Aécio Lopes de Araújo Lira

Albumina sérica modificada por carbamoilação prejudica o efluxo de colesterol de macrófagos na doença renal diabética

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Silva Queiroz

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lira, Aécio Lopes de Araújo
Albumina sérica modificada por carbamoilação prejudica o efluxo de colesterol de macrófagos na doença renal diabética / Aécio Lopes de Araújo Lira. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Márcia Silva Queiroz.

Descritores: 1.Carbamilação de proteínas 2.Albuminas 3.Produtos finais de glicação avançada 4.Diabetes mellitus 5.Nefropatias diabéticas 6.HDL-colesterol

USP/FM/DBD-082/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida e pela saúde.

À minha esposa Aline, pelo amor diário, apoio incondicional e por acreditar nesse sonho comigo. Com você ao meu lado, não existe o impossível.

Ao meu filho Aecinho, por me fazer uma pessoa melhor a cada dia.

À minha mãe Jacinta, pela dedicação à família e aos meus estudos desde sempre.

Ao meu pai Edwaldo, pelo incentivo e exemplo de trabalho.

À minha irmã Ana Luiza, pelo carinho e por vibrar com minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Márcia Queiroz: dedicação, comprometimento, humildade, foco e serenidade. Além da impecável orientação no meu doutorado, esses são alguns dos valores que a senhora me ensinou nesses 5 anos de trabalho juntos e que vou levar para sempre. Obrigado por cobrar o melhor de mim e tornar esse sonho, uma realidade. Gratidão!

À Dra. Marisa Passarelli, por ter me abraçado desde início, acreditado no nosso projeto e com muito empenho foi minha co-orientadora no doutorado. Nas dificuldades, apontava soluções. Nas dúvidas, trazia experiência. Nada seria possível sem você. Obrigado querida Marisa.

Ao Dr. Raphael de Souza Pinto, meu grande irmão de bancada, por todo apoio e entusiasmo na pesquisa. Obrigado por acreditar sempre no meu potencial. Nossa amizade é forte. Minha gratidão será eterna.

À Monique de Fátima Mello Santana, minha parceira e amiga do coração. Agradeço enormemente sua dedicação e ajuda na bancada. Vivemos e aprendemos. Nossa sintonia foi perfeita e juntos vamos celebrar as conquistas na pós-graduação.

À Dra. Edna Regina Nakandakare, pela liderança a frente do laboratório de lípides, dando todo apoio e incentivo para os nossos trabalhos, e compartilhando sempre sua experiência cientifica e prática clínica.

Ao Professor Éder Quintão, pelo exemplo de vida, dedicação e amor à ciência. Uma inspiração para todos nós, jovens pesquisadores. Anos de experiência não tiram o brilho nos olhos, seja nas novidades de grandes journals, seja ao ver dados preliminares dos nossos experimentos. A convivência com senhor é mesmo um grande privilégio.

Ao Dr. Rodrigo Tallada Iborra, pelo acolhimento desde o início e introdução nas práticas do laboratório. Presença constante para as dúvidas e apoio de irmão mais velho.

À Dra. Adriana Machado Saldiba de Lima, por me apresentar as famosas albuminas e fazer-me acreditar (até mais do eu) no meu potencial. Sua leveza e tranquilidade são inspiração para mim.

À Dra. Tatiana Souza Pelaes, uma grande amiga e companheira na pós-graduação. Demos os primeiros passos juntos nessa longa caminhada, um sempre incentivando ao outro. Essa conquista é nossa. Obrigado por tudo, Tati!

Ao Dr. Carlos André Minanni, pela parceira mundo novo do laboratório. Médico como eu, compartilhamos dúvidas e aprendizados, como também o incentivo de seguir em frente. Obrigado, amigo!

À Fabiana Ferreira, por todo suporte e experiência na bancada. Obrigado pela paciência e prestatividade

À Dra. Paula Ramos Pinto, pela alegre convivência em tantos anos de pós-graduação. Obrigado pelo incentivo e conselhos na minha jornada.

