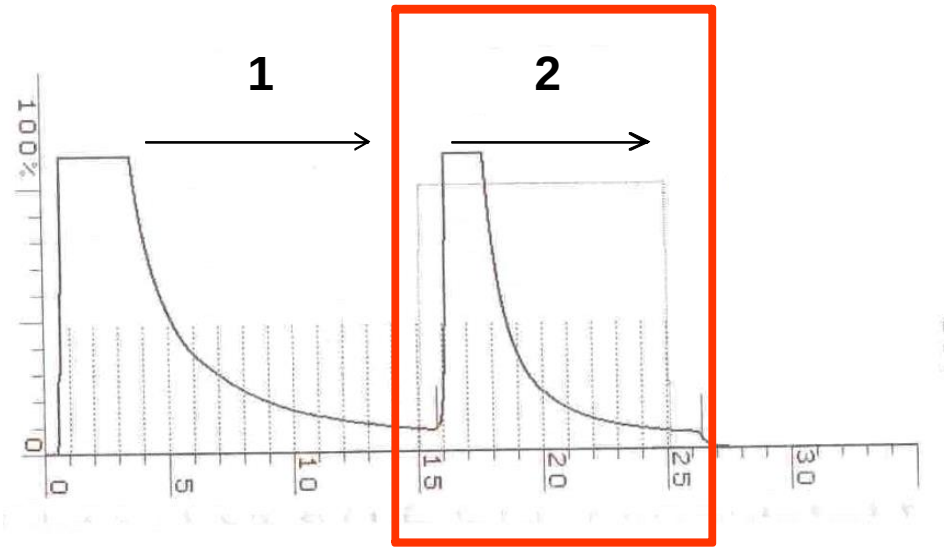


Figura 4. Extração de albumina do *pool* do soro dos animais dos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC por FPLC, utilizando-se coluna Hitrap^{tm}Blue. Durante a extração de albumina do *pool* do soro dos animais foram gerados dois picos: no primeiro (1) foi extraído o soro livre de albumina e no segundo (2) pico, a albumina. Todos os *pools* dos animais apresentaram o mesmo perfil de extração de albumina.

4.9. Purificação de albumina sérica por extração alcoólica

A purificação da albumina após ser isolada por FPLC foi realizada de acordo com adaptação do método descrito por OHKAWARA *et al.,* (2002). Para cada 300 µL da fração de albumina isolada do FPLC, foram adicionados 300 µL de ácido tricloroacético 10 % (TCA 10 %). As amostras foram agitadas e mantidas em repouso por 10 min a temperatura ambiente, sendo a seguir centrifugadas por 2 min a 10.000 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 µL de etanol absoluto (Merck, Darmastadt,

Alemanha). As amostras foram, então, centrifugadas por 2 min a 10.000 g e o sobrenadante obtido apresentou a albumina purificada. A concentração final de albumina purificada foi determinada por BCA (ácido bicinconínico) (SMITH *et al*., 1985) e as amostras foram estocadas a -70 °C. Para que as amostras fossem utilizadas nos experimentos, o etanol foi evaporado em temperatura ambiente, na capela, de modo a não ultrapassar a 0,1 % do volume final do meio de cultura que foi utilizado no tratamento celular.

A eficiência do processo de extração alcoólica, após isolamento da fração de albumina sérica por FPLC, foi verificada por eletroforese, no qual se obteve uma banda de 66 kDa, equivalente à banda obtida pela albumina altamente purificada, comercialmente disponível (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), que foi utilizada como padrão (**Figura 5**).

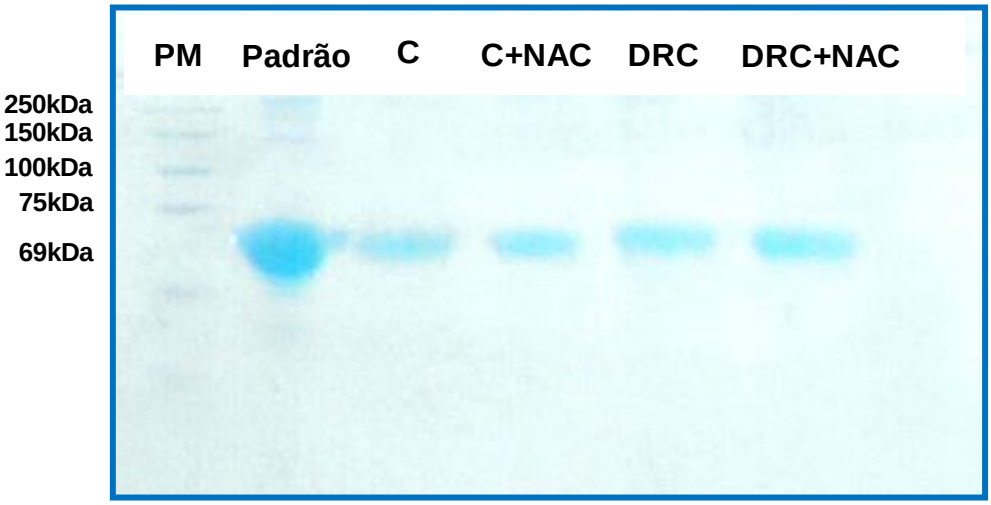


Figura 5. Eletroforese de albumina isolada do *pool* dos animais dos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC. Albumina isolada do *pool* do soro dos animais dos grupos C, C+NAC, DRC e DRC+NAC (50 μg) e purificadas por extração alcoólica foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 %, com

coloração de *Comassie Blue.* Padrão ⇨ padrão de albumina humana altamente purificada (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha).

4.10. Determinação do conteúdo celular dos receptores ABCA-1, ABCG-1 e de marcadores de estresse de retículo endoplasmático, Grp78/Bip, Grp94, PDI - Western Blotting

Macrófagos da linhagem J774 foram incubados com albumina C, C+NAC, DRC ou DRC+NAC na presença de 1 μM do indutor de LXR, T0901317 por 18 h, após as células foram removidas das placas de petri com tampão tris HCL 5 mM acrescido de inibidores de protease, centrifugadas e ressuspendidas neste mesmo tampão, porém em volume menor. As amostras foram mantidas a -70 ºC até seu processamento. Quantidades iguais de proteínas celulares (40 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6 % (ABCA-1 e ABCG-1) e 10 % (Grp 78, Grp 94 e PDI) e separadas por eletroforese (110 V, por 2 h). Após transferência para membrana de nitrocelulose (400 mA a 1 h 45 min) e bloqueio de sítios não ocupados na mesma (leite desnatado 5 % em PBS acrescido com *Tween* 0,05 %), as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-ABCA-1 (1:1000, *Novus Biologicals*, EUA), anti-ABCG-1 (1:1000, *Novus Biologicals*, EUA), anti-KDEL (1:1000, *Stressgen, Ann Arbor, MI,* EUA), anti-PDI (1:1000, *Stressgen*) e anti-beta actina (1:1.000, *Fitzgerald*, EUA) *overnight*. Ao final da incubação, as membranas foram lavadas 3 x por 10 min com PBS com Tween 20 (0,05 %) e reagidas com anticorpo secundário conjugado com

peroxidase (1:2.000, *Pierce-Thermo Fisher)*. A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (*enhanced chemiluminescence - Pierce, Rockford, IL, EUA*) e a quimiluminescência foi observada pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). As bandas foram avaliadas em pixels, pelo software de análise ImageQuant TL (*GE Healthcare*). Os resultados foram apresentados em unidades arbitrárias, em relação à situação controle (células tratadas com albumina C) após correção pela beta actina.

As membranas foram incubadas com mais de um anticorpo. Para tanto, ao final da revelação, a membrana foi lavada 5 vezes com água deionizada e foram adicionados 50 mL de NaOH 0,8 M. A membrana foi agitada vigorosamente por 5 min, o NaOH foi descartado e a membrana foi lavada com água deionizada por 7 vezes, ao longo de 5 min. A membrana permaneceu em água deionizada por 1 h sob agitação lenta e após foi lavada 2 vezes com PBS+*Tween* e bloqueada com solução de leite desnatado (5 % em PBS+ *Tween*) por 1 h. Ao final do bloqueio a membrana foi incubada novamente com o novo anticorpo primário por *overnight*.

4.11. Obtenção de lipoproteínas de *pool* de plasma humano

Amostras de sangue de indivíduos voluntários normolipidêmicos foram coletadas, após jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA (1 mg / mL) e, imediatamente, centrifugado a 4 °C, 3.000 rpm para separação do plasma. Os seguintes conservantes foram adicionados ao *pool* do plasma humano coletado:

aprotinina (10 µL / mL) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha), benzamidina 2 mM (5 µL/mL) (Sigma- Aldrich, Steinheim, Alemanha), gentamicina 0,5 %: cloranfenicol 0,25 % (20 µL/mL) e fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) (0,5 µL/mL).

As lipoproteínas (LDL,1,019 < d < 1,063 g/mL; HDL_2, 1,063 < d < 1,125 g/mL e HDL_3, 1,125 < d < 1,21 g/mL) foram isoladas a partir do *pool* do plasma por ultracentrifugação sequencial a 40.000 rpm, a 4 °C, utilizando-se rotor 50 Ti em ultracentrifuga Beckman L-80 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, EUA), segundo HAVEL *et al.,* (1955). A densidade do plasma foi ajustada para as respectivas frações das lipoproteínas com KBr. As LDL e as subfrações de HDL foram purificadas por gradiente descontínuo de densidade (REDGRAVE *et al.*, 1975) e, posteriormente, dialisadas contra PBS/EDTA, pH 7,4, por 24 h. Após esterilização com filtro 0,22 µm foram mantidas sob refrigeração. O conteúdo de colesterol total e triglicérides foi determinado por métodos enzimáticos colorimétricos e a concentração de proteína pelo método de LOWRY *et al* (1951).

4.12. Acetilação das LDL

As LDL foram acetiladas segundo o protocolo descrito por BASU *et al.,*(1976). Foram utilizados 16 mg de LDL, aos quais foram adicionados 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de NaCl 0,15 M, sob agitação constante e banho de gelo. Foram, então, adicionados 24 µL de anidrido acético

em pequenas quantidades durante 1 h, seguindo-se de 30 min de agitação em banho de gelo.

A seguir, a LDL acetilada foi dialisada contra PBS (NaCl 137 mmol/L; Na_2HPO_4 4 mmo/L; KCl 2 mmol/L; K_2PO_4 1 mmol/L), contendo EDTA (pH = 7,4) e esterilizada em filtro 0,22 μm. A concentração final da LDL acetilada foi determinada pelo método de LOWRY *et al*.,(1951).

4.13. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos

Macrófagos J774A.1 de linhagem tumoral de camundongos, foram gentilmente doadas pelo laboratório de Sorologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP (IMTFMUSP, LIM-38). As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2, em meio RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), 100 μg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), 100 U/mL de penincilina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) e 2 mM de glutamina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA), mantidas em incubadora de CO_2 5 % a 37 ºC.

Os macrófagos foram incubados em placa de cultura com 48 poços na quantia de 0,2 x 10^6 /0,25 mL de RPMI (Gibco) contendo 10 % de SFB, antibióticos e glutamina. Após confluência, foram incubados com DMEM (*Low Glucose*, Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 1 mg de albumina isenta em ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), acrescido

com 50 μg de LDL acetilada / mL e 0,3 μCi de ^{14}C-colesterol / mL de meio (Amersham Biosciences, Reino Unido), durante 48 h. Após cuidadosa lavagem com tampão fosfato (PBS- NaCl 150 mmol/L, Na_2HPO_4 20 mmol/L, NaH_2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1 mmol/L - pH = 7,4) com FAFA, as células foram tratadas, por 18 h, com meio DMEM (*Low Glucose*, Gibco) suplementado com 1 mg de *pool* de albumina purificada dos grupos C, C+NAC, DRC, DRC+NAC.

Após lavagem com PBS/FAFA, as células foram incubadas na presença ou ausência de apoA-I (30 μg / mL) por 8 h ou HDL_2 (50 μg / mL) por 5 h. O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, centrifugado a 1.500 rpm durante 10 min a 4 ºC, para remoção de restos celulares e transferido para frascos de cintilação, seguindo-se a adição de solução contadora (Perkin Elmer, turko, Finlândia). A radioatividade foi determinada em contador beta (Beckman).

Os poços das placas foram lavados com solução fisiológica gelada (4 ºC) por 2 vezes. Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2) (Merck, Darmastadt, Alemanha) e a radioatividade determinada após evaporação do solvente. As células foram incubadas com 250 µL de NaOH 0,2 N durante 3 h, a temperatura ambiente, seguindo-se a medida da concentração de proteína pelo método de LOWRY *et al*.,(1951).

A quantidade de radioatividade presente no meio, ao final do período de incubação com apo A-I (8 h) ou HDL_2 (5 h), indicou o efluxo de colesterol mediado pela albumina, tanto o meio só com albumina, como o meio com albumina + apo A-I ou HDL_2. O efluxo de colesterol mediado apenas por

albumina é denominado de efluxo de colesterol basal, enquanto que na presença dos aceptores é determinado de efluxo de colesterol total.

Deste modo, foi calculado o efluxo total, ou seja, mediado pela apo A-I ou HDL_2, subtraindo o efluxo mediado pela albumina do efluxo basal de maneira a refletir o efluxo mediado somente pelos aceptores apo A-I ou HDL_2.

A porcentagem de efluxo de ^{14}C-colesterol foi calculada como:

$$\frac{^{14}C\text{-colesterol no meio}}{^{14}C\text{-colesterol no meio} + {}^{14}C\text{-colesterol na célula}} \times 100$$

4.14. Teste de viabilidade celular

O teste de liberação de lactato desidrogenase (LDH) foi realizado para controle de citotoxicidade (*kit* de LDH; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após remoção do meio de cultura das células tratadas, este foi centrifugado a 250 g por 4 min. Posteriormente, 75 µL de meio de cultura foram adicionados a 150 µL do MIX do *Kit* (*Assay Subtrate* + *Assay Cofactor* + *Dye Solution*), com incubação a temperatura ambiente por 20 a 30 min. Este ensaio é baseado na redução do NAD pela ação da LDH. O NAD reduzido (NADH) resultante reage com o corante tetrazolium, o que resulta em uma coloração que pode ser medida por espectrofotometria a 490 nM. A liberação de LDH no meio de cultura não diferiu entre os tratamentos com albumina-C, albumina-C+NAC, albumina-DRC ou albumina-DRC+NAC, ou seja, em nenhuma situação (dados não mostrados).

4.15. Análise Estatítica

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism, versão 4.0 (*GraphPad Softweres, USA*). As comparações entre os grupos foram feitas por análise de variância de um fator (ANOVA), com pós-teste de *Newman-Keuls,* ou quando apropriado, pelo teste t de *Student.* Foi considerada como significante toda situação na qual o nível descritivo de significância foi inferior a 5 % ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

Não houve diferença de peso corporal entre os animais no início do estudo (dados não mostrados), mas ao final do protocolo ele foi 10 % menor no grupo DRC em comparação ao grupo C e 7 % menor em comparação ao grupo DRC + NAC. Não se observou diferença ente os grupos C + NAC e DRC + NAC (**Figura 6**).

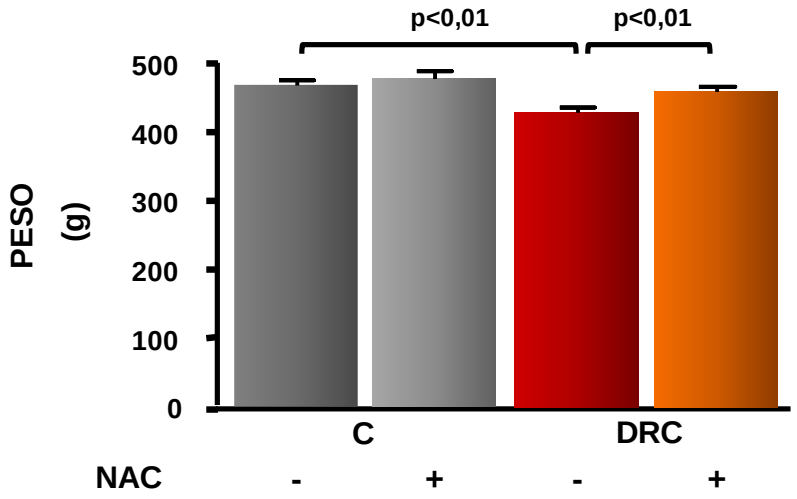


Figura 6. Peso corporal (g) dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + N-acetilcisteína (DRC + NAC; n = 32) no período final. Os animais foram pesados após 60 dias de nefrectomia 5/6. As comparações foram feitas por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls* (média ± EP).

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida somente nos grupos DRC e DRC+NAC nos períodos basal e final. A PAS foi maior após 60 dias de estabelecimento da DRC em comparação ao período basal, tanto nos animais tratados com NAC como naqueles que não foram tratados. No final do protocolo experimental, a PAS do grupo DRC + NAC foi 17 % menor do que o grupo DRC não tratado (**Figura 7**).

