Rodrigo Tallada Iborra

**Glicação avançada em macrófagos diminui o
conteúdo dos receptores de HDL - ABCA-1 e ABCG-1 -
e induz acúmulo intracelular de 7-cetocolesterol**

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Prof. Dra. Edna Regina Nakandakare

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Iborra, Rodrigo Tallada

Glicação avançada em macrófagos diminui o conteúdo dos receptores de HDL – ABCA-1 e ABCG-1 – e induz acúmulo intracelular de 7-cetocolesterol / Rodrigo Tallada Iborra. -- São Paulo, 2011.

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

Orientadora: Edna Regina Nakandakare.

Descritores: 1.Colesterol 2.Cetocolesterol 3.Macrófagos 4.Produutos finais de glicação avançada 5.Transportadores de cassetes de ligação de ATP

USP/FM/DBD-318/11

Este estudo foi realizado no Laboratório de Lípidos (LIM 10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, com a colaboração do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Este projeto foi desenvolvido com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - Bolsa de Doutorado (processo 2007/59710-6).

Dedico este trabalho a meus maravilhosos pais, Maria Carmen e Emilio, que foram a base sólida da minha vida, sempre me apoiando nos momentos decisivos e me confortando nos momentos mais difíceis. Aos melhores irmãos que alguém pode ter: Maria Carmen, Helena e Emilio meus exemplos e companheiros de toda a vida. A minha anja e esposa, Renata, que me abriu os olhos para a ciência, o coração para o amor e me deu o maior de todos os presentes. Ao nosso anjinho Rodrigo, que chegou no meio desta tese e me trouxe felicidade e amor além da compreensão.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar à minha eterna e querida orientadora, Dra. Marisa Passarelli, exemplo de mãe e pesquisadora, obrigado pela ajuda, paciência, orientação e amizade nestes 9 anos de Laboratório de Lípidos.

À Dra. Edna Nakandakare pela paciência, por sua orientação, apoio e imprescindível ajuda nos momentos difíceis deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eder Quintão por toda ajuda durante o trabalho e por nos inspirar com seu amor e entusiasmo pela ciência.

À Dra. Dulcinéia P. Abdalla pelo apoio na cromatografia e ajuda na qualificação

À Dra Maria Lúcia Correia Gianella pela ajuda na qualificação.

À Valéria S. Nunes pela ajuda na cromatografia, por tudo que me ajudou e ensinou desde que entrei no laboratório e pela amizade.

Às minhas amigonas e irmãs do laboratório Adriana Machado e Fabiana Ferreira pelo apoio e ajuda incondicionais nos momentos difíceis e pela excelente convivência e amizade dentro e fora do Lab.

Aos meus grandes amigos e parceiros de ABCA-1, Gabriela Castilho, Ligia Okuda, Raphael Pinto, “entre géis e citômetros salvaram-se todos”. Muitíssimo obrigado pela amizade e ajuda.

Aos queridos amigos e parceiros que nunca saem antes do pôr do sol, Sergio Catanozi, Fernanda Fusco e Jussara Rocha, muitíssimo obrigado.

Aos queridos caçulas “que só me dão trabalho” Juliana Tironi, Karina Souza, Diego Gomes, Paula Ramos, Tatiana Venancio, Maria Olívia Milessa e Mila Alvarenga, vocês revitalizaram o laboratório com sua energia e vontade de aprender. Desejo todo o sucesso do mundo.

À Rosibel Silva, por sempre manter nossos materiais e laboratório em ordem.

À Claudia de Souza e Senária Eguti e pela ajuda administrativa e por sua amizade incondicional.

À todos os amigos do LIM -10, Camila Sartori, Ana Maria, Dra. Mônica Neves, Patricia Cazita, Dr. Simão Lottenberg, Dr. Ísio Schulz, Renata Bombo Roberta Machado e Maria Silvia, que direta ou indiretamente ajudaram neste trabalho.

À Cida e a Rosana da secretaria da pós graduação da endocrinologia.

Às amigas do NEAD, Márcia Nery, Márcia Queiroz, Joyce, Michele e Cida.

A todos que passaram pelo Laboratório de Lípidos nos últimos anos e contribuíram de alguma maneira na minha vida.

À FAPESP e à Fundação Faculdade de Medicina pelo apoio financeiro, que me deu tranquilidade para realizar este trabalho da melhor maneira possível.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Óxidos de colesterol	1
Óxidos de colesterol e homeostase celular do colesterol.....	6
Diabete melito, glicação avançada e aterosclerose	17
OBJETIVO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
Obtenção de Lipoproteínas	23
Oxidação das LDL	24
Cultura de macrófagos da linhagem J774.....	24
Tratamento de macrófagos	25
Extração dos lípides celulares	26
Determinação do conteúdo de colesterol total e óxidos de colesterol por cromatografia gasosa.....	27
Determinação do conteúdo de ABCA-1 e ABCG-1 por imunoblot	31
Teste de viabilidade celular	32
Análise estatística	33
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	53

**“Se eu ví um pouco mais longe foi por estar
sobre os ombros de gigantes”.**

Isaac Newton

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos óxidos de colesterol de origem não enzimática.....	3
Figura 2 - Estrutura química dos óxidos de colesterol de origem enzimática.....	4
Figura 3 - Homeostase do colesterol celular.....	9
Figura 4 - Regulação do conteúdo de esteróis em macrófagos.....	12
Figura 5 - Glicação não enzimática.....	18
Figura 6 - Protocolo experimental.....	26
Figura 7 - Cromatograma com o pico do padrão interno (5 α -colestano) e com o tempo de retenção (min) dos padrões de colesterol e óxidos de colesterol.....	29
Figura 8 - Conteúdo total de esteroides (colesterol + óxidos de colesterol) em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas).....	36
Figura 9 - Conteúdo de colesterol total em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas).....	37
Figura 10 - Conteúdo de 7-cetocolesterol em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas).....	38
Figura 11 - Conteúdo de ABCA-1 em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas).....	41
Figura 12 - Conteúdo de ABGA-1 em macrófagos sem incubação de LDL oxidada (sem LDLox; barra hachurada), macrófagos controles (C; barra cinza) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barra preta).....	43
Figura 13 - Conteúdo de ABCG-1 em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de retenção e relação massa por carga (m/z) dos padrões de colesterol e óxidos de colesterol.....	30
Tabela 2 - Conteúdo de óxidos de colesterol e colesterol total (ng/μg de proteína ± DP) nas LDL oxidadas (LDLox) e HDL utilizadas nos experimentos.....	34
Tabela 3 - Conteúdo de óxidos de colesterol e colesterol total (ng/μg de proteína celular, média ±DP) em macrófagos controles (C) ou tratados com glicolaldeído (GAD) incubados na presença de HDL apenas ou HDL e T0901317 (n=8).....	39

LISTA DE ABREVIACÃO

ABCA-1 - “*ATP binding cassette transporter A-1*”

ABCG-1 - “*ATP binding cassette transporter G-1*”

AGE - produtos de glicação avançada

Alb-AGE - Albumina modificada por glicação avançada

Apo A-I - Apolipoproteína A-I

CETP - Proteína de transferência de colesterol esterificado

CYP27A1 - 27-hidroxilase

CYP46A1 - colesterol 24-hidroxilase

CYP7A1 - colesterol 7 alfa hidroxilase

FXR - Receptor X farnesoide

GAD - glicolaldeído

HDL - Lipoproteína de densidade alta

HMG-CoA redutase - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase

IL-8 - Interleucina 8

INSIG - Gene induzido por insulina

LCAT - Lecitina colesterol aciltransferase

LDL - Lipoproteína de densidade baixa

LDLox - Lipoproteína de densidade baixa modificada por oxidação

LRP - Receptor de LDL

LXR - Receptor X hepático

MCP-1 - Proteína quimioatraente de monócitos - 1

MIP-1 β - Proteína indutor de macrófagos 1 β

NF- κ B - fator nuclear kappa B

ORP - Proteínas relacionadas à OSBP

OSBP - Proteínas ligantes de óxidos de colesterol

PCSK-9 - “proprotein convertase subtilisin/kexin type 9”

RXR - Receptor X retinóide

SCAP - Proteína ativadora da clivagem de SREBP

SR-BI - Receptor “Scavenger” classe B tipo I

SREBP-2 - Proteína de ligação ao elemento responsivo a esteroide tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

UPR - Resposta a proteínas mal enoveladas

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

Iborra RT. Glicação avançada em macrófagos diminui o conteúdo dos receptores de HDL - ABCA-1 e ABCG-1 - e induz acúmulo intracelular de 7-cetocolesterol.[tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2011. 61p.

Produtos de glicação avançada (AGE) alteram o metabolismo de lípidos e, em especial, o efluxo de colesterol de macrófagos, por meio da redução dos receptores ABCA-1 e ABCG-1. Isto prejudica o transporte reverso de colesterol, sistema que favorece o fluxo de colesterol de macrófagos arteriais ao fígado, permitindo sua excreção na bile e eliminação fecal. Óxidos de colesterol modulam favoravelmente a homeostase lipídica em macrófagos e favorecem o transporte reverso de colesterol, embora o acúmulo de 7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicoolesterol e 7 β -hidroxicoolesterol associe-se à aterogênese e morte celular. Neste estudo, avaliou-se o efeito do tratamento com glicolaldeído (GAD; oxoaldeído que induz rápida geração intracelular de AGE), em macrófagos sobrecarregados com LDL oxidada e incubados com HDL ou HDL e indutor de LXR (T0901317) sobre: 1) a distribuição seletiva de óxidos de colesterol e o conteúdo total de esteróis intracelulares e 2) o conteúdo de ABCA-1 e ABCG-1. Colesterol total e os diversos subtipos de óxidos de colesterol foram determinados por cromatografia a gás acoplada à espectrômetro de massa. O conteúdo dos receptores de HDL (ABCA-1 e ABCG-1) foi avaliado por imunoblot. Em macrófagos controles (C), a adição de HDL ou HDL + T0901317 promoveu redução no conteúdo de esteróis

totais (colesterol + óxidos de colesterol), colesterol e 7-cetocolesterol. No entanto, isto não foi observado em macrófagos GAD. Nas diversas condições experimentais, não houve diferença no conteúdo intracelular dos outros subtipos de óxidos de colesterol, em células C e GAD. Macrófagos GAD apresentaram menor conteúdo de ABCA-1 (45%), quando comparados aos macrófagos C, mesmo após adição de HDL ou HDL + T0901317. O conteúdo de ABCG-1 foi 36,6% menor em macrófagos GAD, na presença de HDL, em comparação às células C. Em conclusão, em macrófagos sobrecarregados com LDL oxidada, o tratamento com glicolaldeído diminui a exportação celular de colesterol e 7-cetocolesterol, mediada pela HDL. Isto é decorrente do menor conteúdo dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 em macrófagos tratados com glicolaldeído, e pode contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose no diabetes melito.