À Dra. Lígia Shimabukuro Okuda, pela paciência e generosidade. Obrigado pelos ensinamentos.

À Dra. Valéria Sutti Nunes, pela atenção e cuidado especial. Agradeço por toda ajuda.

A todos que fazem a família LIM-10: Dra. Patrícia Cazita, Dr. Sérgio Catanozi, Dra. Mônica Spadoni, Dra. Ana Maria Lottenberg, Kelly Gomes, Guilherme André Marcelino, Mariana Ribeiro, Guilherme Ferreira, Ana Paula Bocchi, Vanessa del Bianco, Elda Dantas, Lis Mie e Ana Elise,. Obrigado por todo apoio e parceria na minha caminhada.

À Cláudia Souza, aquele primeiro bom dia especial ao chegar ao LIM-10, sempre pronta para nos ajudar com os mais variados assuntos.

À Rosibel, obrigado por todo carinho e por todos os cafezinhos especiais.

Aos colegas nefrologistas, Dra. Sílvia Titan, Dra. Lígia Battaini e Dr. Helomar Moraes, que juntos comigo fizeram parte do ambulatório multidisciplinar de Doença Renal Diabética do HCFMUSP. Obrigado pela parceria, troca de experiências e ensinamentos compartilhados em todos os anos de trabalho.

À toda equipe multidisciplinar Ambulatório Multidisciplinar de Doença Renal Diabética do Serviço de Nefrologia do HCFMUSP: Nutricionista Joyce Gouveia, Enfermeira Ísis Ferreira e toda equipe de enfermagem. Obrigado pela convivência tão proveitosa e apoio nas coletas dos pacientes.

À toda equipe Ambulatório de Diabetes do HCFMUSP, em especial, Dra. Sandra Villares e Dra. Márcia Nery, pelo apoio e incentivo.

Ao João Ítalo França, pelo excelente trabalho nas análises estatísticas.

EPÍGRAFE

“I am a firm believer in the theory that you can do or be anything that you wish in this world, within reason, if you are prepared to make the sacrifices, think and work hard enough and long enough”.

Frederick Grant Banting, Nobel de Fisiologia e Medicina em 1923, descoberta da insulina

- *Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípides (LIM-10) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Ambulatório de Diabetes e Ambulatório Multidisciplinar de Doença Renal Diabética do Serviço de Endocrinologia e Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;*
- *Projeto foi registrada na Plataforma Brasil (Parecer #1.982.033), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (CAPPesq #15024) e Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA #1015/2018) da Faculdade de Medicina da USP;*
- *Apoio financeiro CAPES/FAPESP (2015/21072-5)*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1. Doença renal diabética: conceito e epidemiologia..... 1