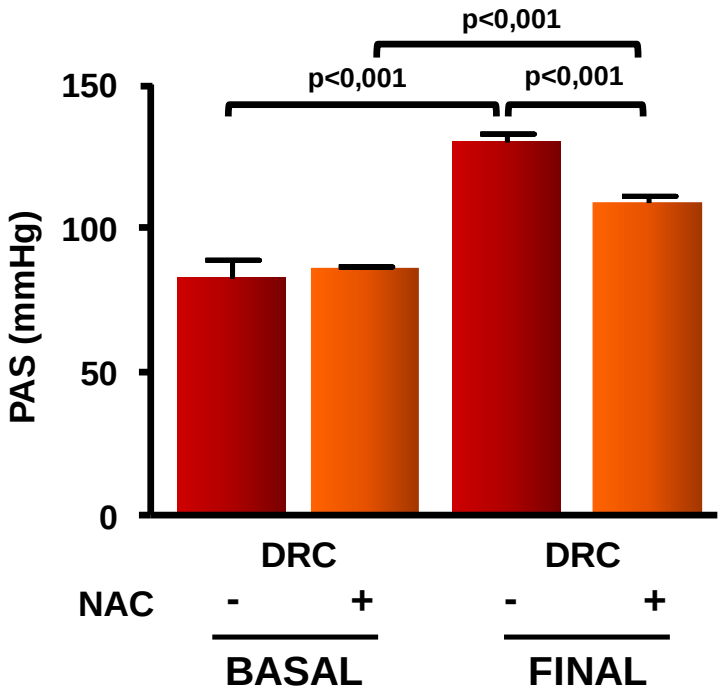


Figura 7. Pressão arterial sistólica (PAS; mmHg) dos grupos Doença Renal Crônica (DRC; n = 6) e DRC + N-acetilcisteína (DRC + NAC; n = 6) nos períodos basal e final. A PAS foi aferida na cauda dos animais, com seis aferições consecutivas, durante dois dias seguidos. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

A concentração plasmática de ureia, creatinina e a excreção urinária de proteína de 24 h foram maiores no final do protocolo experimental, quando comparado ao período basal, confirmando o estabelecimento da DRC (dados não mostrados). O grupo DRC e DRC+NAC apresentaram maior concentração plasmática de ureia em comparação, respectivamente, aos grupos C e C+NAC. No grupo DRC + NAC a concentração de ureia foi 25 % menor em comparação ao grupo DRC não tratado, embora tenha sido superior a do grupo C + NAC (**Figura 8**).

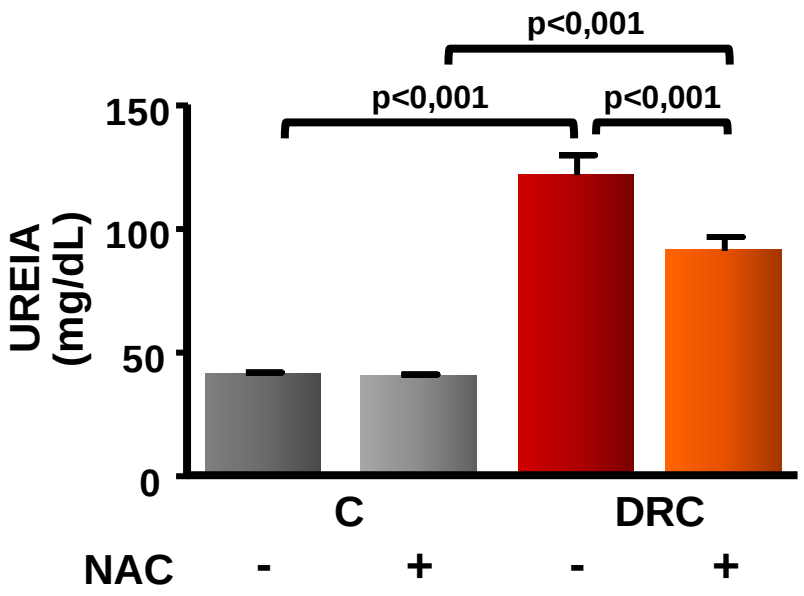


Figura 8. Concentração plasmática de ureia dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final. Sangue foi coletado da cauda dos animais em tubos contendo EDTA. As determinações foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

A concentração plasmática de creatinina foi maior nos grupos DRC e DRC+NAC em comparação, respectivamente, aos grupos C e C+NAC. No grupo DRC+NAC a creatinina foi 33 % menor em comparação ao grupo DRC, mas foi superior ao grupo C + NAC (**Figura 9**).

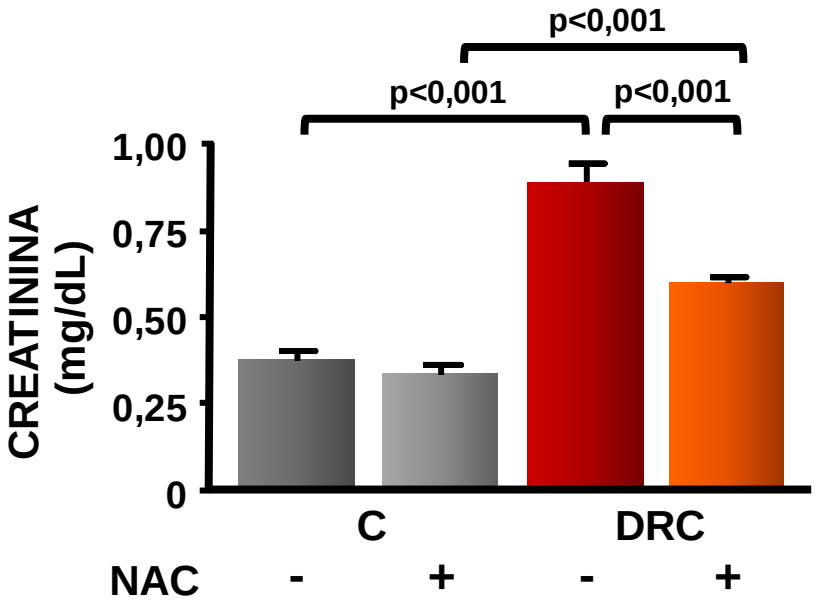


Figura 9. Concentração plasmática de creatinina dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final. Sangue foi coletado da cauda dos animais em tubos contendo EDTA. As determinações foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

A excreção urinária de proteína de 24 h foi maior nos grupos DRC e DRC+NAC em comparação, respectivamente, aos grupos C e C+NAC. Não houve alteração da proteinúria nos animais DRC tratados com NAC em comparação aos não tratados (**Figura 10**).

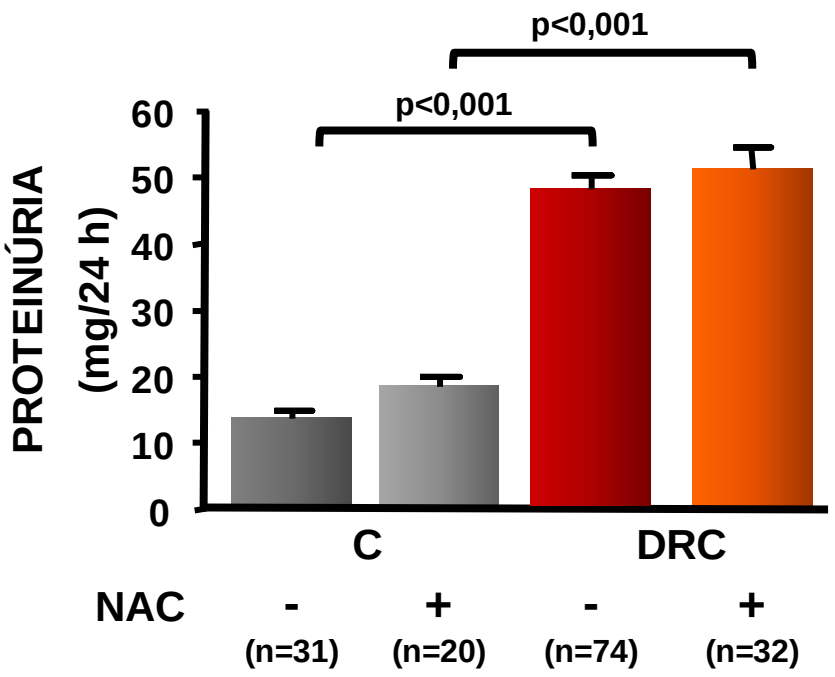


Figura 10. Excreção urinária de proteína em 24 h dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final do estudo. Coleta de urina foi realizada após acondicionamento dos animais, durante 24 h, em gaiola metabólica. A proteinúria foi determinada por *kit* colorimétrico e corrigida pelo volume urinário. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator - pós teste de *Newman-Keuls.*

As concentrações plasmáticas de triglicérides e colesterol total apresentaram-se elevadas no período final do estudo, quando comparadas ao período basal (dados não mostrados). Os triglicérides foram 37 % maiores no grupo DRC em comparação ao grupo C. Não houve diferença na trigliceridemia entre os grupos C + NAC e DRC + NAC (**Figura 11**).

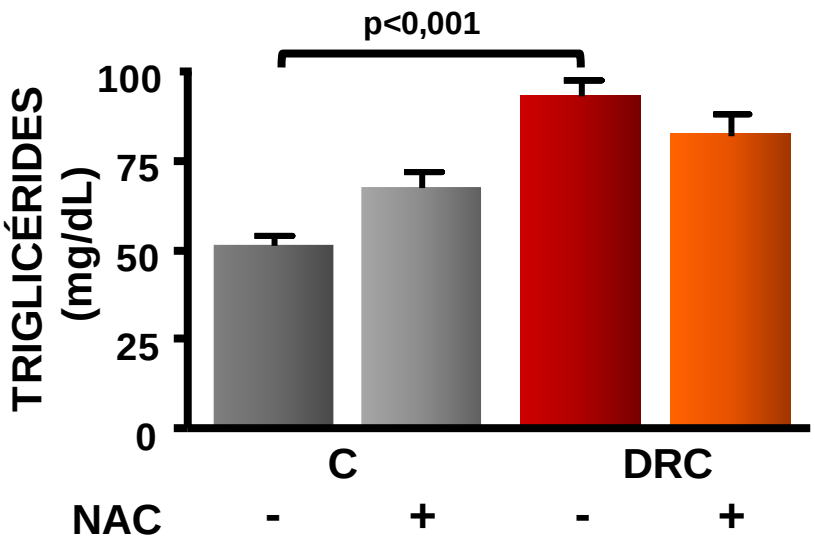


Figura 11. Concentração plasmática de triglicérides dos grupos Controle (C;n = 31), C + NAC (n = 20), Doença Renal Crônica (DRC; n = 74) e DRC + NAC (n = 32) no período final do experimento. Sangue foi coletado da cauda dos animais, após jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA. As determinações foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos, após coleta de sangue dos animais em jejum de 12 h. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

A concentração plasmática de colesterol total foi maior nos grupos DRC e DRC+NAC em comparação, respectivamente, aos grupos C e C+NAC. No grupo DRC + NAC a colesterolemia foi 17 % menor em comparação ao grupo DRC não tratado, mas ainda foi superior ao grupo C + NAC (**Figura 12**).

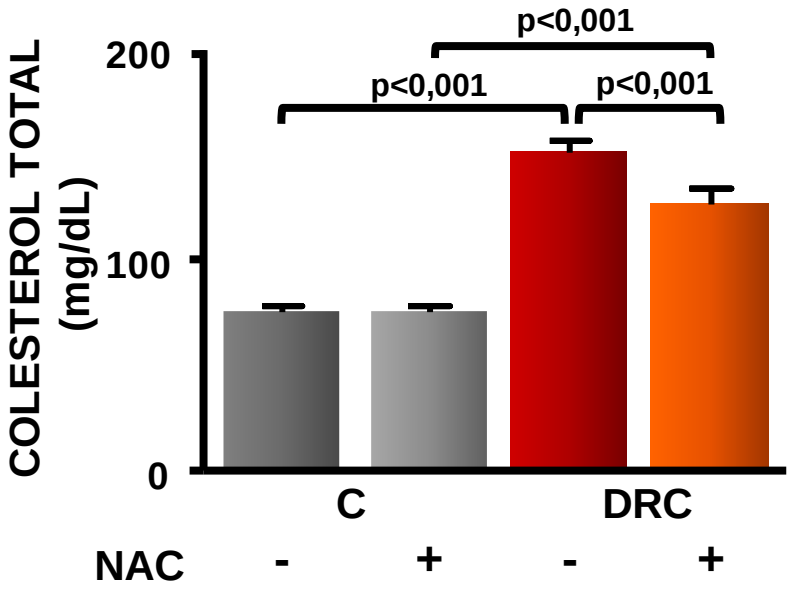


Figura 12. Concentração plasmática de colesterol total dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n=20), Doença Renal Crônica (DRC; n=74) e DRC+NAC (n=32) após 60 dias de estudo. Sangue foi coletado da cauda dos animais, após jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA. As determinações foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos após coleta de sangue dos animais em jejum de 12 h.Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós teste de *Newman-Keuls.*

A concentração plasmática de glicose apresentou-se elevada no período final do estudo em comparação ao período basal (dados não mostrados). No período final, apenas os grupos tratados com NAC, ou seja, C+NAC e DRC+NAC apresentaram glicemia maior em comparação aos respectivos grupos não tratados (**Figura 13**).

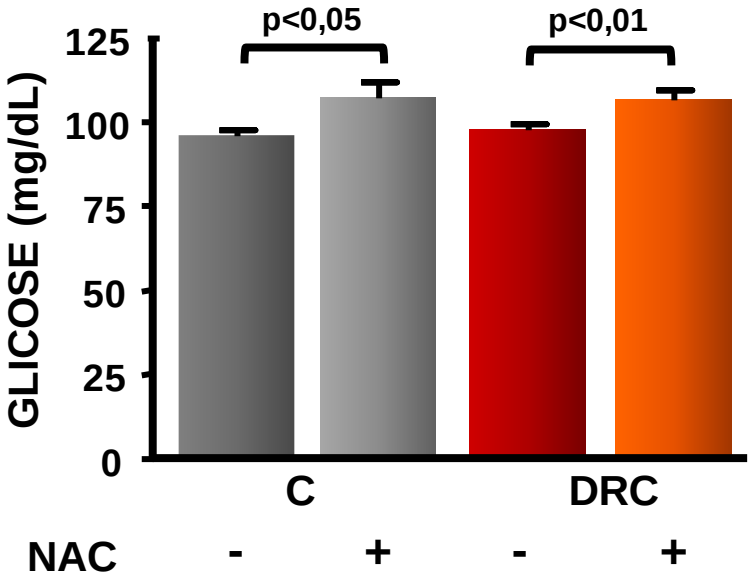
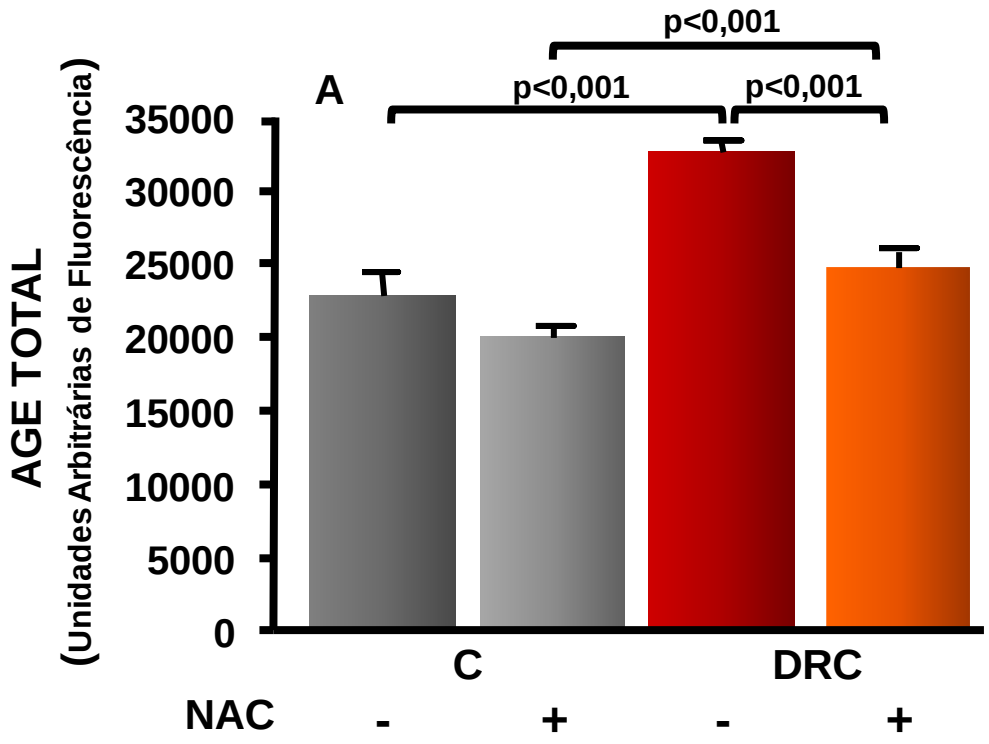


Figura 13. Concentração plasmática de glicose dos grupos Controle (C; n = 31), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 20), Doença renal Crônica (DRC; n=74) e DRC + NAC (n = 32) no período final do estudo. Sangue foi coletado da cauda dos animais, após jejum de 12 h, em tubos contendo EDTA e as determinações foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

O conteúdo total de AGE circulante (**Figura 14, painel A**) e pentosidina (**Figura 14, painel B**) foram determinados no plasma somente no período final do experimento e se apresentaram maiores nos grupos DRC e DRC+NAC em comparação, respectivamente, aos grupos C e C+NAC. Nos animais DRC tratados com NAC observou-se menor conteúdo de AGE total (24 %) e pentosidina (40 %), em comparação ao grupo DRC (**Figura 14, painel A e B**).