Descritores: colesterol, cetocolesterolis, macrófagos, produtos finais de glicação avançada, transportadores de cassetes de ligação de ATP.

SUMMARY

Iborra RT. Advanced Glycation in macrophages decreases the content of the HDL receptor – ABCA-1 and ABCG-1 - and induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2011. 61p

Advanced glycation end products (AGE) alter lipid metabolism and reduce the macrophage expression of ABCA-1 and ABCG-1 which impairs the reverse cholesterol transport, a system that drives cholesterol from arterial wall macrophages to the liver, allowing its excretion into the bile and feces. Oxysterols favors lipid homeostasis in macrophages and drive the reverse cholesterol transport, although the accumulation of 7-ketocholesterol, 7 α -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxycholesterol is related to atherogenesis and cell death. We evaluated the effect of glycolaldehyde treatment (GAD; oxoaldehyde that induces a fast formation of intracellular AGE) in macrophages overloaded with oxidized LDL and incubated with HDL alone or HDL plus LXR agonist (T0901317) in: 1) the intracellular content of oxysterols and total sterols and 2) the contents of ABCA-1 and ABCG-1. Total cholesterol and oxysterol subspecies were determined by gas chromatography/mass spectrometry and HDL receptors content by immunoblot. In control macrophages (C), incubation with HDL or HDL + T0901317 reduced the intracellular content of total sterols (total cholesterol + oxysterols), cholesterol and 7-ketocholesterol, which was not observed in GAD macrophages. In all experimental conditions no changes were found in the intracellular content of

other oxysterol subspecies comparing C and GAD macrophages. GAD macrophages presented a 45% reduction in ABCA-1 protein level as compared to C cells, even after the addition of HDL or HDL + T0901317. The content of ABCG-1 was 36.6% reduced in GAD macrophages in the presence of HDL as compared to C macrophages. In conclusion, in macrophages overloaded with oxidized LDL, glycolaldehyde treatment reduces the HDL-mediated cholesterol and 7-ketocholesterol efflux which is ascribed to the reduction in ABCA-1 and ABCG-1 protein level. This may contribute to atherosclerosis in diabetes mellitus.

Descriptors: cholesterol, ketocholesterols, macrophages, advanced glycation end products, ATP-binding-cassete transporters

INTRODUÇÃO

Óxidos de colesterol

Os óxidos de colesterol são moléculas estruturalmente semelhantes ao colesterol, com uma ou mais moléculas de oxigênio ligadas a grupos funcionais. Estes derivados oxigenados do colesterol são componentes importantes das células eucarióticas e atuam como intermediários do metabolismo de esteróis e de vias de sinalização intracelular.

Vias enzimáticas e não enzimáticas contribuem para a formação de diferentes óxidos de colesterol (Brown AJ, Jessup W, 2009), como resultado de peroxidação lipídica, ação direta de monooxigenases, ou autooxidação do colesterol e seus precursores (Björkhem I, Diczfalusy U, 2002).

Os principais óxidos de colesterol originados por vias não enzimáticas (**figura 1**) são formados pela ação direta de espécies reativas de oxigênio no carbono 7 da molécula de colesterol. Nesta condição, o óxido de colesterol formado é o 7-hidroperóxido colesterol, que é pouco encontrado em sistemas biológicos, devido à sua rápida conversão a 7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 7 α -hidroxicolesterol, sendo que este último também pode ser formado por vias enzimáticas (Björkhem I e Diczfalusy U. 2002 e Brown AJ, Jessup W, 1999).

Outros óxidos de colesterol formados por vias não enzimáticas e que possuem importante função biológica são o colesterol-5 α ,6 α -epóxido e o

colesterol-5 β ,6 β -epóxido (**figura 1**). Estes são os principais óxidos de colesterol presentes em alimentos processados e também são detectados no plasma humano, principalmente em associação às lipoproteínas. Em lipoproteínas de densidade baixa (LDL) submetidas à oxidação *in vitro* por sulfato de cobre verifica-se a geração de colesterol-5 α ,6 α -epóxido e de colesterol-5 β ,6 β -epóxido (Sevanian A e cols. 1991).

Figura 1. Estrutura química dos óxidos de colesterol de origem não enzimática

Entre os óxidos de colesterol formados por via enzimáticas, destacam-se: 7 α -hidroxicolesterol, 24 hidroxicolesterol, 24(S)25 epoxicolesterol, 25 hidroxicolesterol e 27 hidroxicolesterol (**figura 2**).

24 hidroxicolesterol Enzima - CYP46A1 Células neuronais e de retina
25 hidroxicolesterol Enzima - 25 hidroxilase Todos os tecidos
27 hidroxicolesterol Enzima - CYP27A1 Fígado e Macrófagos
24(s),25 epoxicolesterol Enzima - Oxiesleno ciclase Plasma e Macrófagos
7α-hidroxicolesterol Enzima - CYP7A1 Fígado

Figura 2. Estrutura química dos óxidos de colesterol de origem enzimática.

O 7 α -hidroxicolesterol é formado no fígado, pela ação da enzima 7- α hidroxilase (CYP7A1), sendo este, o primeiro passo da principal via de geração de ácidos biliares. A atividade da CYP7A1 é inversamente correlacionada com a concentração de ácidos biliares no fígado, tendo como principal modulador de sua expressão gênica o receptor X farnesoide (FXR; *farnesoide X receptor*).

O 24 hidroxicolesterol é formado pela ação da colesterol 24 hidroxilase (CYP46A1) no retículo endoplasmático de células neuronais e da

retina, constituindo a forma mais eficiente de exportação do excesso de colesterol nestes tecidos. Como o 24 hidroxicolesterol possui maior hidrofiliabilidade do que o colesterol, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, sendo assim encontrado no plasma em valores relativamente estáveis (Björkhem I e Diczfalusy U. 2002).

O 24(S),25 epoxicolesterol possui um papel especial na proteção das células contra o acúmulo do colesterol recém sintetizado, uma vez que é produzido em paralelo a este esterol, pela via do mevalonato (Gill S e cols. 2008; Wong J e cols. 2008). Quando adicionado às células em cultura, este óxido de colesterol apresenta-se como potente regulador da produção de colesterol, por estimular a degradação da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase) e diminuir a síntese de colesterol. Além disso, o 24(S),25 epoxicolesterol é um potente supressor da transcrição da proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol tipo 2 (SREBP-2; *sterol regulatory element-binding protein-2*) (Wong J e cols. 2008).

O 25 hidroxicolesterol é encontrado em pequena quantidade no plasma e nos tecidos, sendo formado, pela ação da 25 hidroxilase, pertencente a uma pequena família de enzimas não pertencentes a CYP (Björkhem I e Diczfalusy U. 2002). Este óxido de colesterol é convertido em ácidos biliares no fígado (Björkhem I 2002) e é precursor de testosterona, nas células de Leydig (Gill S e cols. 2008).

O 27 hidroxicolesterol é o mais abundante óxido de colesterol encontrado no plasma e nas lesões ateroscleróticas. Este óxido é formado pela ação da enzima mitocondrial esterol 27-hidroxilase (CYP27A1) que

pode oxidar a porção metil terminal em CH_2OH ou formar o ácido carboxílico, gerando uma rota alternativa para a formação de ácidos biliares, denominada via ácida (Björkhem I, 2002). Além do colesterol, o 7-cetocolesterol também é substrato para a CYP27A1 tornando este óxido mais solúvel no meio aquoso (facilitando o efluxo passivo) e menos bioativo (Jessup W e Brown AJ, 2005).

Na circulação, os óxidos de colesterol são transportados, principalmente, pelas LDL e, juntamente com a modificação de ácidos graxos e apolipoproteína B, contribuem para a modificação oxidativa da partícula e aumento de seu potencial aterogênico.

Embora a quantidade de óxidos de colesterol nas lipoproteínas circulantes possa ser reflexo da ingestão alimentar, sua participação na gênese e evolução da aterosclerose ainda é bastante discutida, devido à pequena massa destes compostos em comparação à do colesterol. Por outro lado, sua geração intracelular, a partir da modificação enzimática ou autooxidação do colesterol, está intimamente relacionada com a sobrecarga de colesterol (Brown et al., 1997; Lyons et al, 1999).

Óxidos de colesterol e homeostase celular do colesterol

O colesterol e os óxidos de colesterol regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico e vias de excreção do colesterol biliar. No entanto, seu acúmulo é extremamente prejudicial, tendo em vista que

são encontrados na lesão aterosclerótica, sendo este um evento chave na gênese e progressão da doença cardiovascular.

O conteúdo intracelular de colesterol é mantido em uma faixa estreita de variação, graças ao ajuste na: 1) síntese de esteróis, pela modulação da expressão gênica e atividade da HMGCoA redutase; 2) captação de LDL pelo receptor de LDL (receptor B-E) e 3) exportação de colesterol livre para lipoproteínas de alta densidade (HDL), conversão a ácidos biliares ou hormônios esteroídicos.

Os óxidos de colesterol são intermediários importantes na homeostase do colesterol, por sinalizarem a concentração intracelular de esteróis. Entre os óxidos de colesterol envolvidos no controle da síntese do colesterol estão o 25 hidroxicolesterol, que é um dos mais potentes supressores da síntese de esteróis, e o 24(S),25 epoxicolesterol. Este último desempenha papel especial na proteção das células contra o acúmulo do colesterol recém sintetizado, uma vez que é produzido em paralelo ao colesterol (Wong J e cols, 2008).