1.2. Definição e classificação da doença renal crônica..... 3

1.3. Diabetes *mellitus* e produtos de glicação avançada..... 4

1.4. Doença renal do diabetes e carbamoilação..... 7

1.5. Transporte reverso de colesterol, doença renal e diabetes.....10

2. JUSTIFICATIVA 15

3. OBJETIVOS..... 16

4. MÉTODOS..... 17

4.1. Casuística 17

4.2. Delineamento do estudo.....18

4.3. Metodologia 18

4.3.1. Isolamento e purificação de albumina do soro humano..... 18

4.3.2. Isolamento de lipoproteínas do plasma e acetilação de LDL..... 19

4.3.3. Determinação de produtos de glicação avançada no plasma..... 20

4.3.4. Determinação de proteínas carbamoiladas no plasma e na albumina..... 21

4.3.5. Quantificação de homocitrulina no plasma 21

4.3.6. Determinação de pentosidina e AGE total na albumina 22

4.3.7. Cultura de macrófagos derivados de células da medula óssea.... 23

4.3.8. Tratamento de macrófagos derivados de células da medula óssea e efluxo de ^{14}C-colesterol 23

4.4. Cálculo da amostra 24

4.5. Análise estatística 25

5. RESULTADOS 26

6. DISCUSSÃO 36

7. CONCLUSÃO 42

8. ANEXOS 43

8.1. Termo de consentimento livre e esclarecido 43

8.2. Plataforma Brasil 46

8.3. Comissão de Ética no uso de animais 49

9. REFERÊNCIAS 50

LISTA DE ABREVIATURAS

3-DG: 3-deoxiglicosona

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

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

ADA: *American Diabetes Association*

AGE: produtos de glicação avançada

ALE: produtos avançados de lipoxidação

Apo: apolipoproteína

Anti-CBL: anti-carbamil-lisina

AVE: acidente vascular encefálica

C^{14}: carbono 14

CBL: carbamil-lisina

CE: colesterol esterificado

CETP: proteína de transferência de colesterol esterificado

CL: colesterol livre

CML: carboximetil-lisina

CT: colesterol total

DAC: doença arterial coronariana

DG: deoxiglicosona

DM1: diabetes *mellitus* tipo 1

DM2: diabetes *mellitus* tipo 2

DRC: doença renal crônica

DRD: doença renal diabética

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAFA: albumina isenta de ácidos graxos

FCS: soro fetal de bezerro

FPLC: cromatografia líquida para separação rápida de proteínas

Fruto: frutosamina

GAD: glicolaldeído

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GO: glioxal

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HbA1c: hemoglobina glicada

HCit: homocitrulina

HDL: lipoproteína de densidade alta

HDL-c: HDL colesterol

IAM: infarto agudo do miocárdio

IDF: *International Diabetes Federation*

IL: interleucina

KDIGO: *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

KDOQI*: Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*

LCAT: lecitina colesterol aciltransferase

LDL: lipoproteínas de densidade baixa

LDL-c: LDL colesterol

MGO: metilglioxal

NF-KB: fator nuclear KB

NKF: *National Kidney Foundation*

PBS: solução tampão fosfato

PCR: proteína C reativa

PTMDPs: produtos derivados da modificação pós-traducionais

RAGE: receptor para produtos de glicação avançada

ROS: espécies reativas de oxigênio

SBN: Sociedade Brasileira de Nefrologia

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

SREBP: proteína de ligação ao elemento regulador esterol (*sterol-regulatory element-binding protein)*

TG: triglicérides

TNF: fator de necrose tumoral

TRC: transporte reverso de colesterol

VLDL: lipoproteínas de densidade muita baixa

VLDL-c: VLDL colesterol

RESUMO

Lira ALA. *Albumina sérica modificada por carbamoilação prejudica o efluxo de colesterol de macrófagos na doença renal diabética* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: A doença renal diabética (DRD) está associada a elevada mortalidade por doenças cardiovasculares, mesmo com controle intensivo dos fatores de risco tradicionais. Por isso, considera-se que fatores de risco não-tradicionais como inflamação, estresse oxidativo, acúmulo de toxinas urêmicas e de produtos finais de glicação avançada (AGE) estejam envolvidos na progressão da aterosclerose na DRD. Neste sentido, buscamos caracterizar o perfil de glicação e carbamoilação da albumina isolada na presença das duas doenças, diabetes *mellitus* e DRD, e sua influência sobre o efluxo de colesterol em macrófagos. MÉTODOS: Este estudo transversal incluiu indivíduos com diabetes tipo 2 (DM2) e DRD, com controle glicêmico semelhante, mas em diferentes estágios de doença renal crônica (DRC) e indivíduos controle saudáveis, pareados por idade e sexo. Dosamos carboximetil-lisina (CML), homocitrulina (HCit) no plasma, por ELISA; proteínas carbamoiladas (CBL) no plasma e nas albuminas isoladas, também por ELISA e AGE total e pentosidina nas albuminas isoladas, por fluorescência. Macrófagos, extraídos da medula óssea de camundongos machos da linhagem C57/BL6, foram tratados por 18 horas e 48 horas com albumina isolada dos participantes e avaliou-se o efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL_2 ou HDL_3. Para comparações entre os grupos utilizamos os testes de Kruskal-Wallis, Jonckheere-Terpstra e o pós-teste de Brunner. O nível de significância adotado foi $p<0,05$. RESULTADOS: A determinação de CML, HCit, CBL, no plasma; AGE total e pentosidina nas albuminas, não diferiram entre os grupos; no entanto, as proteínas carbamoiladas nas albuminas isoladas foram mais elevadas nos estágios mais avançados de DRC ($p=0,0414$). Houve redução do efluxo de ^{14}C-colesterol após tratamento por 18 horas com albumina isolada de pacientes com taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) <60mL/min/1,73m² comparado com controle mediado por HDL_2 ($p=0,0288$) e HDL_3 ($p<0,0001$); assim como comparado com TFGe ≥60mL/min/1,73m² por HDL_2 ($p=0,0001$) e HDL_3 ($p<0,0001$); A incubação por 48 horas com albumina isolada reduziu o efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL_2 no estágio G5 (TFGe<15 mL/min/1,73m²) em comparação ao grupo controle e demais estágios de DRC ($p=0,0274$). CONCLUSÕES: A albumina isolada de indivíduos com DM2 e DRD com TFG <60mL/min/1,73m² é modificada por maior carbamoilação, prejudicando o efluxo de colesterol mediado por HDL_2 e HDL_3 e isto, possivelmente, favorece o acúmulo de lípides em macrófagos e distúrbios no transporte reverso de colesterol. Estes resultados podem contribuir