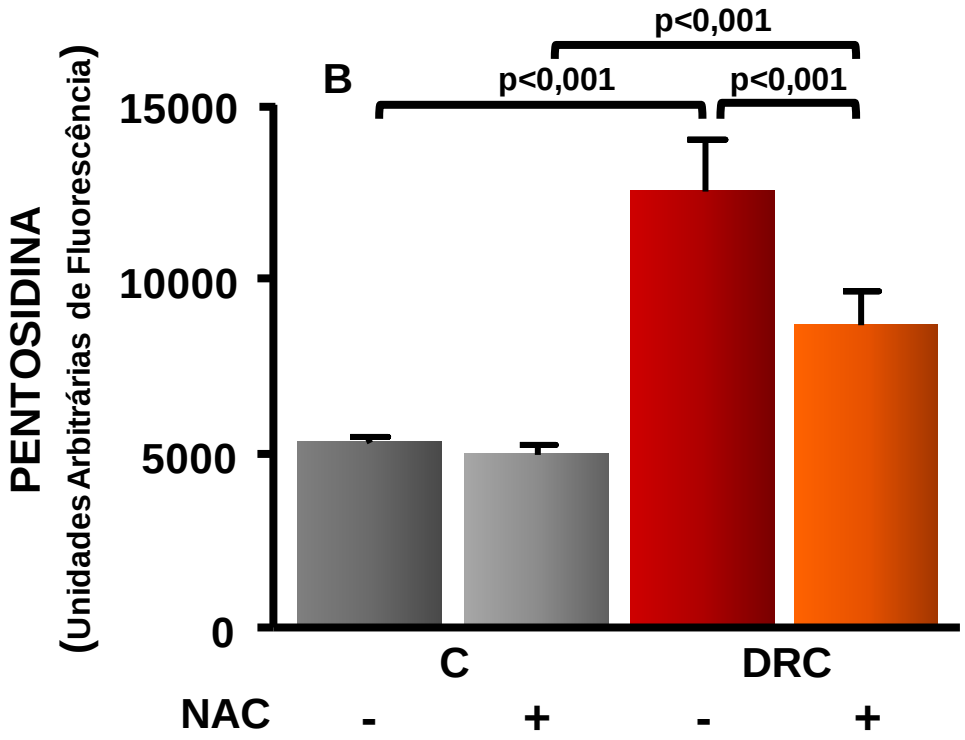


Figura 14. Determinação de produtos de glicação avançada (AGE). O conteúdo total de AGE circulante (**painel A**) e pentosidina (**painel B**) foram determinados no plasma dos animais dos grupos Controle (C; n = 10), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 8), Doença Renal Crônica (DRC; n = 8) e DRC + NAC (n = 8). As determinações foram realizadas pela medida de absorbância na faixa de fluorescência em 440 nm (AGE total, **painel A**) e 378 nm (Pentosidina, **painel B**). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós teste de *Newman-Keuls.*

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) representativa de peroxidação lipídica permite inferir o estresse oxidativo circulante no soro dos animais. A peroxidação lipídica foi medida apenas no período final do experimento e foi maior nos grupos DRC e DRC+NAC em comparação aos grupos C e C+NAC, respectivamente. Nos animais DRC tratados com NAC a concentração de TBARS foi 28 % menor em comparação ao grupo DRC (**Figura 15**).

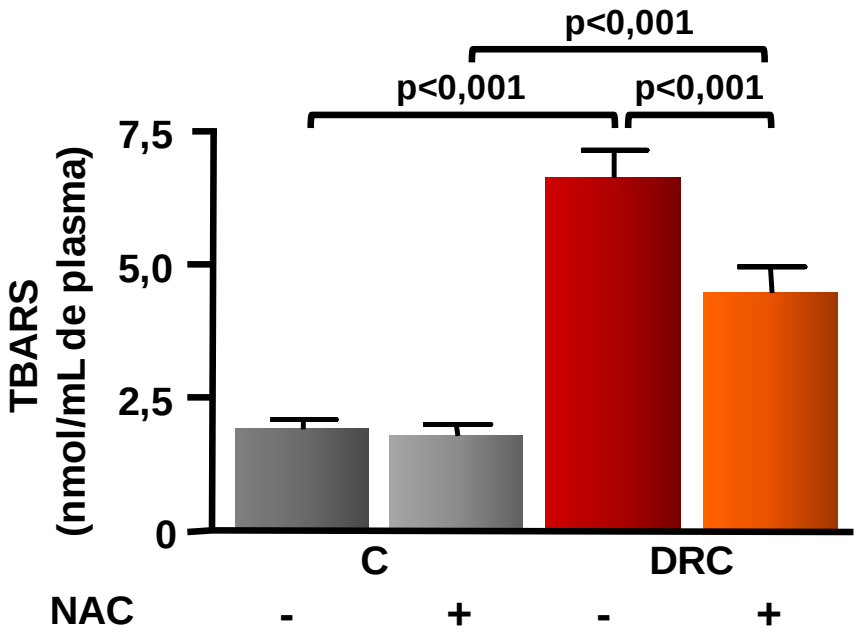


Figura 15. Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro dos animais dos grupos Controle (C; n = 7), C + N-acetilcisteína (C + NAC; n = 7), Doença Renal Crônica (DRC; n = 7) e DRC + NAC (n = 7) após 60 dias de estudo. As determinações foram realizadas pela determinação da densidade óptica do sobrenadante em 534 nm. A quantidade de TBARS foi calculada utilizando-se coeficiente de extinção molar de 1,56 x 10^5 M^{-1} cm^{-1}. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

Albumina foi isolada do soro dos animais dos quatro grupos experimentais e utilizada para tratar macrófagos da linhagem J774. Após 18 h de tratamento com albumina-DRC o conteúdo de PDI foi 5 e 7 vezes maior em comparação, respectivamente, à albumina-C e albumina-DRC + NAC. O conteúdo de PDI foi semelhante entre macrófagos tratados com albumina DRC + NAC e albumina C + NAC (**Figura 16**).

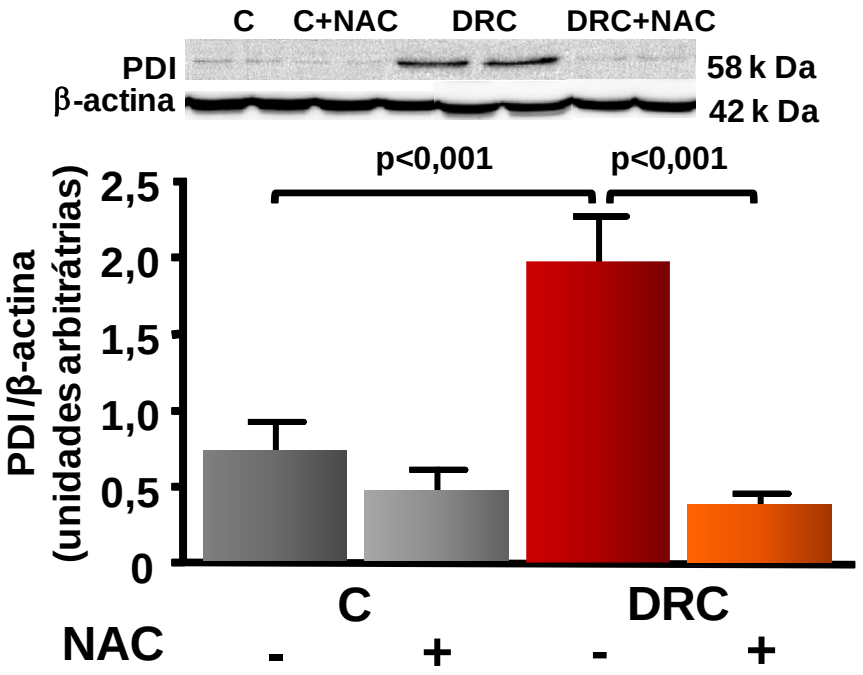
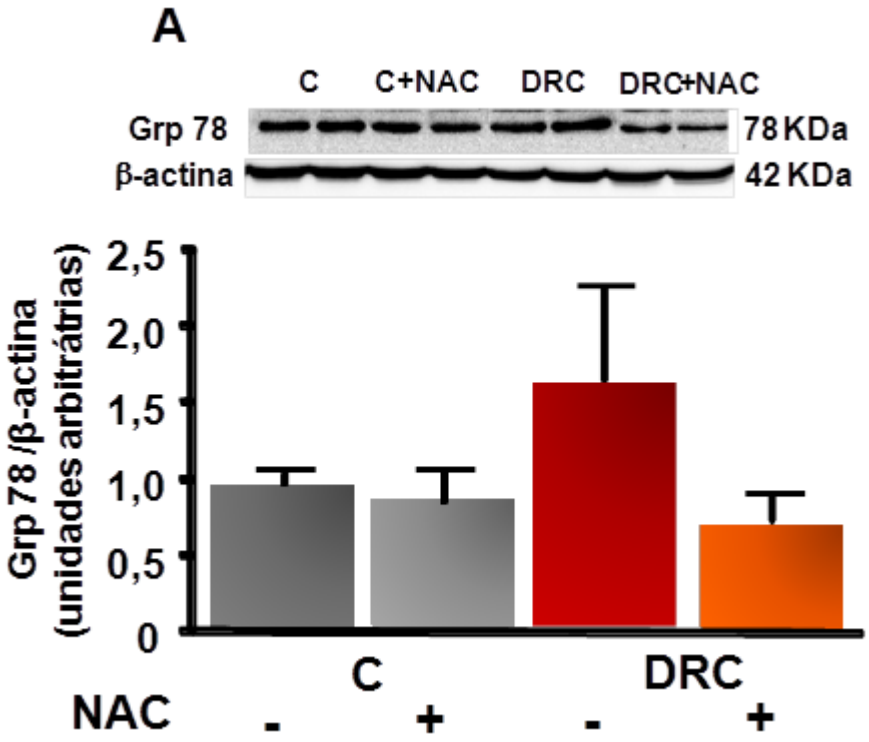


Figura 16. Conteúdo da PDI em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C+NAC, albumina-DRC e albumina-DRC+NAC por 18 h. Macrófagos J774 foram tratados com 1 mg / mL de albumina-C (n = 6), albumina-C + NAC (n = 6), albumina-DRC (n = 8) e albumina-DRC + NAC (n = 6) por 18 h. Quantidades iguais de proteína celular (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 %, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-PDI (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com *ECL* pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós-teste de *Newman-Keuls.*

O conteúdo da chaperona Grp 78 não foi diferente entre os grupos (**Figura 7, painel A**). Entretanto, a expressão da proteína Grp 94 foi 66 % maior nos macrófagos tratados com albumina-DRC em comparação à albumina-C. O aumento do conteúdo da Grp 94 foi prevenido em células tratadas com albumina-DRC + NAC, a qual foi semelhante a das células tratadas com albumina C + NAC (**Figura 17, painel B**).



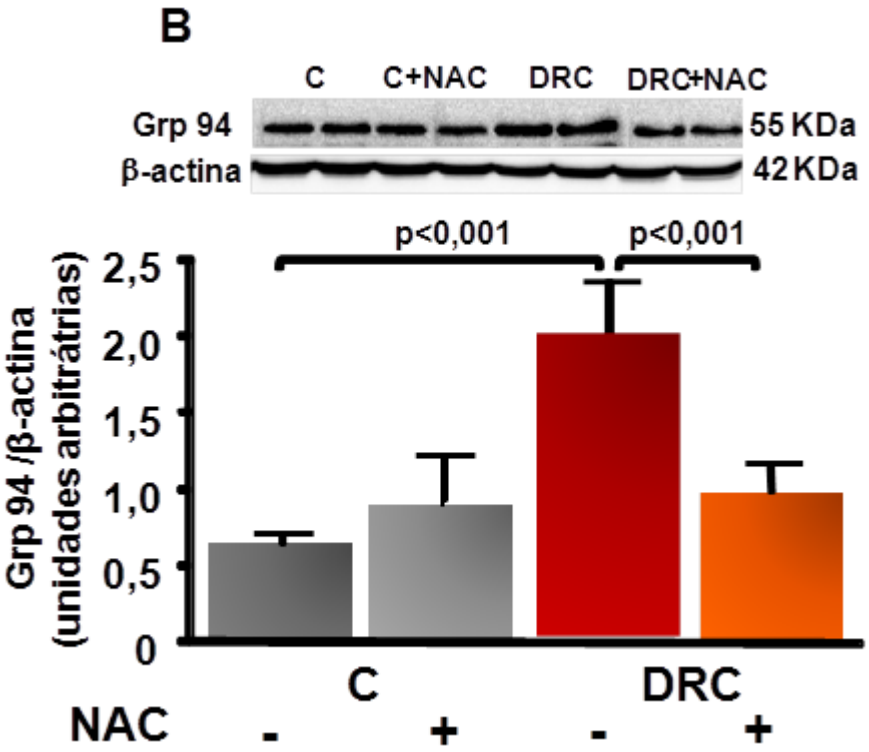


Figura 17. Conteúdo das proteínas Grp 78 (painel A) e Grp 94 (painel B) em macrófagos submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC por 18 h. Macrófagos J774 foram tratados com 1 mg / mL de albumina-C (n = 8), albumina-C + NAC (n = 8), albumina-DRC (n = 8) e albumina-DRC+NAC (n = 8) por 18 h. Quantidades iguais de proteína celular (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10 %, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-KDEL (1:1000) e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com *ECL* pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

O efluxo de colesterol de macrófagos J774 tratados com albumina-C, albumina-C+NAC, albumina-DRC e albumina-DRC+NAC foi avaliado utilizando-se apoa A-I e HDL_2 como aceptoras de colesterol (**Figura 18 e Figura 20**). Macrófagos tratados com albumina-C+NAC e com albumina-DRC apresentaram, respectivamente, uma diminuição de 59 % e 70 % no efluxo de colesterol mediado por apo A-I em comparação aos macrófagos tratados com albumina-C (**Figura 18**).

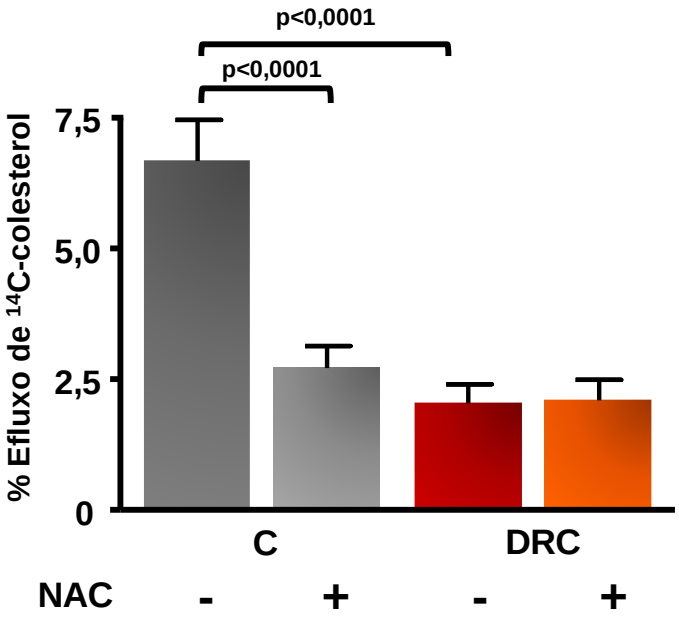


Figura 18. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos J774 tratados com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC, mediado por apo A-I. Macrófagos J774 foram sobrecarregados com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol por 24h. Após cuidadosa lavagem com PBS, as células foram tratadas, por 18 h, com 1 mg / mL de *pool* de albumina isolada do soro dos animais C (n = 5), C + NAC (n = 7), DRC (n = 10) e DRC + NAC (n = 9) acrescido com 1μM de T0901317 (agonista de LXR). Após lavagem, o efluxo de colesterol foi determinado na presença de meio de cultura apenas ou na presença de apo A-I (30 μg / mL), por 8h. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

O conteúdo de ABCA-1 foi respectivamente 87 %, 71 % e 74 % menor nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC em comparação aos macrófagos tratados com albumina-C (**Figura 19**).

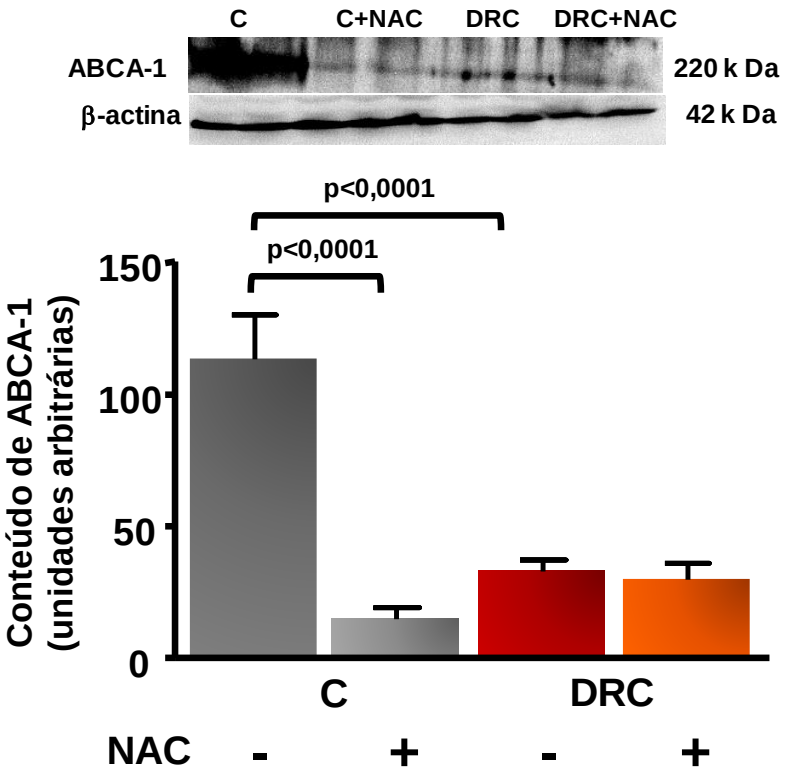


Figura 19. Conteúdo do receptor ABCA-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC por 18 h. Macrófagos J774 foram tratados com 1 mg / mL de albumina-C (n = 4), albumina-C + NAC (n = 4), albumina-DRC (n = 4) e albumina-DRC + NAC (n = 4) acrescidos com 1μM de T0901317 (agonista sintético de LXR), por 18 h. Quantidades iguais de proteína celular (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6 %, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCA-1 (1:1000) e anticorpo secundário anti-*mouse* conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com *ECL* pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

Macrófagos da linhagem J774 tratados com albumina-C+NAC apresentaram um aumento de 52 % e 25 % no efluxo de colesterol mediado pela HDL_2 em comparação respectivamente aos macrófagos tratados com albumina-C e com albumina-DRC+NAC. (**Figura 20**).