A síntese da HMGCoA redutase e do receptor de LDL é controlada pela SREBP 2. Esta se encontra ancorada à membrana do retículo endoplasmático, em íntima associação à proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP). Na presença de esteróis no meio intracelular, os óxidos de colesterol, principalmente o 25 hidroxicolesterol, ligam-se à proteína insulina-gene induzida (INSIG; *insulin-inducible gene*), o que favorece sua forte associação com a SCAP que se encontra ligada ao colesterol (**figura 3**). Nesta condição, o complexo INSIG/SCAP/SREBP permanece no retículo

endoplasmático. Em oposição, quando a concentração intracelular de colesterol é reduzida, os óxidos de colesterol e o colesterol não se ligam respectivamente à INSIG e a SCAP, permitindo a dissociação destas. Isto favorece a migração do complexo SCAP/SRBEP para o complexo secretório celular (complexo de Golgi). Na membrana desta organela, a SREBP sofre duas clivagens proteolíticas, com a liberação da porção ativa deste fator de transcrição, que migra ao núcleo estimulando a transcrição dos genes do receptor de LDL, HMGCoA redutase e da proteína que degrada o receptor de LDL (PCSK-9; *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (Gill S e cols. 2008) (**figura 3**).

Figura 3. Homeostase do colesterol celular. Na presença de esteróis, os óxidos de colesterol ligam-se à proteína INSIG (*insulin- inducible gene*) e o colesterol ao SCAP, o que favorece sua forte associação, mantendo o complexo INSIG/SCAP/SREBP no retículo endoplasmático (painel A). Quando a concentração intracelular de colesterol é reduzida, os óxidos

de colesterol não se ligam à INSIG, permitindo a migração do complexo SCAP/SRBEP para o complexo de Golgi onde a SREBP sofre duas clivagens proteolíticas, com a liberação da porção ativa deste fator de transcrição. Esta migra ao núcleo, estimulando a transcrição dos genes do receptor de LDL, HMGCoA redutase e da proteína que degrada o receptor de LDL (PCSK9) (painel B).

Em macrófagos arteriais, células intimamente envolvidas no desenvolvimento da lesão aterosclerótica, a principal via de controle do conteúdo de colesterol celular é representada pela atividade dos receptores de membrana, *ATP binding cassette transporter A-1* (ABCA-1) e *ATP binding cassette transporter G-1* (ABCG-1). Estas células expressam quantidade muito reduzida do receptor de LDL (B-E) e, portanto, a contribuição desta via no controle do colesterol celular é pequena. Além disso, macrófagos captam LDL modificadas pelos receptores *scavenger*, os quais não são passíveis de regulação pelo conteúdo intracelular de lípidos (Cavelier C e cols. 2006)

Os receptores ABCA-1 e ABCG-1 atuam no efluxo de colesterol, que é o primeiro passo do transporte reverso de colesterol. O efluxo de colesterol é a exportação do excesso de colesterol livre e óxidos de colesterol, respectivamente, para as apolipoproteínas A-I (apo A-I) dissociadas e HDL maduras, graças à energia liberada pela hidrólise de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) ligadas às suas estruturas. (Cavelier C e cols. 2006). Uma vez na superfície das HDL, o colesterol livre

e os óxidos de colesterol são esterificados pela ação da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT). Isto favorece reestruturação da partícula de HDL, a qual passa a abrigar lípidos esterificados em seu núcleo hidrofóbico. A proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP) promove a transferência de colesterol esterificado das HDL para as lipoproteínas ricas em apolipoproteína B (lipoproteínas de densidade muito baixa, LDL e quilomícrons) e de triglicérides destas últimas para as HDL. Isto favorece a remoção de lipoproteínas que contêm apolipoproteína B pelo fígado, graças ao reconhecimento pelos receptores B/E, E e LRP. Por outro lado, HDL enriquecidas em triglicérides tornam-se melhor substrato para a enzima lipase hepática, o que possibilita sua posterior interação com os receptores SR-BI. Desta forma, os esteróis advindos da periferia, particularmente da íntima arterial, podem ser redistribuídos em órgãos produtores de hormônios esteroides ou ser secretados na bile e excretados nas fezes (Lewis GF, Rader DJ. 2005)

Óxidos de colesterol, em particular o 24(S),25 epoxicolesterol, o 22(R) hidroxicolesterol, o 24(S) hidroxicolesterol e o 25 hidroxicolesterol (Shibata N, Glass C, 2010), são ligantes naturais do receptor X hepático (LXR; *liver X receptor*), favorecendo sua heterodimerização com os receptores X retinoide (RXR; *retinoic X receptor*) e migração ao núcleo, com transativação dos genes dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 (Shibata N, Glass C, 2010; Tontonoz P, Mangelsdorf DJ, 2003) e repressão da resposta inflamatória. Sendo assim, o aporte de colesterol aos macrófagos e a geração seletiva de óxidos de colesterol é capaz de induzir vias de exportação ativa de

fosfolípidos e colesterol para aceptores exógenos, evitando o acúmulo intracelular de lípidos e a inflamação (**figura 4**).

Figura 4. Regulação do conteúdo de esteróis em macrófagos. Óxidos de colesterol ligam-se ao LXR, favorecendo sua heterodimerização com os receptores RXR e migração ao núcleo, com transativação dos genes dos receptores ABCA-1 e ABCG-1. Isto favorece a exportação ativa de colesterol e óxidos de colesterol para aceptores exógenos, evitando o acúmulo intracelular de lípidos.

Outros subtipos de óxidos de colesterol, como o colesterol-5 α ,6 α -epóxido e o colesterol-5 β ,6 β -epóxido modulam a expressão dos receptores

ABCA-1 e ABCG-1 de maneira negativa e são incapazes de reprimir a resposta inflamatória. De fato, demonstra-se que atividade de transativação ou transrepressão gênica dos LXR pode ser independentemente regulada por diferentes tipos de óxidos de colesterol (Berrodin e cols. 2010; Wong e cols. 2008).

Em macrófagos sobrecarregados com colesterol proveniente de LDL oxidada, o efluxo de colesterol é reduzido em comparação à sobrecarga de colesterol advindo de lipoproteínas acetiladas (Kritharides e cols. 1995). Isto parece depender tanto da inacessibilidade do colesterol para o efluxo, que permanece aprisionado nos lisossomos (Brown et al. 2000), quanto por efeito inibitório direto dos principais óxidos de colesterol presentes na LDL oxidada, principalmente o 7-cetocolesterol (Gelissen e cols. 1996). Estudos demonstram que a capacidade do 7-cetocolesterol para bloquear a remoção de colesterol dos macrófagos pela apolipoproteína A-I, depende, pelo menos em parte, da sua capacidade de prejudicar a interação desta apolipoproteína com a membrana plasmática (Gaus e cols. 2001a, b). No entanto, a possibilidade de que ele também influencie diretamente na distribuição ou atividade de ABCA-1 não pode ser excluída (Gaus e cols. 2001a), o que provavelmente se relacione à ação de LXR e correpressores (Song e cols 2001). Como o 7-cetocolesterol está presente em concentrações semelhantes na células espumosas de lesão e nos ensaios experimentais descritos (Kritharides e cols. 1995; Gelissen e cols. 1996), é provável que a deficiência no efluxo do colesterol contribua para o acúmulo de colesterol total *in vivo* (Jessup W e cols. 2002). Berrudin e cols.(2010),

demonstraram que o colesterol-5 α ,6 α -epoxi apresenta grande afinidade com LXR. No entanto, possui ação antagonista a de outros óxidos, (24(S),25 epoxicolesterol, 22(R) hidroxicolesterol , 24(S) hidroxicolesterol e 25 hidroxicolesterol), induzindo o acúmulo de lípidos nos macrófagos (Berrudin e cols. 2010).

O colesterol-5 β ,6 β -epóxido e o colesterol-5 α ,6 α -epóxido além de serem antagonistas do LXR, possuem efeito citotóxico demonstrado em ensaios *in vitro* com células endoteliais de coelhos (Sevanian A e cols. 1991).

Os receptores ABCG-1 promovem a saída de óxidos de colesterol para partículas de HDL, evitando seu acúmulo intracelular e, conseqüentemente, a indução de vias inflamatórias e apoptóticas. Neste caso, a ação do ABCG-1 dá-se especificamente no transporte de derivados oxigenados na posição 7 do colesterol, como o 7-cetocolesterol, 7 α e 7 β -hidroxicolesterol. Tal evento é reduzido em células obtidas de animais knockout para ABCG-1 e se reflete no acúmulo de 7-cetocolesterol e apoptose (Terasaka N et al., 2007).

Interessante que o acúmulo de 7-cetocolesterol associa-se ao estresse do retículo endoplasmático e ativação de vias adaptativas ao acúmulo de proteínas mal enoveladas (UPR; *unfolded protein response*). Macrófagos tratados com 7-cetocolesterol aumentam a expressão de chaperonas marcadoras do estresse do retículo endoplasmático e proteínas (CHOP; *C/EBP homologous protein*) da via de ativação de caspases, envolvidas na apoptose celular. Em áreas de lesão aterosclerótica

suscetíveis à ruptura, observa-se, de fato, acúmulo de 7-cetocolesterol e expressão de marcadores da UPR. (Pedruzzi e cols. 2004)

Os óxidos de colesterol mais prevalentes nas placas ateroscleróticas são: o 27 hidroxicolesterol, que mantém uma proporção com a quantidade de colesterol, e os esteróis oxigenados na posição 7 (7-cetocolesterol, 7 β -hidroxicolesterol e 7 α -hidroxicolesterol). Em ordem decrescente aparecem os seguintes óxidos: colesterol-5,6 β -epoxi, colesterol-5,6 α -epoxi, colestano-3 β , 5 α , 6 β -triol, 25 hidroxicolesterol e 24 hidroxicolesterol. (Brown AJ, Jessup W. 1999). Os óxidos de colesterol são mais potentes do que o colesterol não oxidado, em cerca de uma ou duas ordens de magnitude, quanto ao estímulo pró-inflamatório e apoptótico (Brown AJ, Jessup W. 1999 e 2009)

O 7-cetocolesterol também está envolvido na inibição da síntese de colesterol pela modulação da atividade da HMG-CoA redutase, redução do efluxo de colesterol, indução de efeitos citotóxicos em células da parede vascular e em monócitos, além de apresentar propriedades, inflamatórias, trombóticas e oxidativas (Monier et al., 2003). Grande parte de sua ação reside no estímulo à geração de espécies reativas de oxigênio, com aumento da peroxidação lipídica celular (Monier et al., 2003). Além disso, as espécies reativas de oxigênio favorecem, via ativação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), o aumento na expressão de mediadores inflamatórios que agravam a progressão da lesão aterosclerótica (Leonarduzzi G et al., 2005). O 7-cetocolesterol estimula, *in vitro*, a secreção das citocinas interleucina-8, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de

macrófago 1β (MIP- 1β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Prunet et al 2006), independentemente da via de sinalização mediada pelos receptores símile ao Toll (Erridge et al., 2007). Aliada à limitação do efluxo deste óxido e ao fato de que HDL enriquecidas *in vitro* com óxidos de colesterol apresentam menor capacidade em remover colesterol celular (Gesquière L et al, 1997), estes dados apontam para um importante papel do 7-cetocolesterol em limitar o transporte reverso de colesterol.