para um melhor entendimento sobre o processo aterosclerótico em indivíduos com diabetes e doença renal.

Descritores: Carbamilação de proteínas; Albuminas; Produtos finais de glicação avançada; Diabetes *mellitus*; Nefropatias diabéticas; HDL-colesterol.

ABSTRACT

Lira ALA. *Serum albumin modified by carbamoylation impairs macrophage cholesterol efflux in diabetic kidney disease* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

INTRODUCTION:Cardiovascular disease is the leading cause of death in patients with diabetes *mellitus* (DM) and chronic kidney disease (CKD). Abnormalities in lipid metabolism, chronic inflammation, accumulation of uremic toxins and advanced glycation end products may contribute to worsening atherosclerosis and cardiovascular endpoints. This study characterized the glycation and carbamoylation profile of serum albumin isolated from individuals with diabetic kidney disease (DKD), and its influence on cholesterol efflux mediated by HDL_2 and HDL_3 in macrophages. METHODS: This cross-sectional study enrolled patients with type 2 DM (T2DM) and different estimated glomerular filtration rate (eGFR), but similar glycemic control, and subjects without DM and CKD as control group. We evaluated glycation and carbamoylation profile by measurement of carboxymethyl lysine (CML), homocitrulline (HCit) and carbamoylated proteins (CBL) in plasma by ELISA, and in the isolated albumins we quantified CBL (ELISA), total AGE and pentosidine by fluorescence. Macrophages were treated for 18 or 48 hours with albumin isolated from participants, and ^{14}C-Cholesterol efflux mediated by HDL_2 or HDL_3 was measured. The Kruskal-Wallis test, Jonckheere-Terpstra test and Brunner's posttest were used for comparisons among groups. The level of significance adopted was $p<0.05$. RESULTS: The determination of CML, HCit, CBL, in plasma; Total AGE and pentosidine in albumins, did not differ between groups; however, carbamoylated proteins in the isolated albumins were higher in the more advanced stages of CKD ($p=0.0414$). There was reduction in the ^{14}C-cholesterol efflux after treatment for 18 hours with albumin isolated from patients with eGFR <60mL/min /1.73m² compared with control group mediated by HDL_2 ($p=0.0288$) and HDL_3 ($p<0.0001$); as well as compared with eGFR ≥60mL/min/1.73m² per HDL2 ($p=0.0001$) and HDL_3 ($p<0.0001$).Treatment with albumin isolated for 48 hours showed that G5 stage (eGFR<15 mL/min/1.73m²) had a lower percentage of ^{14}C-cholesterol efflux mediated by HDL_2 compared to control and other CKD groups ($p=0.0274$). CONCLUSIONS: The albumin isolated from individuals with T2DM and CKD with eGFR<60 mL/min/1.73m², suffer greater carbamoylation and it impairs the cholesterol efflux mediated by HDL_2 and HDL_3. In turn, this could promote lipids accumulation in macrophages and disorders in reverse cholesterol transport. These results contribute to a better understanding of the atherosclerotic process in this population with diabetes and kidney disease.