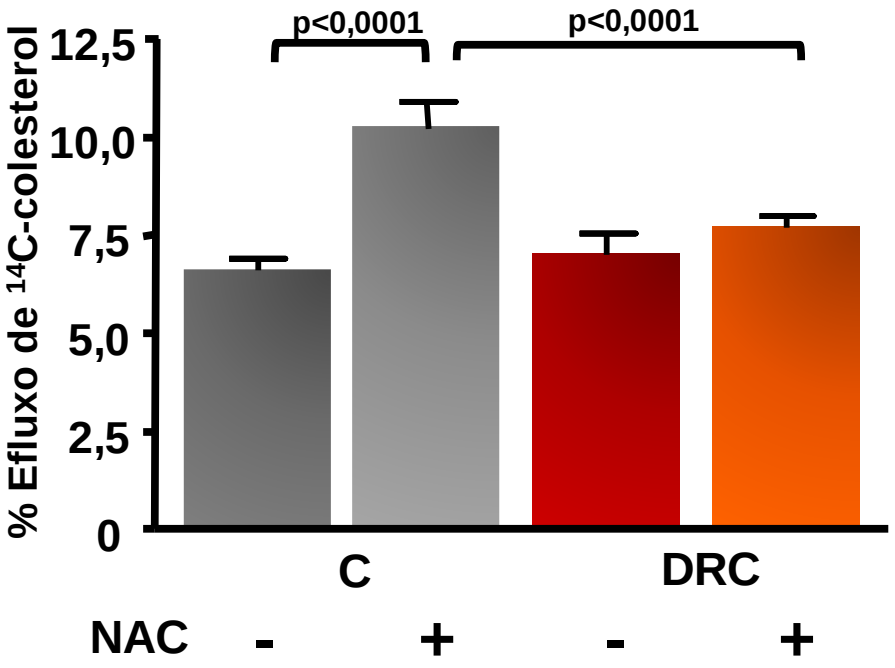


Figura 20. Efluxo de ^{14}C-colesterol de macrófagos J774 tratados com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC, mediado por HDL_2. Macrófagos J774 foram sobrecarregados com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol por 24 h. Após cuidadosa lavagem com PBS, as células foram tratadas, por 18 h, com 1 mg / mL de *pool* de albumina isolada do soro dos animais C (n = 14), C + NAC (n = 11), DRC (n = 13) e DRC + NAC (n = 12). Após lavagem, o efluxo de colesterol foi determinado na presença de meio de cultura apenas ou na presença de HDL_2 (50 μg / mL), por 5h. Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

O conteúdo de ABCG-1 foi respectivamente, 4 e 7 vezes maior nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC e albumina-DRC+NAC em comparação respectivamente, aos macrófagos tratados com albumina-C e albumina-DRC (**Figura 21**).

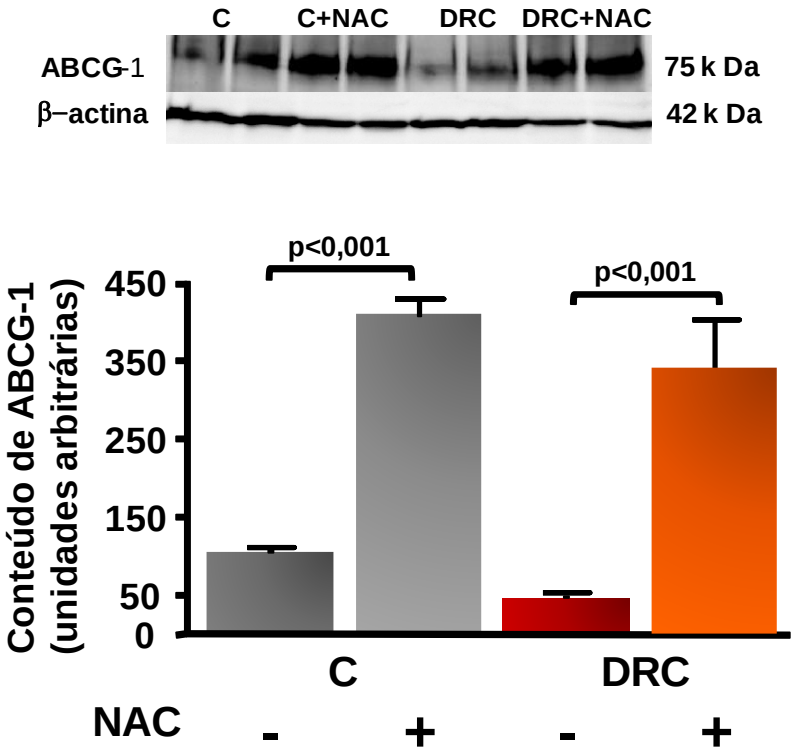
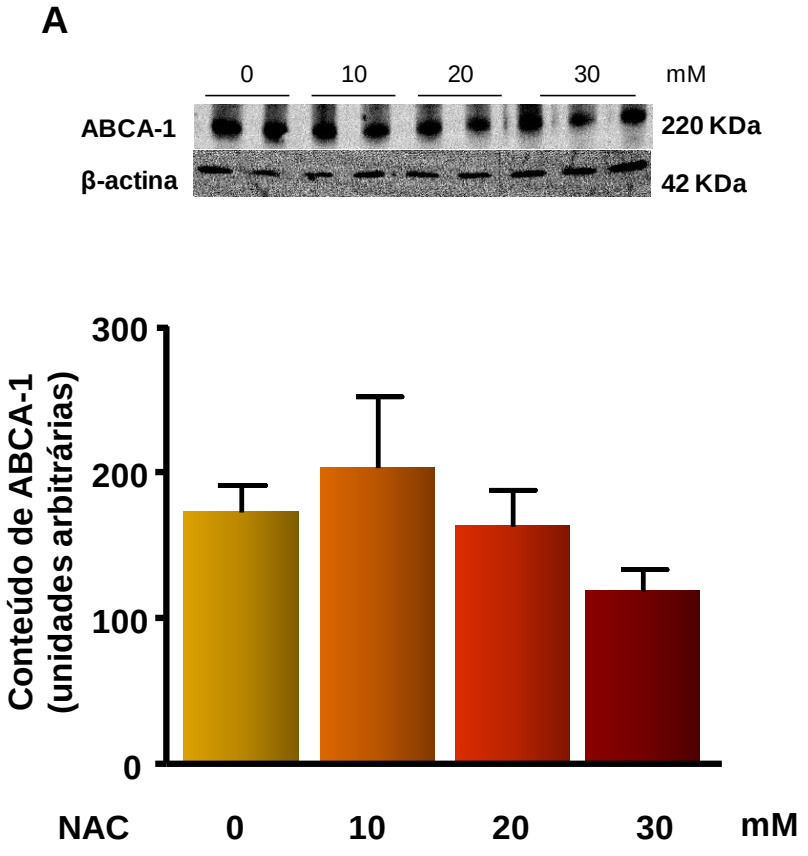


Figura 21. Conteúdo do receptor ABCG-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com albumina-C, albumina-C + NAC, albumina-DRC e albumina-DRC + NAC por 18 h. Macrófagos J774 foram tratados com 1 mg / mL de albumina-C (n = 11), albumina-C + NAC (n = 5), albumina-DRC (n = 7) e albumina-DRC + NAC (n = 11), por 18 h. Quantidades iguais de proteína celular (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6 %, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCG-1 (1:1000) e anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado à peroxidase (1:1000). A visualização das bandas foi obtida após reação com *ECL* pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

Devido à alteração distinta no conteúdo de ABCA-1 e ABCG-1 observada nos macrófagos tratados com albumina-C+NAC e albumina-DRC+NAC (**Figura 19 e Figura 21**), analisamos o papel isolado da NAC em diferentes concentrações (10 mM, 20 mM e 30 mM) sobre o conteúdo destes receptores em macrófagos, após tratamento por 8 h e 18 h. Não houve diferença no conteúdo de ABCA-1 em macrófagos tratados com NAC por 8 h (**Figura 22, painel A**). Entretanto, em macrófagos expostos a 10 mM, 20 mM e 30 mM de NAC, por 18 h, o conteúdo de ABCA-1 foi respectivamente, 50 %, 69 % e 72 % menor, em comparação aos macrófagos mantidos apenas na presença de meio de cultura (**Figura 22, painel B**).



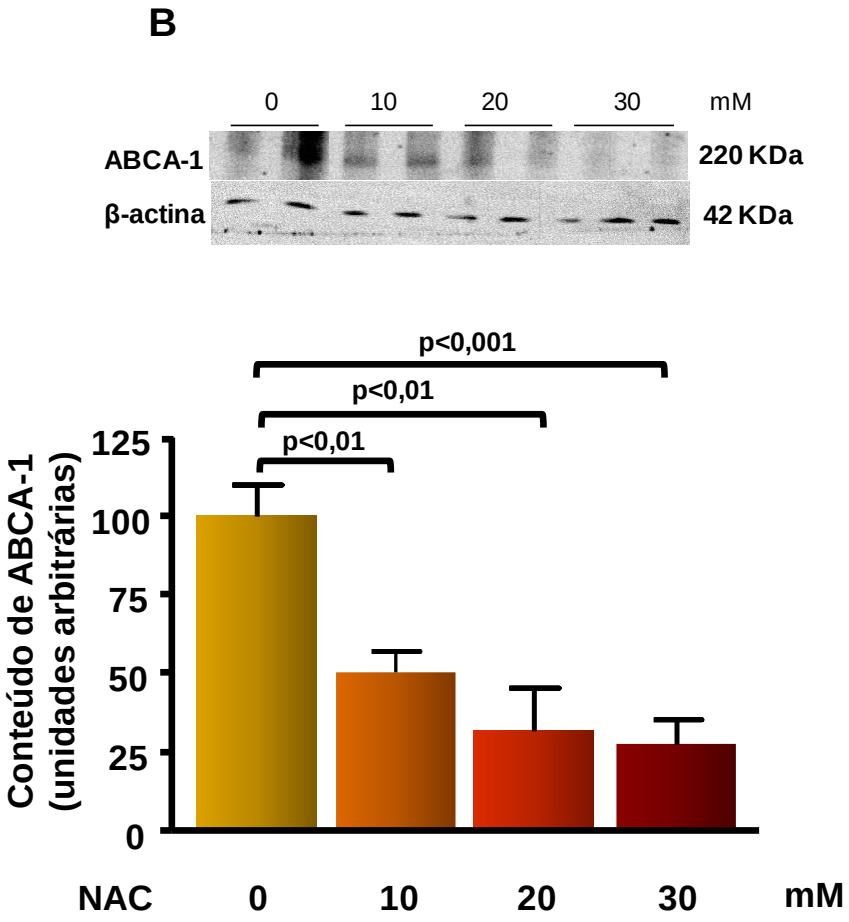
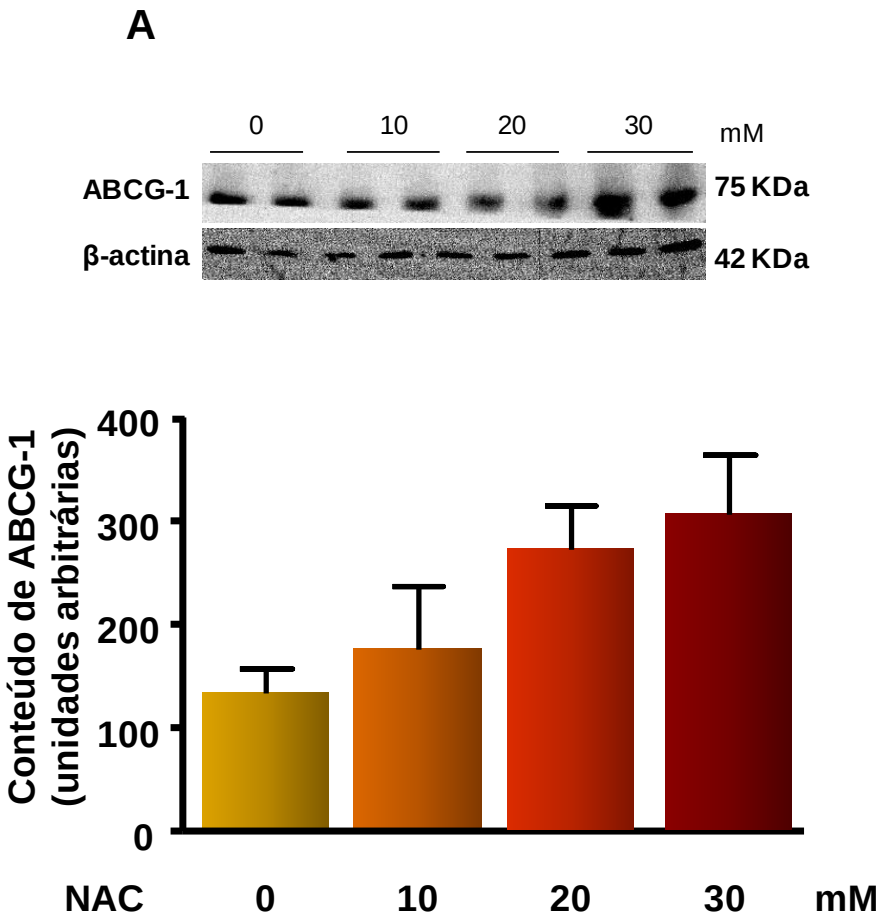


Figura 22. Conteúdo do receptor ABCA-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com NAC nas concentrações 10 mM, 20 mM e 30 mM por 8 h (painel A) e 18 h (painel B). Macrófagos J774 foram tratados com 10 mM (n = 4), 20 mM (n = 4) e 30 mM (n = 5) de N-acetilcisteína (Sigma Chem. Co. A9165-25G) acrescidos com 1 μM de T0901317 (indutor sintético de LXR), por 8 h (**painel A**) e 18 h (**painel B**). Na condição controle (0), as células foram mantidas em meio de cultura apenas (n = 4). Quantidades iguais de proteína celular (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6 %, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCA-1 (1:1000) e anticorpo secundário anti-*mouse* conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com *ECL* pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

Na **figura 23**, observa-se que não houve diferença no conteúdo do receptor ABCG-1 em macrófagos tratados com NAC por 8 h e 18 h em ambos os tempos (**Figura 23**, **painel A e B**), embora pareça existir tendência ao aumento, de acordo com o aumento da concentração de NAC.