O 7 β -hidroxicolesterol exerce efeitos citotóxicos em fibroblastos, células musculares lisas arteriais, contribuindo para as propriedades citotóxicas das LDL oxidadas. Estes efeitos foram prevenidos em ensaios que utilizaram inibidores de peroxidação lipídica (Schroepfer Jr et al, 2000). Assim como o 7-cetocolesterol, o 7 β -hidroxicolesterol também estimula fatores inflamatórios independentemente da via de sinalização mediada pelos receptores símile ao Toll (Erridge et al., 2007).

Os óxidos de colesterol também são reconhecidos por proteínas citosólicas, as proteínas ligantes de óxidos de colesterol (OSBP), e proteínas relacionadas à OSBP (ORP), as quais parecem diferentemente dos LXR, regular negativamente o efluxo de colesterol celular. A expressão reduzida de OSBP em células J774 aumenta a estabilidade de ABCA-1 e, em macrófagos THP-1, aumenta o mRNA de ABCA-1 e o efluxo de colesterol para apolipoproteína A-I (Bowden K e cols. 2008; Yan D e cols. 2007; Yan D e cols. 2008). A superexpressão de ORP diminui o mRNA de ABCG-1 e apolipoproteína E e o efluxo de colesterol (Yan D, 2007). As ações distintas

observadas parecem ser determinadas pelas diferentes afinidades e especificidades para os óxidos de colesterol.

Diabete melito, glicação avançada e aterosclerose

No diabete melito, distúrbios do metabolismo de carboidratos e de lípidios favorecem o acúmulo de colesterol na parede arterial, sendo este processo chave na gênese e no desenvolvimento da aterosclerose, altamente prevalente nesta população (Haffner SM et al., 1998).

A formação de produtos de glicação avançada (AGE) decorrente da hiperglicemia promove diversas alterações no metabolismo de lípidos e, em especial, no fluxo de colesterol em macrófagos. Especificamente, são descritas modificações no transporte reverso de colesterol, ocasionando prejuízo na maturação de lipoproteínas de densidade alta (HDL) e no fluxo de lípidos ao fígado (Machado AP et al., 2006; Isoda K et al., 2007; Matsuki K et al., 2009).

A hiperglicemia, no diabete, e falhas de destoxificação de compostos reativos, na doença renal crônica, favorecem a modificação de lípidos e proteínas por glicação (**figura 5**). A glicação de proteínas e lípidos é favorecida na hiperglicemia e em situações de falha de destoxificação de compostos reativos, tal como na doença renal crônica. A reação não enzimática entre glicose ou outros monossacarídeos redutores com proteínas e fosfolípidos das lipoproteínas leva à modificação destas

moléculas, com a geração de uma base de Schiff. Esta progride para um produto mais estável, Produto Amadori, o qual por meio de rearranjos inter e intramoleculares originam os produtos de glicação avançada (AGE). A geração dos AGE é irreversível, alterando a estrutura e a função biológica de macromoléculas. Invariavelmente, sua formação envolve eventos conjuntos de oxidação que agravam o dano químico das lipoproteínas e componentes celulares (Browlee M, 2001).

Figura 5. Glicação não enzimática. Reação não enzimática entre glicose com proteínas e fosfolípides leva à modificação destas moléculas, com a geração de uma base de Schiff. Esta progride para um produto mais estável, Produto Amadori, o qual por meio de rearranjos inter e intramoleculares originam os produtos de glicação avançada (AGE). A geração dos AGE é irreversível, alterando a estrutura e a função biológica de macromoléculas.

A geração de AGE é maior no meio intracelular, em função da alta reatividade de intermediários do metabolismo da glicose. Neste aspecto, o

aumento do estresse oxidativo intracelular, favorecido pelos AGE, bem como pelo aumento da metabolização da glicose ao longo de diversas vias é apontado como elo comum na gênese e progressão da doença macro e microvascular do diabetes melito (Browlee M, 2001).

Oxaldeídos, como glioxal, metilglioxal e glicolaldeído encontram-se aumentados na circulação de diabéticos tipo 1 e 2 (Lapolla A et al, 2003) e em urêmicos não diabéticos (Odani H et al, 1999). A geração destes compostos é inerente à metabolização da glicose pela via glicolítica, autooxidação de glicose, ácidos graxos, metabolização de certos aminoácidos e corpos cetônicos. A base de Schiff também pode sofrer uma reação retroaldol para formar glicolaldeído-alquilamina (base de Schiff com amina). Este composto pode ser hidrolisado para liberar glicolaldeído (GAD) ou rearranjado para formar uma aldoamina. Esta, por sua vez pode reagir com outro grupo amino da mesma ou de diferentes proteínas para gerar AGE (Nagai et al., 2000). Aldoamina também pode ser oxidativamente convertida para o aduto glioxal, glioxalmonoalquilimina, que é convertida em N - (carboximetil) lisina (CML) (Nagai et al., 2000). Além disso, ativação de mieloperoxidase em neutrófilos contribui como importante fonte de glicolaldeído em processos inflamatórios (Anderson MM et al., 1999)

Aumento de estresse carbonila também é gerado frente à falha de depuração renal, como na doença renal crônica e, em especial, no período pós- prandial (Beisswenger PJ et al, 2001; Ahmed N et al, 2005). Além disso, AGE de origem exógena (dieta e fumo) podem ser absorvidos e

transportados na circulação pela albumina e pelas lipoproteínas (Koschinsky T et al, 1997).

Na circulação, do total de proteínas modificadas por glicação, cerca de 80% correspondem à albumina e sua determinação fornece um índice estreito de controle glicêmico (Cohen MP, 2003).

A albumina modificada por glicação avançada (alb-AGE) reduz a expressão de ABCA-1 e ABCG-1, comprometendo o efluxo de colesterol mediado por HDL e aumenta a expressão de CD-36 e RAGE, o que favorece o influxo de LDL modificadas (Pinto RS et al, 2007). Resultados semelhantes, porém de maior magnitude, também foram encontrados mediante tratamento de macrófagos e fibroblastos com aldeídos bifuncionais, os quais induzem rápida formação intracelular de AGE (Passarelli M et al, 2005). Frente à glicação avançada, foi observado maior conteúdo intracelular de colesterol e triglicérides, com estímulo e redução, respectivamente, da atividade da acil colesterol aciltransferase (enzima que esterifica o colesterol no citosol) e da HMGCoA redutase (enzima chave na biossíntese do colesterol) (Castilho G et al, 2007).

A utilização de inibidores de glicação avançada, como aminoguanidina e metformina, previniu alterações no efluxo de colesterol celular, paralelamente à diminuição na geração de carboximetil-lisina (Passarelli M et al, 2005; Machado AP et al, 2006).

As concentrações plasmáticas de óxidos de colesterol correlacionam-se com hemoglobina glicada e frutossamina (Ferderbar S et al., 2007). Neste sentido, processos oxidativos, invariavelmente associados à reação de

glicação, podem favorecer a oxidação de colesterol e o aumento das concentrações plasmáticas de óxidos de colesterol observadas no diabetes melito tipo 1 e 2 (Ferderbar S et al., 2007).

Óxidos de colesterol afetam a homeostase de colesterol nestas células, por aumentarem a expressão dos receptores de HDL e ABCA-1. Não obstante, na lesão aterosclerótica, observa-se acúmulo de 27 hidroxicolesterol e derivados oxigenados na porção 7 do colesterol (7-cetocolesterol, principalmente), condicionando maior resposta oxidativa, inflamatória e apoptótica. Neste sentido, o gerenciamento seletivo na geração e metabolização de óxidos de colesterol deve conferir padrões distintos de evolução dos macrófagos arteriais para células espumosas e, portanto, para a progressão da aterosclerose.

Até o momento não são conhecidos os efeitos da glicação avançada sobre o gerenciamento seletivo de óxidos de colesterol em macrófagos. Nossa hipótese é de que a glicação avançada contribua para o acúmulo diferencial de óxidos de colesterol em macrófagos sobrecarregados com LDL oxidada, seja pela redução da expressão de ABCA-1 ou ABCG-1 ou por alteração nas vias de exportação dos óxidos de colesterol para aceptores. Isto pode agravar a aterosclerose no diabetes melito e em outras condições de estresse carbonila, como inflamação e doença renal crônica.

OBJETIVO

Avaliar em macrófagos sobrecarregados com LDL oxidada e tratados com HDL ou HDL e indutor de LXR (T0901317) o efeito do tratamento com glicolaldeído sobre: 1) a distribuição seletiva de óxidos de colesterol e o conteúdo total de esteróis intracelulares e 2) o conteúdo de ABCA-1 e ABCG-1.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de Lipoproteínas

Sangue periférico de indivíduos saudáveis, em jejum de 12 h, foi colhido em tubos contendo EDTA 10% e, imediatamente, centrifugado 3.000 rpm), em centrífuga refrigerada (4°C) durante 20 minutos. Ao plasma, foram adicionados os seguintes conservantes ($\mu\text{L/mL}$ de plasma): 20 μL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%), 10 μL de azida sódica (5%); 5 μL de benzamidina (2mM), 5 μL de aprotinina (0,5%) e 0,5 μL de PMFS (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30mM de dimetilsulfóxido (DMSO).

As LDL e as HDL foram isoladas do plasma por ultracentrifugação sequencial nas faixas de densidade 1,019 a 1,063 g/mL e 1,063 a 1,21 g/mL, respectivamente, utilizando rotor tipo 50Ti (Beckman Industries, Palo Alto, EUA), 40.000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (L-80, Beckman) durante 20 h (para obtenção de LDL) e 40 h (para obtenção de HDL). A seguir, as lipoproteínas foram purificadas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade utilizando rotor tipo SW 40 (Beckman), 40.000 rpm em ultracentrífuga refrigerada (L-80, Beckman) durante 24 h (Havel RJ e cols., 1955), dialisadas contra solução de tampão fosfato (PBS), contendo EDTA, pH= 7,4 e armazenadas a 4°C sob condições estéreis, em atmosfera de nitrogênio.

Devido ao processo natural de oxidação das LDL, o isolamento destas lipoproteínas foi realizado mensalmente, convocando-se sempre os

mesmos voluntários saudáveis para doação de sangue. As amostras foram mantidas estéreis, sob atmosfera de nitrogênio e refrigeração a 4°C.