Descriptors: Protein carbamylation; Albumins; Glycation end products, advanced; Diabetes *mellitus*; Diabetic nephropaties; HDL-cholesterol.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal diabética: conceito e epidemiologia

A Doença renal do diabetes *mellitus* ou doença renal diabética (DRD) é a terminologia adotada pela *National Kidney Foundation* (NKF) desde 2007 para representar as anormalidades clínicas, estruturais e funcionais dos rins, secundárias ao diabetes *mellitus* (DM). O termo veio em substituição ao anteriormente utilizado, nefropatia diabética, o qual passou a ser reservado para lesão renal causada pelo DM diante de comprovação histopatológica. Desta forma, a DRD representa todas as situações nas quais o DM é a causa presumida para da doença renal, tais como a doença ateroembólica, nefropatia isquêmica e fibrose intersticial [1,2]. Em junho de 2019, o KDIGO (*The Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) publicou um relatório com o objetivo de padronizar e refinar a nomenclatura para descrever a função e a doença renal, bem como desenvolver um glossário a ser usado nas publicações científicas. As recomendações direcionam para adoção de termos centrados na pessoa, específicos e consistentes com a nomenclatura utilizada em suas diretrizes [3].

Segundo o último Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica, publicados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), em junho de 2017, cerca de 126 mil pacientes estavam sob tratamento dialítico, dos quais 82% estavam sendo tratados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), representando grande utilização de recursos públicos [4]. O DM foi o maior responsável pelos novos casos (40%) e a segunda maior causa de insuficiência renal tratada com diálise (31%), apenas menor do que a nefropatia hipertensiva (34%). Observa-se na população brasileira, a tendência de igualar-se às estatísticas mundiais, as quais apontam

o DM como a principal causa de insuficiência renal [5]. Isto se torna alarmante diante das projeções de aumento na prevalência mundial de DM. A estimativa é de 700 milhões de pessoas com DM em 2045, de acordo com IDF (*International Diabetes Federation)* [6]. Se considerarmos que a DRD acomete 20-40% dos pacientes com DM [5,7], teríamos entre 140 a 280 milhões de pessoas com diabetes e doença renal, gerando enorme impacto na economia e nos gastos estimados com saúde.

Os fatores riscos tradicionais como o próprio diabetes *mellitus*, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e tabagismo são as principais causas da aterosclerose avançada na doença renal crônica (DRC) e, consequentemente, da maior morbimortalidade por doença cardiovascular (DCV). A disfunção renal modifica a composição e qualidade de lipoproteínas plasmáticas em favor de um perfil mais aterogênico [8]. O risco para DCV está presente até mesmo nos estágios iniciais e eleva-se sobremaneira com a queda da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e avanço da doença renal. A probabilidade de uma pessoa com DRC morrer de doença cardiovascular é 10-20 vezes maior que suas chances de sobreviver até a perda completa da função renal [9]. Mesmo após o início da terapia renal substitutiva a mortalidade mantém-se elevada, em torno de 20% ao ano, segundo dados da SBN [4].

Os fatores de risco tradicionais não suficientes para explicar a maior mortalidade cardiovascular nos pacientes com DRC [10,11]. Acredita-se que outros fatores de riscos não-tradicionais estejam envolvidos na progressão da aterosclerose na DRD, como a inflamação crônica, aumento de toxinas urêmicas, proteínas modificadas por glicação avançada e carbamoilação, estresse oxidativo, depleção de óxido nítrico, hiper-homocisteinemia e

modificações no metabolismo de lípides, cálcio e fósforo. Assim, o melhor entendimento da participação destes fatores de risco não-tradicionais contribuirá para adequar estratégias de tratamento e prevenção da doença cardiovascular na DRD [8].