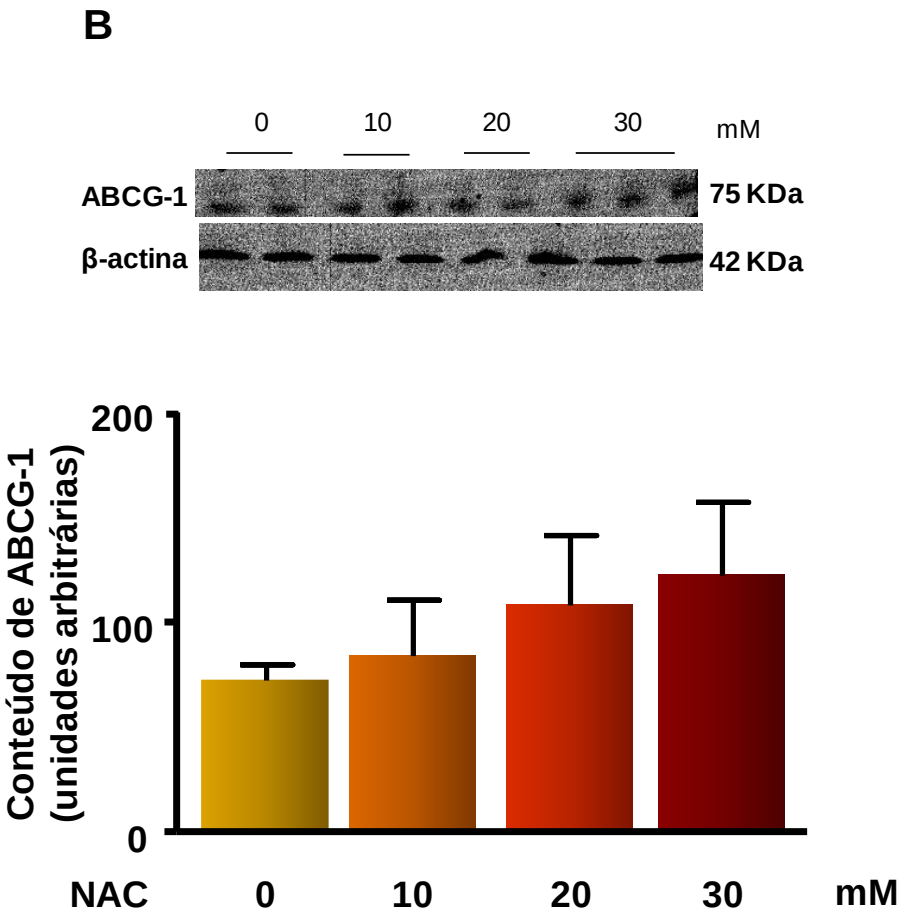


Figura 23. Conteúdo do receptor ABCG-1 em macrófagos J774 submetidos ao tratamento com NAC nas concentrações 10 mM, 20 mM e 30 mM por 8 h (painel A) e 18 h (painel B). Macrófagos J774 foram tratados com 10 mM (n=4), 20 mM (n=4) e 30 mM (n=5) de N-acetilcisteína (SIGMA, cód. A9165-25G) por 8 h (**painel A**) e 18 h.(**painel B**) Na condição controle (0), as células foram mantidas em meio de cultura apenas (n = 4). Quantidades iguais de proteína celular (50 μg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6 %, submetidas à eletroforese e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Imunoblot foi realizado utilizando-se anticorpo anti-ABCG-1 (1:1000) e anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado à peroxidase (1:2000). A visualização das bandas foi obtida após reação com *ECL* pelo aparelho ImageQuant 300 (*GE Healthcare*). Os resultados (média ± EP) foram comparados por ANOVA de 1 fator com pós- teste de *Newman-Keuls.*

6. DISCUSSÃO

Na DRC é menor o poder preditivo dos fatores de risco clássicos para aterosclerose e as intervenções intensivas sobre o LDL colesterol ou proteína C reativa falham em demonstrar benefício em desfechos cardiovasculares (MORADI *et al*., 2009b). Desta forma, a exposição crônica às toxinas urêmicas, AGE e produtos de carbamilação são considerados na gênese da aterosclerose na DRC (VAZIRI & NORRIS. 2011; CARRACEDO *et al.*, 2011).

Os AGE medeiam o risco acumulado memorizado ao longo do tempo de exposição ao estresse oxidativo, mantendo o risco cardiovascular elevado mesmo na vigência de terapia intensiva para fatores de risco clássicos e correção para fatores não mutáveis, como sexo e idade. Neste estudo, avaliamos o efeito do tratamento com N-acetilcisteína sobre a concentração de produtos de oxidação e glicação avançada no plasma de ratos com DRC e o reflexo sobre a influência da albumina isolada desses animais no efluxo de colesterol de macrófagos.

Após 60 dias de nefrectomia, observou-se marcante elevação na concentração plasmática de ureia e creatinina e na excreção urinária de proteínas em 24 h. O tratamento com NAC reduziu a concentração de ureia e creatinina o que é reflexo da ação desse composto na melhora da taxa de filtração glomerular (FELDMAN *et al*., 2012; SHIMIZU *et al*., 2005). Embora a proteinúria não tenha sido reduzida, evidencia-se em outros estudos sua redução após tempos mais longos de tratamento, como por exemplo, 120 dias (SHIMIZU *et al*., 2005).

Animais com DRC tratados com NAC apresentaram menor concentração plasmática de colesterol total, conforme já evidenciado em outros estudos (KRIEGER *et al*., 2006; DINNIS *et al.,* 2006; KOROU *et al*., 2010; YANG *et al*., 2006). LIN e YIN (2008) referem que o papel hipolipemiante da NAC deve-se à diminuição na expressão de mRNA e atividade de três enzimas lipogênicas no fígado: HMGCoA redutase, enzima málica e ácido graxo sintase. Ao longo prazo, a melhora da proteinúria pode refletir-se também em um perfil lipídico mais adequado. Além disso, devido as suas propriedades antioxidantes a NAC pode favorecer a atividade da enzima lipoproteína lipase, o que contribui para redução da trigliceridemia (KRIEGER *et al*., 2006; DINNIS *et al.,* 2006; KOROU *et al*., 2010; YANG *et al*., 2006), embora este evento não tenha sido observado no presente estudo.

A glicemia foi maior no grupo C e no grupo com DRC, ambos tratados com NAC em comparação aos respectivos grupos não tratados. No entanto, o conteúdo total de AGE circulante e pentosidina foram menores nos animais com DRC tratados com NAC em comparação ao grupo DRC não tratado.

A NAC diminui a peroxidação lipídica (SHIMIZU *et al.*, 2005; ERDOGAN *et al.,* 2006), o que no presente estudo foi reiterado pela redução na concentração plasmática de TBARS. A diminuição do insulto oxidativo, por sua vez, contribui para reduzir a formação de produtos de glicoxidação, refletido pela menor concentração de AGE total e pentosidina no plasma dos animais DRC tratados com NAC.

O estresse oxidativo prevalente na DRC predispõe as reações de glicoxidação, com a formação de pentosidina e carboximetil-lisina, principalmente (KOYAMA, NISHIZAWA, 2010a,b). Estes AGE apresentam em sua formação a participação de reações de oxidação e, no caso da DRC, este é um dos principais contribuintes, uma vez que o estresse carbonila por excesso de substrato decorrente de hiperglicemia está ausente. O aceleramento do estresse oxidativo, junto com a diminuição da capacidade em remover superóxido, já se faz presente, logo em estágios recentes de DRC, devido, principalmente, a alterações nos componentes do sistema antioxidante (superóxido dismutase e GSH/GSSG), o que aumenta conforme a progressão da doença renal (NISHIZAWA *et al*.,2012).

Em camundongos knockout para apo E alimentados com dieta aterogênica, o tratamento com NAC foi capaz de estabilizar a placa aterosclerótica. Isso se deve à redução da infiltração de macrófagos na íntima e ao aumento do conteúdo de colágeno, embora não tenha sido observado efeito sobre o tamanho da lesão e o número de células musculares lisas (LU *et al.,* 2011). Em outro estudo, evidenciou-se que a NAC reduz a formação de lesão aterosclerótica por diminuir a geração de ROS, a expressão de CD-36 e a captação de LDL oxidada (SUNG *et al.*, 2012).

Após 60 dias de evolução da DRC, os animais apresentaram maior PAS em comparação aos animais C. Nos animais DRC tratados com NAC, a PAS foi menor em 17 % em comparação aos animais DRC. Neste aspecto, além de sua ação antioxidante, a NAC por meio de seu grupamento sulfidrila interage com

pontes dissulfeto na porção extracelular do receptor de angiotensina II (receptor AT1). Isto altera a estrutura do AT1, inibindo sua interação com a angiotensina II e o consequente efeito vasoconstritor, hipertensor (HEERDING *et al*., 2001; ULLIAN *et al*., 2005). Deste modo, a NAC, vem sendo usada como complemento às terapias anti-hipertensivas tradicionais por diminuir a PAS tanto *in vitro* como *in vivo* (VASDEV, SINGAL & GILL, 2009).

Os AGE também favorecem o aumento da PA, em parte por alterarem a reatividade vascular, bloquearem a ação do óxido nítrico e potencializarem a da endotelina (BIERHAUS *et al.*,1997). A interação AGE/RAGE proporciona efeito pró-inflamatório pela ativação de NF-KB; além disso, eleva a produção de AT1 o que exacerba a sinalização do sistema renina-angiotensina. Este, por sua vez, aumenta a produção de RAGE, o que cria um ciclo vicioso e vincula os AGE ao aumento da sinalização do sistema renina-angiotensina e estresse oxidativo advindo desta sinalização (STECKELINGS *et al*., 2009). A menor concentração plasmática de AGE nos animais DRC tratados com NAC também pode ter contribuído para a redução da PAS.

Como consequência do maior insulto glico-oxidativo na DRC, identificamos disfunção do retículo endoplasmático em macrófagos tratados com albumina-DRC, caracterizado pelo maior conteúdo de chaperonas (Grp 94 e PDI) que assistem o enovelamento proteico e direcionam as proteínas mal enoveladas para vias de degradação. No entanto, a NAC foi capaz de prevenir esse evento, devido à diminuição do estresse oxidativo e glicoxidativo, que provavelmente se traduz

em um melhor perfil da albumina sérica isolada dos animais DRC+NAC. MULLER *et al (*2013) evidenciaram que a NAC previne a modificação da PDI por reações carbonilas ou pela LDL oxidada e protege contra o estresse do RE.

O aumento do estresse do retículo endoplasmático, observado em macrófagos tratados com albumina-AGE ou isolada de portadores de diabete melito com controle glicêmico inadequado, vincula-se diretamente ao estresse oxidativo intracelular e ao menor conteúdo de ABCA-1 (de SOUZA PINTO *et al.,* 2011; CASTILHO *et al.,* 2012) Até o momento, não se sabe ao certo o que determina a redução do conteúdo proteico de ABCA-1, uma vez que sua diminuição independe de variação em seu mRNA. A inibição do sistema proteasomal parece ser capaz de prevenir a redução no conteúdo de ABCA-1, embora outros mecanismos de degradação pós-traducional possam estar envolvidos, incluindo autofagia lisossomal. Entretanto, não parece ocorrer o envolvimento de proteases de superfície celular, como calpaína, uma vez que sua inibição por calpeptina ou outros inibidores não é capaz de restaurar o conteúdo de ABCA-1 em células tratadas com albumina-AGE (IBORRA *et al.,* 2014). Qualquer que seja o mecanismo envolvido, ele tem por base o estresse de RE uma vez que o tratamento celular com chaperona química PBA que reduz esta condição é capaz de prevenir a redução do ABCA-1 e do efluxo de colesterol celular (CASTILHO *et al.,* 2012).

O PBA também foi capaz de prevenir completamente o estresse de RE em células endoteliais expostas ao soro de pacientes com DRC e na aorta de ratos com DRC (ZHOU *et al.,* 2012).

Há uma íntima associação entre o estresse de RE e o insulto inflamatório promovido pelo acúmulo intracelular de colesterol suscitado pela albumina-AGE. Neste aspecto, a albumina-AGE sensibiliza macrófagos ao estresse inflamatório induzido por calgranulina S100B ou lipopolissacarídeo, com maior secreção de IL-6, TNF, MCP-1 e VCAM por estas células. O meio condicionado advindo de células incubadas com albumina-AGE - enriquecido em citocinas - reduz o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol em macrófagos não estimulados, em comparação ao meio advindo de incubações com albumina não glicada, pobre em citocinas. Esses achados apontam para regulação parácrina entre macrófagos na íntima arterial, onde células previamente estimuladas por albumina-AGE modificam o fluxo de lípides em macrófagos recentemente diferenciados na íntima (OKUDA *et al.,* 2012).

A ação da albumina-DRC em reduzir o efluxo de colesterol ocorre mesmo na presença de partículas aceptoras de colesterol não modificadas (apo A-I obtida comercialmente e HDL_2 isolada de indivíduos saudáveis). Além disso, demonstramos previamente que a HDL isolada de animais urêmicos, embora apresente aumento em seu conteúdo proteico e lipídico (maior conteúdo de proteínas totais, colesterol total, triglicérides e fosfolípides) não perde sua

habilidade de remover colesterol de macrófagos, em comparação à HDL isolada de animais falso-operados.

A albumina-DRC+NAC reduziu o efluxo de colesterol mediado por apo A-I, o qual permaneceu 59 % menor em comparação à condição controle e foi semelhante ao observado em macrófagos tratados com albumina-DRC, mesmo não tendo elevado o estresse de RE nos macrófagos. Esse evento foi reflexo da diminuição no conteúdo de ABCA-1, que é o principal receptor que medeia a exportação do excesso de colesterol para apo A-I ou partículas nascentes de HDL (pré-βHDL).

Interessante notar que a NAC, por si, modula antagonicamente o conteúdo de ABCA-1 e ABCG-1 de forma dose-dependente. Até o momento, não existe na literatura nenhum estudo que explique a ação da NAC sobre os receptores ABCA-1 e ABCG-1 e investigações adicionais serão necessárias para esclarecer a ação da NAC sobre esses transportadores.

O ABCA-1 apresenta uma ou mais pontes dissulfeto que conectam suas alças extracelulares, as quais mantêm a integridade estrutural e funcional deste transportador. Considerando-se que a NAC é capaz de reduzir pontes dissulfeto, é possível que module negativamente o conteúdo de ABCA-1 por reduzir sua estabilidade na superfície celular.

A albumina-C+NAC aumentou 52 % o efluxo de colesterol mediado por HDL_2, o que foi acompanhado pelo maior conteúdo de ABCG-1, que é o principal receptor que medeia o efluxo de colesterol para partículas maduras de HDL. Nas

células tratadas com albumina-DRC+NAC também se observou maior conteúdo de ABCG-1. Embora as incubações com NAC isoladamente não tenham demonstrado aumento significativo no conteúdo de ABCG-1 parece haver uma tendência de elevação em seu conteúdo proteico.

A atividade de ABCA-1 e ABCG-1 são complementares. A exportação de colesterol para apo A-I e pré-beta HDL, por intermédio do ABCA-1, favorece a geração de partículas grandes de HDL as quais, subsequentemente, removem colesterol por interação com o ABCG-1 (CAVELIER *et al.,* 2006; GELISSEN *et al.,* 2006). Em modelos experimentais animais e em células cultivadas demonstra-se uma expressão compensatória entre estes receptores, ou seja, a ablação gênica de ABCA-1 é seguida por superexpressão de ABCG-1 e vice-versa (RANALLETTA *et al.,* 2006; JASMIN *et al.,* 2014; MEURS *et al.,* 2012; HSIEH *et al*., 2014). Este mecanismo é proposto como contribuinte para a contrarregulação do conteúdo de lípides na parede arterial. No entanto, invariavelmente aumento de aterosclerose é descrito em animais e humanos com mutação de ABCA-1 (BROOKS-WILSON *et al.*, 1999; BODZIOCH *et al.,* 1999; RUST *et al.,* 1999). Em nosso modelo experimental é ainda possível inferir que a redução no conteúdo de ABCA-1, induzida pela albumina C+NAC e DRC+NAC seja compensada pelo maior conteúdo de ABCG-1. Experimentos adicionais serão necessários para detalhar a ação da NAC sobre a estabilidade proteica e sobre o mRNA de ABCA-1 e ABCG-1.

Nossos achados evidenciam prejuízo no transporte reverso de colesterol em virtude da modificação *in vivo* da albumina na DRC, a qual também favorece o estresse de RE em macrófagos. Os efeitos da albumina-DRC ocorrem independentemente de alteração na concentração e composição da HDL e pode ser determinante ao risco de doença cardiovascular em indivíduos com DRC. Embora altere seletivamente os receptores de HDL, a NAC deve ter um amplo papel na aterogênese, além do observado no presente estudo, já que deve limitar a modificação oxidativa de LDL e, portanto, o aporte de colesterol aos macrófagos da íntima arterial.

7. CONCLUSÃO

A N-acetilcisteína reduz produtos de oxidação e glicação avançada no plasma de animais com DRC e previne o estresse de RE em macrófagos, induzido pela albumina isolada destes animais. Apesar de diminuir o conteúdo de ABCA-1 e o efluxo de colesterol mediado por apo A-I, a NAC aumenta o conteúdo de ABCG-1. Desta forma, a NAC pode contribuir para atenuar os efeitos deletérios da albumina modificada na DRC sobre o acúmulo lipídico em macrófagos, contribuindo para a prevenção da aterosclerose.

8. REFERÊNCIAS

ACOSTA-ALVEAR D, ZHOU Y, BLAIS A, TSIKITIS M, LENTS NH, ARIAS C, LENNON CJ, KLUGER Y, DYNLACHT BD. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. Mol Cell. Jul 6;27(1):53-66 (2007).

AMERI K, HARRIS AL.Activating transcription factor 4. Int J Biochem Cell Biol.;40(1):14-21 (2008).

ANRAKU M , KITAMURA K, SHINOHARA A, ADACHI M, SUENGA A, MARUYAMA T, MIYANAKA K, MIYOSHI T, SHIRAISHI N, NONOGUCHI H, OTAGIRI M, TOMITA K. Intravenous iron administration induces oxidation of serum albumin in hemodialysis patients. Kidney Int. Aug;66(2):841-8 (2004).

APOSTOLOV EO, RAY D, SAVENKA AV, SHAH SV, BASNAKIAN AG. Chronic Uremia Stimulates LDL Carbamylation and Atherosclerosis. J Am Soc Nephrol,21(11):1852-7(2010).

APPENZELLER-HERZOG C, ELLGAARD L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. Biochim Biophys Acta. Apr;1783(4):535-48 (2008).

ARAKAWA R, YOKOYAMA S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. J Biol Chem. 277(25):22426-22429 (2002).

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 renaldisease: a review.Clin Chem Lab Med, Apr 4:1-10 (2013).

ATTMAN PO, SAMUELSSON O, ALAUPOVIC P. Lipoprotein metabolism and renal failure. Am J Kidney Dis,21(6):573-92 (1993).

ATTMAN PO, SAMUELSSON O, JOHANSSON AC, MOBERLY JB, ALAUPOVIC P. Dialysis modalities and dyslipidemia.Kidney Int Suppl, (84):S110-2 (2003).