Oxidação das LDL

Para cada mL de LDL, previamente dialisada contra tampão PBS sem EDTA, foram adicionados 3 mL de PBS sem EDTA e 40µL de solução de sulfato de cobre 1mM. A solução de LDL foi mantida durante 24 h em agitação lenta e constante, em banho a 37°C. Logo após o período de incubação, a amostra foi dialisada contra PBS com EDTA, com três trocas, durante 24 h (Steinbrecher UP e cols. 1987). A LDL oxidada foi mantida a 4°C, em condições estéreis, sob atmosfera de nitrogênio e utilizada nos experimentos no prazo máximo de 2 semanas.

Cultura de macrófagos da linhagem J774.

Macrófagos J774 foram cultivados, até confluência, em meio RPMI (Gibco, Grand Island, Nova Iorque, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 2 mM glutamina (Gibco), em incubadora de CO₂ 5% a 37°C. Os macrófagos foram incubados em garrafas de cultura com 75 cm² em concentração de 3 x 10⁶ células/mL de meio.

Após confluência, as células foram incubadas com DMEM (Gibco) contendo 1 mg de albumina isenta em ácidos graxos (FAFA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), por mL de meio.

Tratamento de macrófagos

Para todas as condições experimentais descritas abaixo, os macrófagos foram previamente incubados por 48 h na presença de 50 µg/mL de LDL oxidada. Isto garantiu o enriquecimento destas células em óxidos de colesterol. Nas últimas 5 h de incubação, as células foram adicionado glicolaldeído 0,25 mM ao DMEM em três grupos de macrófagos (macrófagos GAD) foram incubadas com 0,25 mM de glicolaldeído apenas ou glicolaldeído e, em um deste, foi adicionado 1µM do indutor do LXR, T0901317. Células controles (macrófagos C) foram mantidas apenas na presença de meio de cultura ou meio de cultura contendo 1µM de T0901317.

As células foram lavadas com PBS/FAFA, e incubadas, durante 5 h, com meio de cultura apenas, ou meio contendo HDL (50 µg/mL) ou HDL (50 µg/mL) e T0901317. (**figura 6**). As células, sobre gelo, foram lavadas com solução fisiológica gelada, por 3 vezes.

Figura 6. Protocolo experimental

Extração dos lípides celulares

Os lípides celulares foram extraídos com solução de hexana:isopropanol (3:2 v/v), por 30 min, com posterior adição de 10 µg de 5α colestano (padrão interno) e hidroxitolueno butilado 4mM, seguindo-se congelamento a -80°C. A fase orgânica foi, então, evaporada sob fluxo contínuo de nitrogênio e o resíduo ressuspendido em 1 mL de tolueno/etil acetato (1 : 1, v/v), com aplicação em colunas de extração de diol (Sep-Pak Vac 3cc Waters Corporation, Irlanda). Após a coleta da primeira fração eluente, sob aspiração suave, as colunas foram eluídas com outros 2 mL de

tolueno/ etil acetato (1 : 1, v/v). Esta fração, evaporada sob fluxo contínuo de nitrogênio, foi redissolvida em 2 mL de dietil eter (recém destilado) e submetida à saponificação alcalina de duas fases. Após evaporação, as amostras foram derivatizadas com 100 µL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (Supelco – Bellefonte, EUA) e 100 µL de piridina (Merck – Rio de Janeiro, Brasil) por 60 minutos, a 60°C. Após esta etapa, as amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado à espectômetro de massa (QP 2010 plus, Shimadzu - Kioto, Japão) (Ferderbar et al, 2007), para a quantificação da massa de colesterol e óxidos de colesterol.

Após a extração lipídica, as placas de cultura foram incubadas durante 3 h (sob agitação) com 15 mL de solução NaOH 0,2N a temperatura ambiente. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 200µL para quantificação de proteínas (Lowry OH et al., 1951)

Determinação do conteúdo de colesterol total e óxidos de colesterol por cromatografia gasosa

Foram determinados os seguintes óxidos de colesterol: 5-colesten-3β-ol-7-one (7-cetocolesterol), 5-colesten-3β,7β-diol (7β-hidroxicolesterol), 5-colesten-3β, 7α-diol (7α-hidroxicolesterol), colestano-5β,6β-epoxy-3βol (colesterol-5,6β-epóxido), colestano-5α,6α-epoxy-3βol (colesterol-5,6α-epóxido), colestano-3β-5α-6β-triol (colestan-3β,5α,6β-triol), 24S,25-epoxy-colest-5-en-3β-ol (24,25-epoxicolesterol), Colest-5-en-3β,25-diol (25-hidroxicolesterol) e 25R-Colest-5-en-3β,26-diol (27-hidroxicolesterol).

Uma alíquota de 1µL do extrato lipídico foi injetada no cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massa QP 2010 plus (Shimadzu – Kioto, Japão) equipado com coluna Rxi-1ms de 30 m (Restec – Bellefonte, EUA). O gás hélio foi utilizado como carreador. A temperatura de injeção foi de 290°C, com temperatura inicial de coluna de 240°C e incremento de 5°C a cada minuto, mantendo 290°C por 7 minutos. As análises quantitativas foram realizadas pelo software GCMS solution (ver 2.5) com utilização de padrão interno e curva de calibração com valores de 40, 20, 10, 8, 4, 2, 1 e 0,5 µg. As análises no espectrômetro de massa foram realizadas no modo SIM, onde foram selecionados três íons alvo (m/z) a partir da análise cromatográfica de cada padrão (**Tabela 1**). Por este método, o espectrômetro de massa identifica os compostos que apresentam estes íons, reduzindo ruídos de sinal. Os picos referentes a cada composto (**Figura 7**) foram integrados manualmente e sua quantificação foi realizada pelo software (GCMS solution).

Figura 7 – Cromatograma com o pico do padrão interno (5 α -colestano) e com o tempo de retenção (min) dos padrões de colesterol e óxidos de colesterol.

Tabela 1. Tempo de retenção e relação massa por carga (m/z) dos padrões de colesterol e óxidos de colesterol.

Padrão	Tempo de retenção	Relação massa por carga		
	(min)	m/z	m/z	m/z
5 α colestano	7,483	357	217	149
7 α -hidroxicolesterol	10,291	456	351	233
colesterol	10,459	129	329	368
7 β -hidroxicolesterol	11,720	456	233	209
Colesterol-5 α ,6 α -epóxido	12,025	384	253	351
22(r)hidroxicolesterol	12,524	173	295	343
24,25epoxicolesterol	12,708	382	343	472
colestano3 β	13,475	403	456	321
colesterol5 β ,6 β -epóxido	13,725	441	385	308
7-cetocolesterol	14,059	367	472	269
25 hidroxicolesterol	14,325	271	327	456
27 hidroxicolesterol	15,47	129	417	576

Determinação do conteúdo de ABCA-1 e ABCG-1 por imunoblot

Após tratamento, os macrófagos foram lisados com solução TRIS (TBS) contendo conservantes e inibidores de protease (aprotinina 1,5µM, pepstatina 2µM, leupeptina 1µM e PMSF 0,1mM). Após centrifugação a 1500rpm, durante 10 min, a 4°C, o botão celular foi ressuspenso em 500 µL de TBS contendo conservantes e inibidores de protease. O conteúdo proteico foi determinado pelo método BCA (Pierce Biotechnology, Rockford EUA).

Cinquenta microgramas de proteína celular foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose durante 1h e 30 minutos a 120V (Unidade de Transferência semi seca TE-70 - GE Healthcare, EUA), seguindo-se bloqueio de sítios não ocupados por meio de incubação com PBS contendo 5% de leite desnatado e Tween 0,05%. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-ABCA-1 (1:1000 - Novus Biologicals, Littleton, CO EUA) durante 3 h a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS/Tween, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-camundongo, conjugado a peroxidase (1:2000; GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Reino Unido). A visualização das bandas foi obtida após reação com ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Termo Scientific Rockford, IL, EUA) e a captura de imagem realizada pelo fotodocumentador ImageQuant 350 (GE Healthcare, Piscata Way, NJ, EUA).

Para determinação do conteúdo de ABCG-1, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-ABCG-1 (1:1000; Novus Biologicals, Littleton,

EUA), seguindo-se incubação com anticorpo secundário e revelação conforme descrito acima.

Teste de viabilidade celular

Em todas as incubações realizadas, foi determinada a liberação de lactato desidrogenase (LDH) ao meio de cultura, a qual reflete a citotoxicidade (In Vitro Toxicology Assay Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura foi centrifugado a 3000rpm por 4 minutos. Foram adicionados 75 μ L de meio de cultura a 150 μ L do MIX do Kit (Assay Substrate + Assay Cofactor + Dye Solution), em temperatura ambiente por 20 a 30 min. Este ensaio é baseado na redução do NAD pela ação da LDH. O NAD reduzido reage com o corante tetrazolium, o que resulta em uma coloração que pode ser medida por espectrofotometria a 490 nM.

A liberação de lactato desidrogenase ao meio de cultura foi semelhante entre todos os tratamentos (dados não mostrados). Portanto, a incubação celular com LDL oxidada e os tratamentos subsequentes não promoveram citotoxicidade.

Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prisma 4.0 (GraphPad Software Inc, EUA). As comparações entre macrófagos C e macrófagos GAD foram realizadas pelo teste t de *Student* não pareado. Para comparações entre as diferentes condições experimentais nos macrófagos C ou macrófagos GAD, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de um

fator, com pós-teste de Bonferroni. Em todos os casos, foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância foi inferior a 5%.

RESULTADOS

A concentração de óxidos de colesterol e de colesterol total nas LDL oxidadas (LDLox) e HDL utilizadas nos ensaios experimentais encontra-se na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Conteúdo de óxidos de colesterol e colesterol total (ng/μg de proteína ± DP) nas LDL oxidadas (LDLox) e HDL utilizadas nos experimentos.