BALDÁN A, TARR P, LEE R, EDWARDS PA. ATP-binding cassette transporter G1 and lipid homeostasis. Curr Opin Lipidol. Jun;17(3):227-32. Review (2006).

BASTOS MG, KIRSZTAJN GM. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. J Bras Nefrol. Mar;33(1):93-108 (2011).

BASU SK, GOLDSTEIN JL, ANDERSON GW, BROWN MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America,73(9):3178-82 (1976).

BAYNES JW, THORPE SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. Diabetes,48(1):1-9 (1999).

BELLOSTA S, MAHLEY RW, SANAN DA, MURATA J, NEWLAND DL, TAYLOR JM, PITAS RE. Macrophage-specific expression of human apolipoprotein E reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E-null mice.J Clin Invest, 96(5):2170-9 (1995).

BERNIAKOVICH I,LARICCHIA-ROBBIO L, BELMONTE JCI. N-acetylcysteine protects induced pluripotent stem cells from in vitro stress: impact on differentiation outcome. Int. J. Dev. Biol. 56: 729-735 (2012).

BERG AH, DRECHSLER C, WENGER J, BUCCAFUSCA R, HOD T, KALIM S, RAMMA W, PARIKH SM, STEEN H, FRIEDMAN DJ, DANZIGER J, WANNER C, THADHANI R, KARUMANCHI SA. Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. Sci Transl Med. Mar 6;5(175):175ra29 (2013).

BIERHAUS A, CHEVION S, CHEVION M, HOFMANN M, QUEHENBERGER P, ILLMER T, LUTHER T, BERENTSHTEIN E, TRITSCHLER H, MÜLLER M, WAHL P, ZIEGLER R, NAWROTH PP. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. Diabetes. Sep;46(9):1481-90 (1997).

BOCAN TM, KRAUSE BR, ROSEBURY WS, MUELLER SB, LU X, DAGLE C, MAJOR T, LATHIA C, LEE H.The ACAT inhibitor avasimibe reduces macrophages and matrix metalloproteinase expression in atherosclerotic lesions of hypercholesterolemic rabbits. Arterioscler Thromb Vasc Biol,20(1):70-9 (2000).

BODZIOCH M, ORSÓ E, KLUCKEN J, LANGMANN T, BÖTTCHER A, DIEDERICH W, DROBNIK W, BARLAGE S, BÜCHLER C, PORSCH-OZCÜRÜMEZ M, KAMINSKI WE, HAHMANN HW, OETTE K, ROTHE G, ASLANIDIS C, LACKNER KJ, SCHMITZ G.The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. Nat Genet.Aug;22(4):347-51 (1999).

BOESGAARD S, ALDERSHVILE J, POULSEN HE, CHRISTENSEN S, DIGE-PETERSEN H, GIESE J. N-acetylcysteine inhibits angiotensin converting enzyme in vivo. J Pharmacol Exp Ther. Jun;265(3):1239-44 (1993).

BRO S, FLYVBJERG A, CJRISTOPH JB, CHRISTIAN AB, DENNER L, OLGAARD K, NIELSEN LB. A neutralizing antibody against receptor for advanced glycation end products (RAGE) reduces atherosclerosis in uremic mice. Atherosclerosis,201(2):274-80 (2008).

BROOKS-WILSON A,MARCIL M,CLEE SM, ZHANG LH, ROOMP K, VAN DAM M, YU L,BREWER C, COLLINS JA,MOLHUIZEN HO, LOUBSER O, OUELETTE BF,FICHTER K,ASHBOURNE-EXCOFFON KJ, SENSEN CW, SCHERER S, MOTT S,DENIS M,MARTINDALE D,FROHLICH J, MORGAN K, KOOP B,PIMSTONE S,KASTELEIN JJ,GENEST J JR,HAYDEN MR. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet. Aug;22(4):336-45 (1999).

BUNGERT S, MOLDAY LL, MOLDAY RS. Membrane topology of the ATP binding cassette transporter ABCR and its relationship to ABC1 and related ABCA transporters: identification of N-linked glycosylation sites. J Biol Chem. Jun 29;276(26):23539-46 (2001).

BUSCH M, FRANKE S, RÜSTER C, WOLF G. Advanced glycation end-products and the kidney. Eur J Clin Invest,40(8):742-55 (2010).

CAMPOS R, SHIMIZU MH, VOLPINI RA, DE BRAGANÇA AC, ANDRADE L, LOPES FD, OLIVO C, CANALE D, SEGURO AC. N-acetylcysteine prevents pulmonary edema and acute kidney injury in rats with sepsis submitted to mechanical ventilation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Apr 1;302(7):L640-50. (2012).

CANESTRARI F, GALLI F, GIORGINI A, ALBERTINI MC, GALIOTTA P, PASCUCCI M ET AL. Erythrocyte redox state in uremic anemia: effects of hemodialysis and relevance of glutathione metabolism. Acta Haematol;91:187–93 (1994).

CAO SS, KAUFMAN RJ. Unfolded protein response. Curr Biol. 21;22(16):R622-6 (2012).

CARRACEDO J, MERINO A, BRICEÑO C, SORIANO S, BUENDÍA P, CALLEROS L, RODRIGUEZ M, MARTÍN-MALO A, ALJAMA P, RAMÍREZ R. Carbamylated low-density lipoprotein induces oxidative stress and accelerated senescence in human endothelial progenitor cells. FASEB J, Apr;25(4):1314-22 (2011).

CARREIRO AB, MACHADO JT, MACHADO-LIMA A, IBORRA RT, PINTO RS,CASTILHO G, ROCHA JC, FUSCO FB, NAKANDAKARE ER, CATANOZI S,PASSARELLI M. Enhanced LDL uptake by mouse peritoneal macrophages induced by serum albumin isolated from diabetic or uremic rats. Clinics (2010).

CASTILHO G, OKUDA LS, PINTO RS, IBORRA RT, NAKANDAKARE ER, SANTOS CX, LAURINDO FR, PASSARELLI M. ER stress is associated with reduced ABCA-1 protein levels in macrophages treated with advanced glycated albumin - reversal by a chemical chaperone. Int J Biochem Cell Biol, Jul;44(7):1078-86 (2012).

CAVELIER C,LORENZI I,ROHRER L,VON ECKARDSTEIN A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. Biochim Biophys Acta. Jul;1761(7):655-66 (2006).

CHIANG CK, HSU SP, WU CT, HUANG JW, CHENG HT, CHANG YW, HUNG KY, WU KD, LIU SH. Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis. Mol Med,1;17(11-12):1295-305 (2011).

COLLINS AJ, MONDA KL, MOLONY JT, LI S, GILBERTSON DT, BRADBURY BD. Effect of facility-level hemoglobin concentration on dialysis patient risk of transfusion. Am J Kidney Dis. Jun;63(6):997-1006 (2014).

COSTET P, LUO Y, WANG N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. J Biol Chem. 8;275(36):28240-5 (2000).

COX JS, SHAMU CE, WALTER P.Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. Cell.18;73(6):1197-206 (1993).

CRAWFORD A, FASSETT RG, COOMBES JS, KUNDEI DA, AHUJAI KDK, ROBERTSON IK, BALL MJ, GERAGHTY DP. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant, Sep;26(9):2806-13 (2011).

DANILOVIC A, LUCON AM, SROUGI M, SHIMIZU MH, IANHEZ LE, NAHAS WC, SEGURO AC. Protective effect of N-acetylcysteine on early outcomes of deceased renal transplantation. Transplant Proc. Jun;43(5):1443-9 (2011).

DEFRONZO RA, TOBIN JD, ROWE JW, ANDRES R. Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to glucose and tissue sensitivity to insulin. J Clin Invest. Aug;62(2):425-35 (1978).

DE SAIN-VAN DER VELDEN MG, RABELINK TJ, REIJNGOUD DJ, GADELLAA MM, VOORBIJ HA, STELLAARD F, KAYSEN GA. Plasma alpha 2 macroglobulin is increased in nephrotic patients as a result of increased synthesis alone.Kidney Int,54(2):530-5 (1998).

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. May;47(5):443-50 (2012).

DEIGHAN CJ, CASLAKE MJ, MCCONNELL M, BOULTON-JONES JM, PACKARD CJ. Atherogenic lipoprotein phenotype in end-stage renal failure: origin and extent of small dense low-density lipoprotein formation. Am J Kidney Dis,35(5):852-62 (2000).

DICKHOUT JG, KREPINSKY JC. Endoplasmic reticulum stress and renal disease. Antioxid Redox Signal. Sep;11(9):2341-52 (2009).

DINIZ YS, ROCHA KK, SOUZA GA, GALHARDI CM, EBAID GM, RODRIGUES HG, NOVELLI FILHO JL, CICOGNA AC, NOVELLI EL: Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. Eur J Pharmacol, 543:151-157(2006).

DRÜEKE TB, NGUYEN KHOA T, MASSY ZA, WITKO-SARSAT V, LACOUR B, DESCAMPS-LATSCHA B. Role of oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerosis of uremia. Kidney Int Suppl,78:S114-9 (2001).

DYER DG, BLACKLEDGE JA, THORPE SR, BAYNES JW. Formation of pentosidine during nonen zymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. J Biol Chem; 266: 11654 11660 (1991).

DYER DG, DUNN JA, THORPE SR, BAILLIE KE, LYONS TJ, MCCANCE DR, BAYNES JW: accumulation of maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging . J Clin Invest, 91:2463-2469 (1993).

EFRATI S, AVERBUKH M, BERMAN S, FELDMAN L, DISHY V, KACHKO L, WEISSGARTEN J, GOLIK A, AVERBUKH Z. N Acetylcysteine ameliorates lithium induced renal failure in rats. Nephrol Dial Transplant. ;20(1):65-70 (2005).

ERDOGAN H, FADILLIOGLU E, YAGMURCA M, UÇAR M, IRMAK MK.Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine.Urol Res,Feb;34(1):41-6 (2006).

FASANO T, ZANONI P, RABACCHI C, PISCIOTTA L, FAVARI E, ADORNI MP, DEEGAN PB, PARK A, HLAING T, FEHER MD, JONES B, UZAK AS, KARDAS F, DARDIS A, SECHI A, BEMBI B, MINUZ P, BERTOLINI S, BERNINI F, CALANDRA S. Novel mutations of ABCA1 transporter in patients with Tangier disease and familial HDL deficiency. Mol Genet Metab. Nov;107(3):534-41 (2012).

FELDMAN L, SHANI M, SINUANI I, BEBERASHVILI I, WEISSGARTEN J.N-acetylcysteine may improve residual renal function in hemodialysis patients: a pilot study. Hemodial Int.Oct;16(4):512-6 (2012).

FORTE TM, BIELICKI JK, GOTH-GOLDSTEIN R, SELMEK J, MCCALL MR. Recruitment of cell phospholipids and cholesterol by apolipoproteins A-II and A-I: formation ofnascent apolipoprotein-specific HDL that differ in size, phospholipid composition, and reactivity with LCAT. J Lipid Res. Jan;36(1):148-57 (1995).

GARLICK RL, MAZER JS. The principal site of non-enzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. J Biol Chem, 258(10):6142-6 (1983).

GELISSEN IC, HARRIS M, RYE KA, QUINN C, BROWN AJ, KOCKX M, CARTLAND S, PACKIANATHAN M, KRITHARIDES L, JESSUP W. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Mar;26(3):534-40 (2006).

GLODNY B, NASSERI P, REHDER P, UNTERHOLZNER V, PLAIKNER M, KOPPELSTÄTTER C, PETERSEN J. Reduced glomerular filtration rate due to loss of nephron mass may be an independent risk factor for atherosclerosis.Nephrol Dial Transplant, 10 (2010).
GOLDWASSER P, FELDMAN J. Association of serum albumin and mortality risk. J Clin Epidemiol. Jun;50(6):693-703 (1997).

GRETEN J., KREIS I.,.WIESEL K, STIER E., SCHMIDT A. M., STERN D. M., RITZ E., WALDHERR R, NAWROTH P.P. receptors for advanced glycation end-products (AGE) expression by endothelial cells in non-diabetic uremic patients. Nephrol Dial Transplant,11(5):786-90 (1996).

GUO LL, PAN Y, JIN HM. Adiponectin is positively associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetic nephropathy and effects of angiotensin II type 1 receptor blocker losartan. Nephrol Dial Transplant. Jun;24(6):1876-83 (2009).

HARDING HP, ZHANG Y, ZENG H, NOVOA I, LU PD, CALFON M, SADRI N, YUN C, POPKO B, PAULES R, STOJDL DF, BELL JC, HETTMANN T, LEIDEN JM, RON D. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol Cell. Mar;11(3):619-33 (2003).

HARDING HP, NOVOA I, ZHANG Y, ZENG H, WEK R, SCHAPIRA M, RON D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell. Nov;6(5):1099-108 (2000).

HARDING HP, ZHANG Y, KHERSONSKY S, MARCINIAK S, SCHEUNER D, KAUFMAN RJ, JAVITT N, CHANG YT, RON D.Bioactive small molecules reveal antagonism between the integrated stress response and sterol-regulated gene expression. Cell Metab. Dec;2(6):361-71 (2005).

HAVEL RJ, EDER HA, BRAGDON JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.J Clin Invest, 34(9):1345-53 (1955).

HE CJ, KOSCHINSKY T, BUENTING C, VLASSARA H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. Mol Med,7(3):159-68 (2001).

HEERDING JN, HINES J, FLUHARTY SJ, YEE DK: Identification and function of disulfide bridges in the extracellular domains of the angiotensin type 2 receptor. Biochemistry 40:8369–8377(2001).

HEGAB. Z; GIBBONS. S; NEYSES. L; MAMAS MA. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. World Journal of Cardiology, 4(4): 90-102 (2012).

HENLE T, MIYATA T. Advanced glycation end products in uremia. Advances in renal replacement therapy,10(4):321-31(2003).

HOLT S, REEDER B, WILSON M, HARVEY S, MORROW JD, ROBERTS LJ 2ND, MOORE K. Increased lipid peroxidation in patients with rhabdomyolysis.Lancet,10;353(9160):1241 (1999).
HÖRL WH, COHEN JJ, HARRINGTON JT, MADIAS NE, ZUSMAN CJ. Atherosclerosis and uremic retention solutes. Kidney Int, 66(4):1719-31(2004).

HOSSAIN MA, TSUJITA M, AKITA N, KOBAYASHI F, YOKOYAMA S. Cholesterol homeostasis in ABCA1/LCAT double-deficient mouse. Biochim Biophys Acta. Dec;1791(12):1197-205 (2009).

HOSSEINJANI H, MOGHADDAS A,KHALILI H. N-acetylcysteine for the prevention of non-contrast media agent-induced kidney injury: from preclinical data to clinical evidence. Eur J Clin Pharmacol. Mar 19 (2013).

HOZOJI-INADA M, MUNEHIRA Y, NAGAO K, KIOKA N, UEDA K. Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. J Biol Chem. Jun 3;286(22):20117-24 (2011).

HSIEH V, KIM MJ, GELISSEN IC, BROWN AJ, SANDOVAL C, HALLAB JC, KOCKX M, TRAINI M, JESSUP W, KRITHARIDES L. Cellular cholesterol regulates ubiquitination and degradation of the cholesterol export proteins ABCA1 and ABCG1. J Biol Chem. Mar 14;289(11):7524-36 (2014).

HUANG JS, GUH JY, CHEN HC, HUNG WC, LAI YH, CHUANG LY. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling

pathwayin AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. J Cell Biochem.;81(1):102-13 (2001).

IBERG N, FLUCKIGERS R. Nonenzymatic glycosylation of albumin in vivo identification of multiple glycosylated sites. The Journal of Biological Chemistry,15;261(29):13542-5 (1986).

IBORRA RT, MACHADO-LIMA A, MACHADO JT, NAKANDAKARE ER, PASSARELLI M.Selective inhibition of proteasomal and lysosomal degradatin pathways partially prevent ABCA-1 reduction in macrophages induced by advanced glycated albumin.11º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo. pt46 (2014).

ISHIMITSU T, MURAYAMA N, MEGURO T, KAGEYAMA Y, OKADA K, OKUBO Y, TAKEDA S, HASEGAWA K, KIKEGAWA Y, OHWADA T, HOSOYA H, MINAMI J, ONO H, MATSUOKA H.Urinary excretions of albumin and type IV collagen in normotensive and hypertensive subjects. Hypertens Res. Sep;23(5):459-66 (2000).

IVANOVSKI O, SZUMILAK D, NGUYEN-KHOA T, RUELLAN N, PHAN O, LACOUR B, DESCAMPS-LATSCHA B, DRÜEKE TB, MASSY ZA. The antioxidant N-acetylcysteine prevents accelerated atherosclerosis in uremic apolipoprotein E knockout mice.Kidney Int.;67(6):2288-94 (2005).

JASMIN SB, PEARSON V, LALONDE D, DOMENGER D, THÉROUX L, POIRIER J.Differential regulation of ABCA1 and ABCG1 gene expressions in the remodeling mouse hippocampus after entorhinal cortex lesion and liver-X receptor agonist treatment.Brain Res.May 8;1562:39-51 (2014).

JBN – Jornal Brasileiro de Nefrologia vol.26.(3 suppl 1) nº 3 – Jul/Ago/Set . <http://www.jbn.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1183> acesso em 4/3/2014

JIANG J, CHEN P, CHEN J, YU X, XIE D, MEI C, XIONG F, SHI W, ZHOU W, LIU X, SUN S, ZHANG P, YANG X, ZHANG Y, ZHANG Y, LIANG X, ZHANG Z, LIN Q, YU Y, MIYATA T, TIAN J, LIANG M, LUO W, XU X, HOU F. Accumulation of tissue advanced glycation end products correlated with glucose exposure dose and associated with cardiovascular morbidity in patients on peritoneal dialysis. Atherosclerosis. Sep;224(1):187-94 (2012).

JONO T, KIMURA T, TAKAMATSU J, NAGAI R, MIYAZAKI K, YUZURIHA T, KITAMURA T, HORIUCHI S. Accumulation of imidazolone, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in hippocampal CA4 pyramidal neurons of aged human brain. Pathol Int. Sep;52(9):563-71 (2002).

KALOUSOVÁ M, JÁCHYMOVÁ M, MESTEK O, HODKOVÁ M, KAZDEROVÁ M, TESAR V, ZIMA T. Receptor for advanced glycation end products--soluble form

and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant, 22(7):2020-6 (2007).

KALOUSOVÁ M, ZIMA T, TESAR V, DUSILOVÁ-SULKOVÁ, SKRHA J. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. Mutation Research, 11;579(1-2):37-46 (2005).

KATO S, ITOH K, OCHIAI M, IWAI A, PARK Y, HATA S, TAKEUCHI K, ITO M, IMAKI J, MIURA S, YAKABI K, KOBAYASHI M.Increased pentosidine, an advanced glycation end-product, in urine and tissue reflects disease activity in inflammatory bowel diseases.J Gastroenterol Hepatol.Dec;23 Suppl 2:S140-5 (2008).

KHEDR E, EL-SHARKAWY M, ABDULWAHAB S, ELDIN EN, ALI M, YOUSSIF A, AHMED B. Effect of recombinant human erythropoietin on insulin resistance in hemodialysis patients. Hemodial Int. Jul;13(3):340-6 (2009).

KIMURA H, MIYAZAKI R, IMURA T, MASUNAGA S, SUZUKI S, GEJYO F, YOSHIDA H. Hepatic lipase mutation may reduce vascular disease prevalence in hemodialysis patients with high CETP levels. Kidney Int, 64(5):1829-37(2003).

KISLINGER T., FU C., HUBER B., QU W., TAGUCHI A., DU YAN S., HOFMANN M., YAN S.F., PISCHETSRIEDER M., STERN D., SCHIMIDT A. M. N(Epsilon)-(Carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. J Biol Chem,274(44):31740-9 (1999).

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Am J Kidney Dis; 39:(Suppl 2):S1-S246 (2002).

KOHARA K, TABARA Y, TACHIBANA R, NAKURA J, MIKI T. Microalbuminuria and arterial stiffness in a general population: the Shimanami Health Promoting Program (J-SHIPP) study. Hypertens Res. Jul;27(7):471-7 (2004).

KOROU, L.M., AGROGIANNIS, G., PANTOPOULOU, A., VLASHOS, I.S., ILIOPOULOS, D., KARATZA, T., PERREA,D.N. Comparative antilipemic effect of N-acetylcysteine and sesame oil administration in diet-induced hypercholesterolemic mice. Lipids Health Dis. 9, 23 (2010).

KOYAMA H, NISHIZAWA Y. Cardiovascular complications in renal failure: implications of advanced glycation end-products and their receptor, RAGE. In: Miyata T, Eckardt KU, Nangaku M, editors.Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice ‘Renal Disorders’. New York: The Humana Press／Springer Science (2010b).

KOYAMA H, NISHIZAWA Y.AGEs/RAGE in CKD: irreversible metabolic memory road toward CVD? Eur J Clin Invest. Jul;40(7):623-35 (2010a).

KRAUS LM, KRAUS AP JR. Carbamylation of amino acids and proteins in uremia. Kidney Int Suppl, 78:S102-7 (2001).

KRIEGER MH, SANTOS KF, SHISHIDO SM, WANSCHEL AC, ESTRELA HF, SANTOS L, DE OLIVEIRA MG, FRANCHINI KG, SPADARI-BRATFISCH RC, LAURINDO FR: Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. Nitric Oxide14:12-20 (2006).

KUMEDA Y,INABA M,SHOJ S,ISHIMURA E,INARIBA H,YABE S,OKAMURA M,NISHIZAWA Y. Significant correlation of glycated albumin, but not glycated haemoglobin, with arterial stiffening in haemodialysis patients with type 2 diabetes. Clin Endocrinol, 69(4):556-61 (2008).

LANDER HM, TAURAS JM, OGISTE JS, HORI O, MOSS RA, SCHMIDT AM.Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. J Biol Chem. Jul 11;272(28):17810-4 (1997).

LAURINDO FR, PESCATORE LA, FERNANDES DDE C. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis.Free Radic Biol Med May 1;52(9):1954-69 (2012).

LEE AH, IWAKOSHI NN, GLIMCHER LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. Mol Cell Biol. Nov;23(21):7448-59 (2003).

LI YQ, ZHANG ZX, XU YJ, NI W, CHEN SX, YANG Z, MA D.N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages by different mechanisms. Acta Pharmacol Sin. Mar;27(3):339-46 (2006).

LIANG K, KIM CH, VAZIRI ND. HMG-CoA reductase inhibition reverses LCAT and LDL receptor deficiencies and improves HDL in rats with chronic renal failure. Am J Physiol Renal Physiol.Mar;288(3):F539-44 (2005).

LIN CC, YIN MC: Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet. Br J Nutr, 99:37-43 (2008).

LINDNER A, CHARRA B, SHERRARD DJ, SCRIBNER BH. Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. N Engl J Med; 290: 697 701 (1974).

LIU J, ROSNER MH. Lipid abnormalities associated with end-stage renal disease. Semin Dial, 19(1):32-40 (2006).

LONGENECKER JC, KLAG MJ, MARCOVINA SM, LIU YM, JAAR BG, POWE NR, FINK NE, LEVEY AS, CORESH J. High lipoprotein(a) levels and small apolipoprotein(a) size prospectively predict cardiovascular events in dialysis patients. J Am Soc Nephrol. Jun;16(6):1794-802 (2005).

LOSKE C, NEUMANN A, CUNNINGHAM AM, NICHOL K, SCHINZEL R, RIEDERER P, MÜNCH G.Cytotoxicity of advanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress.J Neural Transm.105(8-9):1005-15 (1998).

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem,193(1):265-75 (1951).

LU Y, QIN W, SHEN T, DOU L, MAN Y, WANG S, XIAO C, LI J.The antioxidant N-acetylcysteine promotes atherosclerotic plaque stabilization through suppression of RAGE, MMPs and NF-κB in ApoE-deficient mice. J Atheroscler Thromb,18(11):998-1008 (2011).

MA Y, HENDERSHOT LM. The unfolding tale of the unfolded protein response. Cell. Dec 28;107(7):827-30 (2001).

MACHADO JT,CARREIRO AB, PINTO RS, GABRIELA CASTILHO G, ADRIANA MACHADO-LIMA A, OKUDA LS, IBORRA RT, JUSSARA C. ROCHA JC, FUSCO FB, NAKANDAKARE ER, CATANOZI S, PASSARELLI M.The reverse cholesterol transport system is not influenced by the HDL composition modification or the reduced macrophages ABCG-1 expression in chronic kidney disease rats.Clinics (2010).

MACHADO JT,PINTO RS, CASTILHO G, MACHADO-LIMA A, OKUDA LS, IBORRA RT, ROCHA JC, CARREIRO AB, SHIMIZU MHM, NAKANDAKARE ER, CATANOZI S, PASSARELLI M. Serum albumin from chronic kidney disease rats reduces macrophage reverse cholesterol transport. XVI International Symposium on Atherosclerosis ISA (2012).

MACHADO-LIMA A, IBORRA RT, PINTO RS, SARTORI CH, OLIVEIRA ER, NAKANDAKARE ER, STEFANO JT, GIANNELLA-NETO D, CORRÊA-GIANNELLA ML, PASSARELLI M. Advanced glycated albumin isolated from poorly controlled type 1 diabetes mellitus patients alters macrophage gene expression impairing ABCA-1-mediated reverse cholesterol transport. Diabetes Metab Res Rev. Jan;29(1):66-76 (2013).

MALAGUARNERA M, VACANTE M, RUSSO C, MALAGUARNERA G, ANTIC T, MALAGUARNERA L, BELLA R, PENNISI G, GALVANO F, FRIGIOLA A. Lipoprotein(a) in cardiovascular diseases. Biomed Res Int. 2013:650989 (2013).

MALHOTRA, J. D.; MIAO, H.; ZHANG, K.; WOLFSON, A.; PENNATHUR, S.; PIPE, S. W.;KAUFMAN, R. J. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.105:18525–18530; (2008).

MANTTARI M, TIULA E, ALIKOSKI T, MANNINEN V. Effects of hypertension and dyslipidemia on the decline in renal function. Hypertension.26:670–5 (1995).

MANOLESCU B, STOIAN I, ATANASIU V, BUSU C, LUPESCU O. Review article: The role of adipose tissue in uraemia-related insulin resistance. Nephrology (Carlton). Oct;13(7):622-8 (2008).

MARTINEZ, L.O., AGERHOLM-LARSEN, B., WANG, N., CHEN, W., TALL, A.R. Phosphorylation of a pest sequence in ABCA1 promotes calpain degradation and is reversed by ApoA-I. J Biol Chem; 278(39):37368-37374, (2003).

MASUDA D. [TG-rich lipoprotein metabolism and regulatory factors]. Nihon Rinsho. Sep;71(9):1514-6 (2013).

MATHUR S, DEVARAJ S, JIALAL I. Accelerated atherosclerosis, dyslipidemia, and oxidative stress in end-stage renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens,11(2):141-7 (2002).

MATSUYAMA Y, TERAWAKI H, TERADA T, ERA S. Albumin thiol oxidation and serum protein carbonyl formation are progressively enhanced with advancing stages of chronic kidney disease. Clin Exp Nephrol. Aug;13(4):308-15 (2009).

MAZZON E, BRITTI D, DE SARRO A, CAPUTI AP, CUZZOCREA S. Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats. Eur J Pharmacol 424:75–83 (2001).

MCCULLOUGH KD, MARTINDALE JL, KLOTZ LO, AW TY, HOLBROOK NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. Mol Cell Biol. Feb;21(4):1249-59 (2001).

MEERWALDT R , ZEEBREGTS CJ, NAVIS G, HILLEBRANDS JL, LEFRANDT JD, SMIT AJ. Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. Am J Kidney Dis. Jan;53(1):138-50 (2009).

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, 28(12):973-80 (2005).

MEURS I, LAMMERS B, ZHAO Y, OUT R, HILDEBRAND RB, HOEKSTRA M, VAN BERKEL TJ, VAN ECK M. The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. Atherosclerosis. Mar;221(1):41-7 (2012).

MILES LA, FLESS GM, LEVIN EG, SCANU AM, PLOW EF - A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein (a). Nature. 339: 301-3 (1989).

MIYATA T, FU MX, KUROKAWA K, VAN YPERSELE SC, THORPE SR, BAYNES JW. Autoxidation products of both carbohydrate and lipids are increased in uremic plasma: Is there oxidative stress in uremia. Kidney Int,54:1290-1295 (1998).

MIYATA T, KURIKAWA K, STRHOU C.V.P. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long term uremic complications. Kidney International,58:S120-S125 (2000).

MIYATA T, SAITO A, KUROKAWA K, SATRIHOU C.V.Y. Advanced glycation and lipoxidation end products: reactive carbonyla compounds-related uraemic toxicity. Nephrol Dial Transplant,16:S8-S11(2001).

MIYATA T, STRIHOU C.V.Y, KUROKAWA K, BAYNES J.W. Alterations in noenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of carbonyl stress in long term uremic complications. Kidney international, 55(2):389-99 (1999).

MIYATA T, UEDA Y, SHINZATO T, IIDA Y, TANAKA S, KUROKAWA K, DE STRIHOU CH, VAN YPERSELE MK. Accumulation of albumin-limked an free-pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. J Am Soc Nephrol,7(8):1198-206 (1996).

MIZUNO T, HAYASHI H, NAOI S, SUGIYAMA Y. Ubiquitination is associated with lysosomal degradation of cell surface-resident ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) through the endosomal sorting complex required for transport pathway. Hepatology. Aug;54(2):631-43 (2011).

MOESTRUP SK, NIELSEN LB. The role of the kidney in lipid metabolism. Curr Opin Lipidol. 16(3):301-6 (2005).

MONNIER VM, CERAMI A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long lived proteins. Science; 211: 491 493 (1981).

MOODY WE,EDWARDS NC,CHUE CD,FERRO CJ,TOWNEND JN. Arterial disease in chronic kidney disease. Heart. Mar;99(6):365-72 (2013).

MORADI H, PAHL MV, ELAHIMEHR R, VAZIRI ND. Impaired antioxidant activity of high-density lipoprotein in chronic kidney disease. Transl ResFeb;153(2):77-85 (2009a).

MORADI H, YUAN J, NI Z, NORRIS K, VAZIRI ND. Reverse Cholesterol Transport Pathway in Experimental Chronic Renal Failure. Am J Nephrol, 24;30(2):147-154 (2009b).

MORSE E, SCHROTH J, YOU YH, PIZZO DP, OKADA S, RAMACHANDRARAO S, VALLON V, SHARMA K, CUNARD R. TRB3 is stimulated in diabetic kidneys, regulated by the ER stress marker CHOP, and is a suppressor of podocyte MCP-1. Am J Physiol Renal Physiol. Nov;299(5):F965-72 (2010).

MOUEDDEN ME, MEERT TF. Pharmacological evaluation of opioid and non-opioid analgesics in a murine bone cancer model of pain. Pharmacol Biochem Behav. Mar;86(3):458-67 (2007).

MUKHERJEE T. K., MUKHOPADHYAY S., HOIDAL J. R. The role of reactive oxygen species in tnfalpha-dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells. Biochim Biophys Acta,30;1744(2):213-23 (2005).

MULLER C, BANDEMER J, VINDIS C, CAMARÉ C, MUCHER E, GUÉRAUD F, LARROQUE-CARDOSO P, BERNIS C, AUGE N, SALVAYRE R, NEGRE-SALVAYRE A. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. Antioxid Redox Signal. Mar 1;18(7):731-42 (2013).

NISHIZAWA Y, KOYAMA H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products and cardiovascular disease in end-stage renal disease. J Ren Nutr. Jan;18(1):76-82 (2008).

NISHIZAWA Y,KOYAMA H,INABA M.AGEs and cardiovascular diseases in patients with end-stage renal diseases. J Ren Nutr. Jan;22(1):128-33 (2012).

NIWA T, TSUKUSHI S. 3deoxyglucosone And Ages In Uremic Complications: Inactivation Of Glutathione Peroxidase By 3- Deoxyglucosone. Kidney Int. Suppl,78:S37-41 (2001).

OCAK S, GORUR S, HAKVERDI S, CELIK S, ERDOGAN S. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester, vitamin C,vitamin E and N-acetylcysteine on vancomycin-induced nephrotoxicityin rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 100:328–333 (2007).

OGURA M, AYAORI M, TERAO Y, HISADA T, IIZUKA M, TAKIGUCHI S, UTO-KONDO H, YAKUSHIJI E, NAKAYA K, SASAKI M, KOMATSU T, OZASA H,

OHSUZU F, IKEWAKI K. Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages in vitro and in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Sep;31(9):1980-7 (2011).

OHASHI R, MU H, WANG X, YAO Q, CHEN C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. QJM. Dec;98(12):845-56 (2005).

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric and reaction. Anal Biochem,95:351-358 (1979).

OHKAWARA E, NOHARA Y, KANNO Y, SUZUKI H, MATSUMOTO G, KINOSHITA T, WATANABE M. Fructosamine assay using albumin extracted from serum.Biol Pharm Bull,25(9):1121-4 (2002).

OK E, BASNAKIAN AG, APOSTOLOV EO, BARRI YM, SHAH SV. Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease. Kidney Int,68(1):173-8 (2005).

OKUDA LS, CASTILHO G, ROCCO DD, NAKANDAKARE ER, CATANOZI S, PASSARELLI M. Advanced glycated albumin impairs HDL anti-inflammatory activity and primes macrophages for inflammatory response that reduces reverse cholesterol transport. Biochim Biophys Acta. Dec;1821(12):1485-92 (2012).

ORAM, J.F., VAUGHAN, A.M., ATP-binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. Circ Res; 99:1031-1043 (2006).

OYADOMARI S, MORI M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. Cell Death Differ. Apr;11(4):381-9. Review (2004).

PACHE DE FARIA GUIMARAES L, SEGURO AC, SHIMIZU MH, LOPES NERI LA, SUMITA NM, DE BRAGANÇA AC, APARECIDO VOLPINI R, CUNHA SANCHES TR,MACAFERRI DA FONSECA FA, MOREIRA FILHO CA, VAISBICH MH.Nacetylcysteine is associated to renal function improvement in patients with nephropathic cystinosis. Pediatr Nephrol. Jun;29(6):1097-102 (2014).

PAGEON H, BAKALA H, MONNIER VM, ASSELINEAU D. Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro. Eur J Dermatol.Jan-Feb;17(1):12-20 (2007).

PAPANASTASIOU P, GRASS L, RODELA H, PATRIKAREA A, OREOPOULOS D, DIAMANDIS EP. Immunological quantification of advanced glycosylation end-products in the serum of patients on hemodialysis or CAPD. Kidney Int.Jul;46(1):216-22 (1994).