	LDLox	HDL
	n=5	n=2
7-cetocolesterol	73,1±19	0,96±0,7
7β-hidroxicolesterol	38,1±7,7	0,64±0,1
7α-hidroxicolesterol	36,6±8,1	0,39±0,1
Colesterol-5,6α	16,2±4,2	0,17±0,04
Colesterol-5,6β	12,9±11	0,02±0,02
Colestan-3β	1,32±0,3	0,19±0,01
25 hidroxicolesterol	1,1±0,2	0,02±0,01
27 hidroxicolesterol	0,11±0,07	0,03±0,01
24,25 epoxicolesterol	-	1,9±0,2
Total de óxidos de colesterol	178,4±39	5,8±2,7
Colesterol total	99,1±6,8	93,7±0,9

Nas LDL oxidadas o conteúdo de óxidos de colesterol foi superior ao de colesterol total, sendo representado, principalmente, pelo 7-cetocolesterol (40,9%), 7 β -hidroxicolesterol (21,3%), 7 α -hidroxicolesterol (20,5%) e colesterol-5,6 β (9,1%). Nas HDL, o conteúdo total de óxidos de colesterol foi pequeno.

Em macrófagos controles, a adição de HDL ou HDL + T0901317, promoveu redução de, respectivamente, 16% e 22% no conteúdo total de esteróis (colesterol + óxidos de colesterol) em comparação às células mantidas apenas em meio de cultura. Não houve diferença no conteúdo total de esteróis intracelulares quando foram comparados os macrófagos tratados com HDL e HDL + T0901317(**Figura 8**). Em macrófagos GAD, não houve redução no conteúdo total de esteróis após adição de HDL ou HDL + T0901317 (**Figura 8**).

Figura 8. Conteúdo total de esteróis (colesterol + óxidos de colesterol) em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas). Macrófagos J774 foram incubados com LDL oxidada (50 $\mu\text{g/mL}$ de DMEM), por 48 h. Nas últimas 5 h, as células (macrófagos GAD) foram incubadas com glicolaldeído (0,25 mM) e indutor de LXR (T0901317; 1 μM). Macrófagos controles (C) foram mantidos em DMEM acrescido com T0901317. Após lavagem, as células foram incubadas, durante 5 h, com HDL apenas (50 $\mu\text{g/mL}$ de DMEM) ou HDL + T0901317. Os lípides intracelulares foram extraídos e aplicados em cromatógrafo a gás, acoplado à espectrometria de massa. 5 α -colestano foi utilizado como padrão interno.

O conteúdo de colesterol total também foi reduzido em macrófagos C, mediante incubação com HDL (17%) ou HDL + T0901317 (22%) o que, entretanto, não foi observado em macrófagos GAD (**Figura 9**).

Figura 9. Conteúdo de colesterol total em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas). Macrófagos J774 foram incubados com LDL oxidada (50 $\mu\text{g/mL}$ de DMEM), por 48 h. Nas últimas 5 h, as células (macrófagos GAD) foram incubadas com glicolaldeído (0,25 mM) e indutor de LXR (T0901317; 1 μM). Macrófagos controles (C) foram mantidos em DMEM acrescido com T0901317. Após lavagem, as células foram incubadas, durante 5 h, com HDL apenas (50 $\mu\text{g/mL}$ de DMEM) ou HDL + T0901317. Os lípides intracelulares foram extraídos e aplicados em cromatógrafo a gás, acoplado à espectrometria de massa. 5 α -colestano foi utilizado como padrão interno.

Em macrófagos C, a incubação com HDL e HDL + T0901317 reduziu, respectivamente, 16% e 21% o conteúdo de 7-cetocolesterol, mas não

afetou a concentração dos demais tipos de óxidos de colesterol. Em macrófagos GAD, por outro lado, o conteúdo de nenhum tipo de óxido de colesterol foi alterado pela presença de HDL ou HDL + T0901317 (**Figura 10 e tabela 3**).

Figura 10. Conteúdo de 7-cetocolesterol em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas). Macrófagos J774 foram incubados com LDL oxidada (50 μg/mL de DMEM), por 48 h. Nas últimas 5 h, as células (macrófagos GAD) foram incubadas com glicolaldeído (0,25 mM) e indutor de LXR (T0901317; 1μM). Macrófagos controles (C) foram mantidos em DMEM acrescido com T0901317. Após lavagem, as células foram incubadas, durante 5 h, com HDL apenas (50 μg/mL de DMEM) ou HDL + T0901317. Os lípides intracelulares foram extraídos e aplicados em cromatógrafo a gás, acoplado à espectrometria de massa. 5α colestano foi utilizado como padrão interno.

Tabela 3. Conteúdo de óxidos de colesterol e colesterol total (ng/μg de proteína celular, média ±DP) em macrófagos controles (C) ou tratados com glicolaldeído (GAD) incubados na presença de HDL apenas ou HDL e T0901317 (n=8). Os valores foram corrigidos pelo padrão interno, 5α colestano, e pelo conteúdo protéico celular.

Macrófago	C				GAD	
	-	HDL	HDL + T0901317	-	HDL	HDL + T0901317
7 cetocolesterol	86,7 ±16	72,8 ±14*	68,4 ±14*	83,8 ±19	74,2 ±13	79,8 ±19
7β hidroxicoolesterol	26,7±9	20,4 ±6	21,5 ±10	25,5 ±10	23,6 ±6	22,8 ±10
7α hidroxicoolesterol	9,2 ±4	8,1 ±3	8,1 ±5	9,4 ±3	8,8 ±2	8,6 ±4
colesterol 5,6 β	22,6 ±9	20 ±5	16,9 ±6	24,2 ±6	22,9 ±6	20,5 ±6
colesterol 5,6 α	7,1 ±2	6,6 ±2	5,5 ±2	7,4 ±2	6,2 ±2	6,7 ±3
24,25epoxicoolesterol	3,8 ±2	3,5 ±2	2,8 ±1	3,9 ±2	3,7 ±2	3,5 ±2
27 hidroxicoolesterol	0,48 ±0,2	0,51 ±0,3	0,44 ±0,2	0,55 ±0,3	0,52 ±0,2	0,48 ±0,2
25 hidroxicoolesterol	0,35±0,3	0,38 ±0,1	0,42 ±0,2	0,43 ±0,2	0,37 ±0,1	0,40 ±0,2
colestano 3 β	10,0 ±3	8,3 ±2	8,5 ±5	10,5 ±4	9,4 ±3	9,2 ±3
Colesterol total	244 ±57	203 ±47*	191 ±44*	227 ±52	214±53	224 ±50

* p<0,05 comparando HDL ou HDL+T0901317 com meio apenas em macrófagos

Em macrófagos C, sobrecarregados com LDL oxidada, observou-se aumento de 2,8 vezes no conteúdo do receptor ABCA-1, em comparação às células não incubadas com esta lipoproteína modificada. Este aumento foi de 1,8 vezes em macrófagos GAD, sobrecarregados com LDL oxidada.

Macrófagos C tratados com HDL e T0901317 (indutor sintético de LXR) apresentaram aumento de 2,9 e 2,4 vezes na expressão de ABCA-1 em comparação, respectivamente, às células incubadas com meio de cultura apenas ou HDL isoladamente (**Figura 11**).

Macrófagos GAD apresentaram menor conteúdo de ABCA-1 (45%) quando comparados aos macrófagos C (**Figura 11**). Nestas células, a adição de T0901317 não foi capaz de induzir a expressão de ABCA-1 (**Figura 12**).

Figura 11. Conteúdo de ABCA-1 em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas). Macrófagos J774 foram incubados com LDL oxidada (50 $\mu\text{g/mL}$ de

DMEM), por 48 h. Nas últimas 5 h, as células (macrófagos GAD) foram incubadas com glicolaldeído (0,25 mM) e indutor de LXR (T0901317; 1 μ M). Macrófagos controles (C) foram mantidos em DMEM acrescido com T0901317. Após lavagem, as células foram incubadas, durante 5 h, com HDL apenas (50 μ g/mL de DMEM) ou HDL + T0901317. Após lavagem, as células foram removidas em TBS contendo inibidores de protease. Quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 6% e imunoblot foi realizado após transferência para membrana de nitrocelulose e incubação com anticorpo anti ABCA-1, anticorpo secundário conjugado a peroxidase e revelação por ECL. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias, corrigidas pelo controle β -actina (n = 4).

Em comparação às células não tratadas com LDL oxidada, a expressão de ABCG-1 foi 30% menor em macrófagos C sobrecarregados com LDL (**figura 12**). Nestes macrófagos controles, a exposição à HDL favoreceu elevação de 49,7% no conteúdo de ABCG-1, sem alteração do mesmo mediante adição de HDL + T0901317 (**figura 13**).

Figura 12. Conteúdo de ABCG-1 em macrófagos sem incubação de LDL oxidada (sem LDLox; barra hachurada), macrófagos controles (C; barra cinza) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barra preta). Macrófagos J774 foram incubados na presença ou na ausência de LDL oxidada (50 $\mu\text{g/mL}$ de DMEM), por 48 h. Nas últimas 5 h, as células (macrófagos GAD) foram incubadas com glicolaldeído (0,25 mM). Macrófagos controles (C) e sem LDLox foram mantidos em DMEM.. Após lavagem, as células foram removidas em TBS contendo inibidores de protease. Quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 6% e imunoblot foi

realizado após transferência para membrana de nitrocelulose e incubação com anticorpo anti ABCG-1, anticorpo secundário conjugado a peroxidase e revelação por ECL. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias, corrigidas pelo controle β -actina (n = 4).

Em macrófagos GAD a pré-incubação com LDL oxidada não condicionou diferença no conteúdo de ABCG-1, em comparação às células não sobrecarregadas com LDL oxidada (**figura 12**). A adição de HDL aos macrófagos GAD reduziu em 36,6% a expressão de ABCG-1 em comparação aos macrófagos C incubados com HDL.

Macrófagos GAD incubados com HDL ou HDL + T0901317 apresentaram redução na expressão de ABCG-1, quando comparados às células GAD mantidas apenas em meio de cultura (**figura 13**).

Figura 13. Conteúdo de ABCG-1 em macrófagos controles (C; barras cinzas) e macrófagos tratados com glicolaldeído (GAD; barras pretas). Macrófagos J774 foram incubados com LDL oxidada (50 $\mu\text{g/mL}$ de DMEM), por 48 h. Nas últimas 5 h, as células (macrófagos GAD) foram incubadas com glicolaldeído (0,25 mM) e indutor de LXR (T0901317; 1 μM). Macrófagos controles (C) foram mantidos em DMEM acrescido

com T0901317. Após lavagem, as células foram incubadas, durante 5 h, com HDL apenas (50 μ g/mL de DMEM) ou HDL + T0901317. Após lavagem, as células foram removidas em PBS contendo inibidores de protease. Quantidades iguais de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 6% e imunoblot foi realizado após transferência para membrana de nitrocelulose e incubação com anticorpo anti ABCG-1, anticorpo secundário conjugado a peroxidase e revelação por ECL. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias, corrigidas pelo controle β -actina (n = 4).