PASSARELLI M, CATANOZI S,NAKANDAKARE ER,ROCHA JC, MORTON RE, SHIMABUKURO AF, QUINTÃO EC. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and "in vitro" glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from hdl to apo-b-containing lipoproteins. Diabetologia,40(9):1085-93 (1997).

PEREIRA LV, SHIMIZU MH, RODRIGUES LP, LEITE CC, ANDRADE L, SEGURO AC. N-acetylcysteine protects rats with chronic renal failure from gadolinium-chelate nephrotoxicity. PLoS One.;7(7):e39528 (2012).

PINTO RS, MACHADO AP, PAIM BA, VERCESI AE, NAKANDAKARE ER, QUINTÃO ECR, PASSARELLI M. Intracellular oxidative stress induced by advanced glycated albumin reduces ABCA-1, ABCG-1 and increases rage and cd-36 expression. Diabetes,56(1), A191 (2007).

POWELL SR, MCCAY PB. Inhibition of doxorubicin-induced membrane damage by N-acetylcysteine: possible mediation by a thiol-dependent, cytosolic inhibitor of lipid peroxidation, Toxicol. Appl. Pharmacol. 96 175–184 (1988).

QUINTÃO EC, Medina WL, Passarelli M. Reverse cholesterol transport in diabetes mellitus.Diabetes Metab Res Rev,16(4):237-50 (2000).

RANALLETTA M, WANG N, HAN S, YVAN-CHARVET L, WELCH C, TALL AR. Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Oct;26(10):2308-15 (2006).

RAO AM, BITLA AR, REDDY EP, SIVAKUMAR V, SRINIVASA RAO PV. Lipid abnormalities, lipoprotein (a) and apoprotein pattern in non-dialyzed patients with chronic kidney disease. Indian J Clin Biochem. 25(1):47-50 (2010).

REDGRAVE TG, ROBERTS DC, WEST CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation.Anal Biochem,12;65(1-2):42-9 (1975).

ROMÃO JR JE, PINTO SWL, CANZIANI ME, PRAXEDES JN, SANTELLO JL, MOREIRA JCM - CENSO SBN 2002: Informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil.J Bras nefrol 25:188-199,(2003).

ROMÃO JÚNIOR, J.E. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. J. Bras. Nefrol., v.26, n.3, supl.1, p.1-3, (2004).

RÖHRL C, EIGNER K, WINTER K, KORBELIUS M, OBROWSKY S, KRATKY D, KOVACS WJ, STANGL H. Endoplasmic reticulum stress impairs cholesterol efflux and synthesis in hepatic cells. J Lipid Res.Jan;55(1):94-103 (2014).

ROSEBURY WS, REKHTER MD, HICKS GW, BRAMMER DW, HALLAK H, KINDT E, CHEN J, ANDERSON MK, KUIPERS PJ, RYAN MJ.Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma : local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture.Circ Res, 7-21;86(1):101-8 (2000).

RUST S, ROSIER M, FUNKE H, REAL J, AMOURA Z, PIETTE JC, DELEUZE JF, BREWER HB, DUVERGER N, DENÈFLE P, ASSMANN G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. Nat Genet. Aug;22(4):352-5 (1999).

SALVAYRE A. Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins. Antioxid Redox Signal. Mar 1;18(7):731-42 (2013).

SAMUNI Y, GOLDSTEIN S, DEAN OM, BERK M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. Biochim Biophys Acta. Apr 22;1830(8):4117-4129. (2013).

SATAKE R, KOZUTSUMI H, TAKEUCHI M, ASANO K. Chemical modification of erythropoietin: na increase in vitro activity by guanidination. Biochim Biophys Acta, 38(1):125-9 (1990).

SCHAEFFNER ES, KURTH T, CURHAN GC, GLYNN RJ, REXRODE KM, BAIGENT C, ET AL. Cholesterol and the risk of renal dysfunction in apparently healthy men. J Am Soc Nephrol.14:2084–91 (2003).

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

SCHWEDLER S, SCHINZEL R, VAITH P, WANNER C. Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or casual relationship? Kidney Int,59:S32-S36 (2001).

SELL DR, MONNIER M. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. J Biol Chem, 264:21597-21602 (1989).

SELVIN, E; FRANCIS, LMA; BALLANTYNE, CM; HOOGEVEEN, RC; CORESH, J; BRANCATI, FL; STEFES, MW. Nontraditional Markers of Glycemia: Associations with microvascular conditions. Diabetes Care 34:960-967 (2011).

SHALANSKY SJ, PATE GE, LEVIN A, WEBB JG. N-acetylcysteine for prevention of radiocontrast induced nephrotoxicity: the importance of dose and route of administration. Heart. Aug;91(8):997-9 (2005).

SHIMADA K, MURAYAMA T, YOKODE M, KITA T, UZUI H, UEDA T, LEE JD, KISHIMOTO C. N-acetylcysteine reduces the severity of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by reducing superoxide production. Circ J.;73(7):1337-41 (2009).

SHIMIZU MH, COIMBRA TM, DE ARAUJO M, MENEZES LF, SEGURO AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. Kidney Int, 68:2208-17 (2005).

SHIMIZU MH, DANILOVIC A, ANDRADE L, VOLPINI RA, LIBÓRIO AB, SANCHES TR, SEGURO AC. N-acetylcysteine protects against renal injury following bilateral ureteral obstruction. Nephrol Dial Transplant. oct;23(10):3067-73. (2008).

SHIMIZU MH, VOLPINI RA, DE BRAGANÇA AC, CAMPOS R, CANALE D, SANCHES TR, ANDRADE L, SEGURO AC. N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. Exp Gerontol. Feb;48(2):298-303. (2013).

SHIRAI S, OMINATO M, SHIMAZU T. Imbalance between production and scavening of hydroxyl radicals in patients mainted on hemodialysis. Clin Exp Nephrol,9: 310-314 (2005).

SHOJI T, ET AL: Atherogenic lipoprotein changes in the absence of hyperlipidemia in patients with chronic renal failure treated by hemodialysis. Atherosclerosis; 131: 229–236 (1997).

SHURRAW S, HEMMELGARN B, LIN M, MAJUMDAR SR, KLARENBACH S, MANNS B, BELLO A, JAMES M, TURIN TC, TONELLI M; ALBERTA KIDNEY DISEASE NETWORK. Association between glycemic control and adverse outcomes in people with diabetes mellitus and chronic kidney disease: a population-based cohort study. Arch Intern Med. Nov 28;171(21):1920-7 (2011).

SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. Oct;150(1):76-85 (1985).

SRIVASTAVA S., DIXIT BL., CAI J., SHARMA S., HURST HE., BHATNAGAR A., SRIVASTAVA SK., Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal (HNE) in rat erythrocytes: role of aldose reductase, Free Radic. Biol. Med. 29 642–651 (2000).

SRIVASTAVA S., WATOWICH SJ., PETRASH JM., SRIVASTAVA SK., BHATNAGAR A., Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase, Biochemistry 38 42–54 (1999).

STECKELINGS, U. M., ROMPE, F., KASCHINA, E., & UNGER, T. The evolving story of the RAAS in hypertension, diabetes and CV disease: moving from macrovascular to microvascular targets.Fundamental and Clinical Pharmacology, 23(6), 693–703 (2009).

STENVINKEL P, ALVESTRAND A. Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy. Semin Dial. Sep-Oct;15(5):329-37. Review. (2002).

SUNG HJ, KIM J, KIM Y, JANG SW, KO J.N-acetyl cysteine suppresses the foam cell formation that is induced by oxidized low density lipoprotein via regulation of gene expression. Mol Biol Rep.Mar;39(3):3001-7 (2012).

TAGUCHI A, BLOOD DC, DEL TORO G, CANET A, LEE DC, QU W, TANJI N, LU Y, LALLA E, FU C, HOFMANN MA, KISLINGER T, INGRAM M, LU A, TANAKA H, HORI O, OGAWA S,STERN DM, SCHMIDT AM. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. Nature, May 18;405(6784):354-60 (2000).

TALL AR.CETP inhibitors to increase HDL cholesterol levels. N Engl J Med. Mar 29;356(13):1364-6 (2007).

TAM LS, SHANG Q, LI EK, WONG S, LI RJ, LEE KL, LEUNG YY, YING KY, YIM CW, KUN EW, LEUNG MH, LI M, LI TK, ZHU TY, CHUI RK, TSEUNG L, YU SL, KUAN WP, YU CM. Serum soluble receptor for advanced glycation end products levels and aortic augmentation index in early rheumatoid arthritis--a prospective study.Semin Arthritis Rheum. Feb;42(4):333-45 (2013).

TARLING EJ. Expanding roles of ABCG1 and sterol transport. Curr Opin Lipidol. Apr;24(2):138-46 (2013).

TEPEL M. A major vascular risk factor: mild impairment of renal function.MMW Fortschr Med,10;145(15):51-2 (2003).

THORNALLEY PJ. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. Ann N Y Acad Sci. Jun;1043:111-7 (2005).

TOJO A, ONOZATO ML, KURIHARA H, SAKAI T, GOTO A, FUJITA T. Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. Hypertens Res. May;26(5):413-9 (2003).

TOZAWA M, ISEKI K, ISEKI C, OSHIRO S, IKEMIYA Y, TAKISHITA S. Triglyceride, but not total cholesterol or low-density lipoprotein cholesterol, levels predicts development of proteinuria. Kidney Int.62:1743–9 (2002).

TSUKANO H, GOTOH T, ENDO M, MIYATA K, TAZUME H, KADOMATSU T, YANO M, IWAWAKI T, KOHNO K, ARAKI K, MIZUTA H, OIKE Y. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques.Arterioscler Thromb Vasc Biol. Oct;30(10):1925-32 (2010).

ULLIAN ME,GELASCO AK, FITZGIBBON WR,BECK CN, MORINELLI TA. N-Acetylcysteine Decreases Angiotensin II Receptor Binding in Vascular Smooth Muscle Cells J Am Soc Nephrol 16: 2346–2353 (2005).

VASDEV S, SINGAL P, GILL V. The antihypertensive effect of cysteine. Int J Angiol. Spring;18(1):7-21 (2009).

VAZIRI ND – Oxidative stress in uremia:Nature, mechanisms, and potential consequences. Semin Nephrol.24:469-473 (2004).

VAZIRI ND. Causes of dysregulation of lipid metabolism in chronic renal failure.Semin Dial, 22(6):644-51 (2009).

VAZIRI ND. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease.J Ren Nutr, 20(5 Suppl):S35-43 (2010).

VAZIRI ND, LIANG KH. Hepatic HMG-COA reductase gene expression during the course of puromycin-induced nephrosis. Kidney Int, 48(6):1979-85(1995).

VAZIRI ND, LIANG KH Down-regulation of hepatic LDL receptor expression in experimental nephrosis. Kidney Int. Sep;50(3):887-93 (1996).

VAZIRI ND, LIANG K. Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure. Kidney Int. Mar;51(3):913-9 (1997).

VAZIRI ND, LIANG K. ACAT inhibition reverses LCAT deficiency and improves plasma HDL in chronic renal failure. Am J Physiol Renal Physiol.Nov;287(5):F1038-43 (2004).

VAZIRI ND, MORADI H. Mechanisms of dyslipidemia of chronic renal failure. Hemodialysis, 10(1):1-7 (2006).

VAZIRI ND, NORRIS K. Lipid disorders and their relevance to outcomes in chronic kidney disease.Blood Purif, 31(1-3):189-96 (2011).

VAZIRI ND, ROBERTS CK, LIANG K, BARNARD RJ, KIM CH. HMG-CoA reductase, cholesterol 7alpha-hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X.Kidney Int, 66(4):1503-11 (2004).

VLASSARA H, URIBARRI J, FERRUCCI L, CAI W, TORREGGIANI M, POST JB, ZHENG F, STRIKER GE. Identifying advanced glycation end products as a major source of oxidants in aging: implications for the management and/or prevention of reduced renal function in elderly persons. Semin Nephrol. Nov;29(6):594-603 (2009).

VOGT L, LAVERMAN GD, VAN TOL A, GROEN AK, NAVIS G, DULLAART RP. Cellular cholesterol efflux to plasma from proteinuric patients is elevated and remains unaffected by antiproteinuric treatment. Nephrol Dial Transplant. Jan;21(1):101-6 (2006).

WANG HZ, PENG ZY, WEN XY, RIMMELÉ T, BISHOP JV, KELLUM JA. N-acetylcysteine is effective for prevention but not for treatment of folic acid-induced acute kidney injury in mice. Crit Care Med 39:2487–2494 (2011).

WANG S, GULSHAN K, BRUBAKER G, HAZEN SL, SMITH JD. ABCA1 Mediates Unfolding of Apolipoprotein AI N Terminus on the Cell Surface Before Lipidation and Release of Nascent High-Density Lipoprotein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Jun;33(6):1197-205 (2013).

WANG Y, ORAM JF. Unsaturated fatty acids phosphorylate and destabilize ABCA1 through a phospholipase D2 pathway. J Biol Chem. Oct 28;280(43):35896-903 (2005).

WANG, N., CHEN, W., LINSEL-NITSCHKE, P., MARTINEZ, L.O., AGERHOLM-LARSEN, B., SILVER, D.L., TALL, A.R. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by ApoA-I. J Clin Invest; 111(1):99-107 (2003).

WANNER C, KRANE V. Uremia-specific alterations in lipid metabolism. Blood Purif, 20(5):451-3 (2002).

WAUTIER J. L., ZOUKORIAN C., CHAPPEY O., WAUTIER M. P., GUILLAUSSEAU P. J., CAO R., HORI O., STERN D., SCHIMIDT A. M. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. J Clin Invest,1;97(1):238-43 (1996).

WAUTIER MP, CHAPPEY O, CORDA S, STERN DM, SCHMIDT AM, WAUTIER JL. Ctivation of NADPH oxidase by age links oxidant stress to altered gene expression via rage. Am J Physiol Endocrinol Metab, 280(5):E685-94 (2001).

WEISGRABER KH, INNERARITY TL, MAHLEY RW. Role of lysine residues of plasma lipoproteins in high affinity binding to cell surface receptors on human fibroblasts. J Biol Chem, 25;253(24):9053-62 (1978).

WILLIAMS ME, GARG R. Glycemic management in ESRD and earlier stages of CKD.Am J Kidney Dis. Feb;63(2 Suppl 2):S22-38 (2014).

WINNIE C.R, FRANKE S, SOMMER M, HENLE T, STEIN G. Differences in the modulating potential of advanced glycation end products peptides versus age proteins.Kidney Int,78:S63-6 (2001).

WITKO-SARSAT V, NGUYEN KHOA T, JUNGERS P, DRÜEKE T, DESCAMPS-LATSCHA B. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. Adv Nephrol Necker Hosp. ;28:321-41 (1998).

WRÓBLEWSKA M. The origin and metabolism of a nascent pre-β high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux. Acta Biochim Pol.;58(3):275-85 (2011).

XIE Z, BABA SP, SWEENEY BR, BARSKI OA.Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: from chemistry to clinical implications. Chem Biol Interact. Feb 25;202(1-3):288-97 (2013).

YAMAGATA K, ISHIDA K, SAIRENCHI T, TAKAHASHI H, OHBA S, SHIIGAI T, ET AL. Risk factors for chronic kidney disease in a community based population: a 10-year follow-up study. Kidney Int.71:155–66(2007).

YANG R, LE G, LI A, ZHENG J, SHI Y.Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. Nutrition.Nov-Dec;22(11-12):1185-91(2006).

YAO S, MIAO C, TIAN H, SANG H, YANG N, JIAO P, HAN J, ZONG C, QIN S. Endoplasmic reticulum stress promotes macrophage-derived foam cell formation by up-regulating cluster of differentiation 36 (CD36) expression. J Biol Chem. Feb 14;289(7):4032-42 (2014).

YONEKURA H, YAMAMOTO Y, SAKURAI S, PETROVA RG, ABEDIN MJ, LI H, YASUI K, TAKEUCHI M, MAKITA Z, TAKASAWA S, OKAMOTO H, WATANABE T, YAMAMOTO H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. Biochem J. 15;370:1097-109 (2003).

YOSHIDA H, HAZE K, YANAGI H, YURA T, MORI K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional

induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. J Biol Chem. Dec 11;273(50):33741-9 (1998).

YOSHIDA H, MATSUI T, YAMAMOTO A, OKADA T, MORI K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell.Dec 28;107(7):881-91 (2001).

ZAFARULLAH M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cell Mol Life Sci. 60:6-20 (2003).

ZHOU QG, FU XJ, XU GY, CAO W, LIU HF, NIE J, LIANG M, HOU FF. Vascular insulin resistance related to endoplasmic reticulum stress in aortas from a rat model of chronic kidney disease. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Nov 1;303(9):H1154-65 (2012).

ZHOU H, TAN KC, SHIU SW, WONG Y. Cellular cholesterol efflux to serum is impaired in diabetic nephropathy. Diabetes Metab Res Rev. Nov-Dec;24(8):617-23 (2008).

ZHU R, OU Z, RUAN X, GONG J. Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (review). Mol Med Rep ;5(4):895-900 (2012).

ZINSZNER H, KURODA M, WANG X, BATCHVAROVA N, LIGHTFOOT RT, REMOTTI H, STEVENS JL, RON D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev. Apr 1;12(7):982-95 (1998).