DISCUSSÃO

Produtos de glicação avançada associam-se independentemente com o desenvolvimento da aterosclerose no diabetes melito (Peppia M, Raptis SA. 2008). No presente estudo, avaliamos se a glicação avançada de macrófagos, induzida pelo tratamento com glicolaldeído, altera a distribuição seletiva de óxidos de colesterol e o conteúdo total de esteróis intracelulares, após incubação com HDL ou HDL + T0901317. Óxidos de colesterol modulam a exportação do excesso de colesterol por estimularem a expressão de receptores de apo A-I e HDL, respectivamente, ABCA-1 e ABCG-1 (Adomi MP et al. 2007). Por outro lado, algumas espécies de óxidos de colesterol, tipicamente presentes em lesões ateroscleróticas, associam-se ao maior insulto inflamatório celular e morte por apoptose (Brown AJ, Jessup W, 1999).

Nas LDL oxidadas *in vitro*, as quais foram utilizadas para sobrecarregar os macrófagos, previamente ao tratamento com HDL ou HDL + T0901317, os principais óxidos de colesterol formados foram os oxigenados na posição 7 da molécula do colesterol (7-cetocolesterol, 7 α -hidroxicolesterol e 7 β -hidroxicolesterol), sendo este dado concordante com os resultados obtidos por Jessup e Kritharides (2000). Em contrapartida, como era esperado, as HDL utilizadas neste estudo apresentaram pequenas quantidades de óxidos de colesterol. Estes podem, por sua vez, serem advindos de autooxidação do colesterol (óxidos de colesterol de origem não enzimática), ou por transferência a partir de lipoproteínas que contêm apoB

no plasma antes da ultracentrifugação (Lin CY e Morel DW, 1996). Coincidentemente, os valores de colesterol nas partículas de LDL oxidadas e de HDL, corrigidos por miligrama de proteína na partícula, foram similares. Isto, possivelmente, ocorreu porque no processo de oxidação mediado por sulfato de cobre o colesterol da LDL foi convertido em óxidos de colesterol, reduzindo gradativamente seu conteúdo na partícula, proporcionalmente ao tempo em que esta é mantida com o agente oxidante (Jessup W e Kritharides L, 2000).

Na ausência de LDL oxidada, apenas uma pequena quantidade de óxidos de colesterol foi detectada (2,07 ng/ µg de proteína) em relação ao conteúdo de colesterol total (114,79 ng/ µg de proteína) nos macrófagos. Sendo assim, a maior parte dos esteróis encontrados nos macrófagos sobrecarregados com LDL oxidada foi advinda destas lipoproteínas.

A HDL ou a incubação simultânea de HDL+ T0901317 foi incapaz de reduzir o conteúdo de esteróis totais em macrófagos GAD, o que foi representado, principalmente, pelo acúmulo de colesterol e 7-cetocolesterol.

Gelisse e cols (1999) demonstraram que o 7-cetocolesterol foi removido por partículas de apolipoproteína AI associadas a fosfolípidos, mas não para apolipoproteínas isentas em lípidos. Naquela época, a via de efluxo de óxidos de colesterol mediada pelo ABCG-1 não era conhecida, mas os achados refletem a afinidade da apolipoproteína A-I enriquecida com lípidos por este transportador. Interessante notar que o ABCA-1 cuja afinidade maior é para apo A-I dissociada não apresenta a capacidade de exportar óxidos de colesterol.

A HDL madura medeia a remoção celular de colesterol, fosfolípidos e óxidos de colesterol por interagir com os receptores de membrana, ABCG-1. O papel destes receptores na gênese e progressão da aterosclerose não está totalmente elucidado na literatura, visto que sua ablação gênica não necessariamente associa-se ao maior desenvolvimento de lesão aterosclerótica em diversos modelos animais, embora favoreça acúmulo maciço de colesterol nos pulmões (Kennedy MA et al., 2005). Além disso, *in vivo*, é possível que a atuação compensatória do ABCA-1 possa mascarar a ausência de efluxo mediado por ABCG-1.

O ABCA-1 contribui com a maior parcela de remoção de colesterol em células sobrecarregadas com este esterol. Isto se dá por sua interação específica com apolipoproteínas A-I, o que favorece a geração de partículas nascentes de HDL, as pré- β HDL. No presente estudo, nitidamente observou-se menor conteúdo de ABCA-1 em macrófagos GAD, com menor incremento em sua expressão após tratamento com HDL ou HDL + T0901317, em comparação aos macrófagos C nas mesmas condições experimentais.

Em nosso grupo, demonstrou-se que a albumina modificada por glicação avançada *in vitro* ou isolada do soro de portadores de diabetes melito com controle glicêmico inadequado, reduz a expressão de ABCA-1 e ABCG-1, comprometendo o efluxo de colesterol mediado por apo A-I e HDL (Machado AP et al., 2006; Pinto RS, et al, 2007; Machado-Lima A et al., 2011). A diminuição no conteúdo de ABCA-1 é independente de alteração

em seu mRNA (Passarelli M, et al, 2005) e parece vinculada à modificações pós-traducionais que contribuem para redução do conteúdo proteico final.

A albumina glicada é mais captada por macrófagos e induz a geração de espécies reativas de oxigênio, por meio do sistema NADPH oxidase e mitocondrial (Basta G, 2008 e Brownlee M, 2001). A associação entre estresse oxidativo e redução no conteúdo de ABCA-1 fica evidente mediante correção da expressão deste receptor, após tratamento com aminoguanidina, composto capaz de inibir a geração de espécies reativas de oxigênio em macrófagos tratados com albumina AGE (Pinto RS et al., 2011). A albumina glicada também sensibiliza macrófagos à estimulação inflamatória por calgranulinas e lipopolissacarídeos (Valencia JV et al., 2004) o que, juntamente com o estresse oxidativo, favorece o estresse do retículo endoplasmático. Interessante que todas estas situações - estresse oxidativo, inflamação e estresse de retículo - vinculam-se ao acúmulo de 7-cetocolesterol em macrófagos e ao grau de complexidade da lesão aterosclerótica *in vivo* e sensibilidade à ruptura (Yehuda H et al., 2011).

O tratamento de macrófagos com extrato lipídico obtido de lesão aterosclerótica carotídea aumentou a expressão de interleucina-6, TNF- α , cicloxigenase 2 e molécula de adesão intercelular (ICAM - *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) nestas células. A porção do extrato rica em colesterol e óxidos de colesterol (destes, principalmente, 7 α hidroxicolesterol, 7 β hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol e 26 hidroxicolesterol) foi a responsável pelo aumento na expressão destes mediadores inflamatórios (Yehuda H, 2011).

Castilho e colaboradores (2011) demonstraram maior expressão de marcadores de estresse do retículo endoplasmático e da resposta adaptativa ao acúmulo de proteínas mal enoveladas (UPR) em macrófagos tratados com albumina AGE, o que se associou à redução no conteúdo de ABCA-1. Interessante que a utilização de chaperona química (ácido fenilbutírico), que minimiza o estresse do retículo endoplasmático, foi capaz de restaurar a expressão de ABCA-1 nestas células.

No presente estudo, diferentemente do observado em macrófagos C, a HDL não foi capaz de reduzir o conteúdo de 7-cetocolesterol nos macrófagos GAD. Isto evidencia que a glicação prejudica a exportação deste óxido de colesterol. Embora o 7-cetocolesterol também esteja envolvido na inibição da síntese de colesterol pela modulação da atividade da HMG-CoA redutase, seus maiores efeitos residem na redução do efluxo de colesterol, indução de efeitos citotóxicos em células da parede vascular e em monócitos, além de apresentarem propriedades inflamatórias, trombóticas e oxidativas (Monier et al., 2003). Grande parte da disfunção que o 7-cetocolesterol provoca em macrófagos, reside no estímulo à geração de espécies reativas de oxigênio, com aumento da peroxidação lipídica celular (Monier et al., 2003).

O acúmulo intracelular de 7-cetocolesterol parece decorrer do prejuízo na expressão de ABCG-1 em macrófagos GAD, a qual foi 36,6% menor nas células tratadas com HDL em comparação às células C na presença desta lipoproteína. Isoda e cols (2007) demonstraram, em macrófagos submetidos à glicação avançada, que a redução do conteúdo

protéico final de ABCG-1 é resultado da menor taxa de transcrição de seu gene, independentemente do LXR. Em nosso estudo, não houve diferença no conteúdo celular de ABCG-1 entre macrófagos C e GAD, na ausência de HDL ou HDL + T0901317. Isto pode ser decorrente da sobrecarga prévia de LDL oxidada nestas células, o que ainda não foi analisado na literatura.

Animais com ablação gênica para ABCG-1 demonstram redução no efluxo de óxidos de colesterol, o que se reflete pelo acúmulo intracelular de 7-cetocolesterol (Terasaka N et al., 2007). Este evento, por si, pode não ser determinante na gênese da aterosclerose, como previamente comentado. No entanto, no diabetes melito frente às diversas alterações celulares e plasmáticas decorrentes da glicação avançada, o prejuízo no efluxo de 7-cetocolesterol e colesterol pelo ABCG-1, em adição à redução de ABCA-1 e prejuízo em demais etapas do transporte reverso de colesterol, pode exercer papel fundamental no desenvolvimento acelerado de aterosclerose.

Em conclusão, em macrófagos sobrecarregados com LDL oxidada, o tratamento com glicolaldeído diminui a exportação celular de colesterol e 7-cetocolesterol, mediada pela HDL. Isto é decorrente do menor conteúdo dos receptores ABCA-1 e ABCG-1 em macrófagos tratados com glicolaldeído, e pode contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose no diabetes melito e outras situações de estresse carbonila.

REFERÊNCIAS

- Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK, Thornalley PJ, Beisswenger PJ. Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 2005;28(10):2465.
- Anderson, M.M.; Requena, J.R.; Crowley, J.L.; Thorpe, S.R.; Heinecke, J.W. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N epsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* 1999;104: 103
- Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):9
- Beisswenger PJ, Howell SK, O'Dell RM, Wood MR, Touchette AD, Szwergold BS. α -Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*, 2001;24(4):726.
- Berrodin TJ, Shen Q, Quinet EM, Yudt MR, Freedman LP, Nagpal S. Identification of 5 α ,6 α -epoxycholesterol as a Novel Modulator of LXR Activity. *Mol Pharmacol*. 2010 Sep 13. [Epub ahead of print]
- Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Montange T, Vejux A, Pais de Barros JP, Monier S, Gambert P, Lizard G, Néel D. 7-Ketocholesterol-induced apoptosis. Involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic calcium-dependent transduction pathways. *FEBS J.* 2005 Jun;272(12):3093
- Björkhem I, Diczfalussy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002 1;22(5):734
- Björkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J. Clin. Invest* 2002. 110:725

- Bowden K, Ridgway ND. OSBP negatively regulates ABCA1 protein stability. *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):18210-7. Epub 2008 May 1.
- Browlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 2001;414: 813
- Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1999 Jan;142(1):1
- Brown AJ, Jessup W. Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol Aspects Med*. 2009 Jun;30(3):111
- Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res*. 1997 Sep;38(9):1730
- Brown AJ, Watts GF, Burnett JR, Dean RT, Jessup W. Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *J Biol Chem*. 2000 Sep 8;275(36):27627
- Castilho G., Okuda L.S., Nakandakare E.R., Laurindo F.R.M., Passarelli M. Inhibition of endoplasmic reticulum stress recovers ABCA-1 expression and apo A-I-mediated cholesterol efflux in macrophages submitted to glycoxidation *Atherosclerosis Supplements* 12, no. 1 (2011) 34P
- Castilho G., Philipson P.B., Pinto R.S., Nakandakare E.R., Quintão E.C.R., Passarelli M. Glycoxidation reduces cholesterol biosynthesis and increases cholesterol esterification in J-774 macrophages. *Diabetes*. 2007; 56 (suppl 1): 728-P.
- Cavelier C, Rohrer L, von Eckardstein A. ATP-Binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells. *Circ Res*. 2006 Nov 10;99(10):1060
- Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys*, 2003; 419: 25
- Erridge C, Webb DJ & SPICKETT CM 25-Hydroxycholesterol, 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol upregulate interleukin-8

- expression independently of Toll-like receptor 1, 2, 4 or 6 signalling in human macrophages *Free Radical Research*, March 2007; 41(3): 260
- Ferderbar S, Pereira EC, Apolinário E, Bertolami MC, Faludi A, Monte O, Calliari LE, Sales JE, Gagliardi AR, Xavier HT, Abdalla DS. Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23(1):35
- Gaus K, Dean RT, Kritharides L, Jessup W. Inhibition of cholesterol efflux by 7-ketocholesterol: comparison between cells, plasma membrane vesicles, and liposomes as cholesterol donors. *Biochemistry*. 2001a Oct 30;40(43):13002.
- Gaus K, Gooding JJ, Dean RT, Kritharides L, Jessup W. A kinetic model to evaluate cholesterol efflux from THP-1 macrophages to apolipoprotein A-1. *Biochemistry*. 2001b Aug 7;40(31):9363-73.
- Gelissen IC, Brown AJ, Mander EL, Kritharides L, Dean RT, Jessup W. Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol. *J. Biol Chem*. 1996
- Gesquière L, Loreau N, Blache D. Impaired cellular cholesterol efflux by oxysterol-enriched high density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*. 1997;23(4):541-7.
- Gill S, Chow R, Brown AJ. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised *Prog Lipid Res*. 2008 Nov;47(6):391
- Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1998 Jul 23;339(4):229.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*. 1955 Sep;34(9):1345-53.

- Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, Thomas MC, Forbes JM, O'Brien R, Cooper ME, Chin-Dusting JP, Sviridov D. Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia*. 2007;50(8):1770
- Isoda K, Folco EJ, Shimizu K, Libby P. AGE-BSA decreases ABCG1 expression and reduces macrophage cholesterol efflux to HDL. *Atherosclerosis*. 2007; 192(2):298
- Jessup W, Brown AJ. Novel routes for metabolism of 7-ketocholesterol. *Rejuvenation Res*. 2005 Spring;8(1):9
- Jessup W, Kritharides L. Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol*. 2000 Oct;11(5):473-81.
- Jessup W, Wilson P, Gaus K, Kritharides L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascul Pharmacol*. 2002 Apr;38(4):239
- Kannel WB. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. *JAMA*. 1996 May 22-29;275(20):1571-6.
- Karner G, Perktold K. Effect of endothelial injury and increased blood pressure on albumin accumulation in the arterial wall: a numerical study *J Biomech*. 2000 Jun;33(6):709
- Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*. 2005 Feb;1(2):121.
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buenting C, Heitmann K, Vlassara H. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(12):6474-9.
- Kritharides L, Jessup W, Mander EL, Dean RT. Apolipoprotein A-I-mediated efflux of sterols from oxidized LDL-loaded macrophage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:276

- Lapolla A, Flamini R, Dalla Vedova A, Senesi A, Reitano R, Fedele D, Basso E, Seraglia R, Traldi P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clin Chem Lab Med*, 41(9):1166-73, 2003.
- Leonarduzzi G, Gamba P, Sottero B, Kadl A, Robbesyn F, Calogero RA, Biasi F, Chiarpotto E, Leitinger N, Sevanian A, Poli G. Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. *Free Radic Biol Med*. 2005;39(9):1152
- Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*. 2005;96(12):1221-32.
- Lin CY, Morel DW. Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake. *J Lipid Res*. 1996;37(1):168-78.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Lyons MA, Brown AJ. 7-Ketocholesterol. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Mar-Apr;31(3-4):369
- Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão EC, Passarelli Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. *M. Int J Biochem Cell Biol*. 2006 Mar;38(3):392
- Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS., Sartori CH, Oliveira ER, Stefano JT, Nakandakare E.R., Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella L, Passarelli M. AGE-albumin induces intracellular lipid accumulation by modifying the expression of genes involved in macrophage reverse cholesterol transport and cholesterol homeostasis. *Atherosclerosis Supplements* Vol. 12, Issue 1, Pages 35
- Matsuki K, Tamasawa N, Yamashita M, Tanabe J, Murakami H, Matsui J, Imaizumi T, Satoh K, Suda T. Metformin restores impaired HDL-mediated cholesterol efflux due to glycation. *Atherosclerosis*. 2009; 206(2):434

- Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jürgens G, Nègre-Salvayre A, Bessède G, Lemaire-Ewing S, Néel D, Gamber P, Lizard G. Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 β -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate Biochemical and Biophysical Research Communications 2003;303:814
- Nagai R, Matsumoto K, Ling X, Suzuki H, Araki T, Horiuchi S. Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. Diabetes. 2000 Oct;49(10):1714-23.
- Odani, H.; Shinzato, T.; Matsumoto Y.; Usami J, Maeda K. Increase in three α,β -dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1999;256: 89.
- Passarelli M, Tang C, McDonald TO, O'Brien KD, Gerrity RG, Heinecke JW, Oram JF. Advanced glycation end product precursors impair ABCA1-dependent cholesterol removal from cells. Diabetes. 2005;54(7):2198
- Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidalo MA, Lizard G, Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum

stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2004 Dec;24(24):10703

Peppas M, Raptis SA. Advanced glycation end products and cardiovascular disease. *Curr Diabetes Rev.* 2008 May;4(2):92

Pinto R.S., Machado A.P., Paim B.A, Vercesi A.E., Nakandakare E.R., Quintão E.C., Passarelli M. Intracellular oxidative stress induced by advanced glycated albumin reduces ABCA-1, ABCG-1 and increases RAGE and CD-36 expression. *Diabetes.* 2007;56 (suppl 1): 724-P.

Pinto RS, Paim BA, Vercesi AE, Castilho GNakandakare ER, Quintão EC, Passarelli M. The reduction in hdl receptor levels in macrophages is related to ros generation induced by advanced glycated albumin. *Atherosclerosis* 2011;12 (suppl 1):35-P

Prunet C, Montange T, Véliz A, Laubriet A, Rohmer Jf, Riedinger Jm, Athias A, Lemaire-Ewing S, Néel D, Petit Jm, Steinmetz E, Brenot R, Gambert P, Lizard G. Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry A.* 2006;69(5):359

Schroepfer Jr, G.J. Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes *Physiol. Rev.* 80: 361-554, 2000

Sevanian A, Berliner J, Peterson H. Uptake, metabolism, and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5,6-epoxides in rabbit aortic endothelial cells. *J Lipid Res.* 1991 Jan;32(1):147-55.

Shibata N, Glass CK. Macrophages, Oxysterols and Atherosclerosis. *Circ J*. 2010 Sep 11. [Epub ahead of print]

Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis*. 1987 Mar-Apr;7(2):135

Terasaka N, Wang N, Yvan-Charvet L, Tall AR. High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(38):15093

Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X Receptor Signaling Pathways in Cardiovascular Disease *Molecular Endocrinology* 2003;17(6):985

Vaccaro O, Eberly LE, Neaton JD, Yang L, Riccardi G, Stamler J; Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Impact of diabetes and previous myocardial infarction on long-term survival: 25-year mortality follow-up of primary screeners of the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Arch Intern Med*. 2004 Jul 12;164(13):1438.

Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J, Hughes TE. Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia*. 2004;47(5):844

- Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Brown AJ. Endogenous 24(S),25-epoxycholesterol fine-tunes acute control of cellular cholesterol homeostasis. *Biol Chem*. 2008 Jan 11;283(2):700
- Xu M, Zhou H, Tan KC, Guo R, Shiu SW, Wong Y. ABCG1 mediated oxidized LDL-derived oxysterol efflux from macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Dec 25;390(4):1349
- Yan D, Jauhiainen M, Hildebrand RB, Willems van Dijk K, Van Berkel TJ, Ehnholm C, Van Eck M, Olkkonen VM. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Jul;27(7):1618
- Yan D, Mäyränpää MI, Wong J, Perttilä J, Lehto M, Jauhiainen M, Kovanen PT, Ehnholm C, Brown AJ, Olkkonen VM. OSBP-related protein 8 (ORP8) suppresses ABCA1 expression and cholesterol efflux from macrophages *J Biol Chem*. 2008 Jan 4;283(1):332
- Yehuda H, Szuchman-Sapir A, Khatib S, Musa R, Tamir S. Human atherosclerotic plaque lipid extract promotes expression of proinflammatory factors in human monocytes and macrophage-like cells. *Atherosclerosis*. 2011 Aug 5. [Epub ahead of print]
- Yoshioka N, Adachi J, Ueno Y, Yoshida K. Oxysterols increase in diabetic rats. *Free Radic Res*. 2005 Mar;39(3):299