1.2 Definição e classificação da doença renal crônica

Apesar da mudança na terminologia, não há uma classificação ou estadiamento específico para a DRD, adota-se os mesmos parâmetros da DRC; ou seja, segundo diretrizes do KDIGO (*The Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), define-se DRC como anormalidade da estrutura ou da função renal, presente por mais de 3 meses e com implicações para a saúde. Os critérios para diagnóstico incluem marcadores de lesão renal, como albuminúria, alterações de sedimento urinário e eletrólitos; assim como modificações histológicas ou estruturais, ou diminuição da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) para valor < 60 mL/min/1,73 m^2 [12].

Os parâmetros utilizados na classificação da DRC englobam: causa, TFGe e categoria de albuminúria. A identificação de possíveis causas auxilia na escolha terapêutica e predição de resultados, enquanto a gravidade, avaliada pela TFGe e excreção urinária de albumina (EUA) , está associada a maior risco de efeitos adversos, progressão da doença renal e morte [12].

As diretrizes de diversas entidades voltadas ao estudo do DM recomendam rastrear a DRC no momento do diagnóstico nos indivíduos com DM2 e, após 5 anos, para aqueles com DM1 [13,14]. Para tanto, utiliza-se a dosagem de albumina em urina de 24 horas para cálculo de EUA ou, albumina e creatinina em amostra de urina para relação albumina/creatinina (Tabela 1.1).

A creatinina sérica é empregada no cálculo da TFGe, segundo a equação definida pela CKD-EPI (*The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*), como mostrado na Tabela 1.2 [15,16, 17,18,19].

Tabela 1.1 - Categorias de albuminúria na doença renal crônica

Categoria	Excreção urinária de albumina (mg/24h)	Relação albumina/creatinina urinária (mg/g de creatinina)	Classificação
A1	< 30	< 30	Normal ou discretamente aumentada
A2	30 – 299	30 – 299	Moderadamente aumentada
A3	≥ 300	≥ 300	Acentuadamente aumentada

A: albuminúria ; Fonte: adaptado de Inker *et al.* [18]

Tabela 1.2 - Estadiamento e classificação da doença renal crônica

Estágio	Taxa de Filtração Glomerular (mL/min/1,73m²)	Classificação
G1	≥90	Função renal normal ou aumentada*
G2	60 – 89	Levemente reduzida*
G3a	45 – 59	Leve a moderadamente reduzida
G3b	30 – 44	Moderada a gravemente reduzida
G4	15 – 29	Gravemente reduzida
G5	<15	Insuficiência renal

* relativo a adulto jovem; na ausência de evidências de lesão renal, as categorias G1 e G2 não preenchem critérios para doença renal crônica. Fonte: adaptado de Inker *et al.* [18].

1.3 Diabetes *mellitus* e produtos de glicação avançada

O DM caracteriza-se por defeitos na ação ou na secreção de insulina, ou ambos, resultando em hiperglicemia e diversos outros distúrbios metabólicos. Desta forma, o aumento na disponibilidade de glicose na via glicolítica promove a geração de espécies reativas de oxigênio (do inglês: *reactive oxygen species* ou ROS) pela mitocôndria, com subsequente inibição da atividade da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Isto favorece a síntese de metilglioxal (MGO), composto dicarbonila que promove a rápida e irreversível modificação de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolípides, por glicação avançada. A ligação covalente, não-enzimática, entre a glicose ou outros açúcares redutores com os resíduos de lisina e arginina de proteínas e, ou também, com grupos amino-terminal de proteínas e fosfolípides, promove a

formação reversível de bases de Schiff, que por rearranjos moleculares formam os produtos de Amadori ou frutosil-lisina, denominados produtos iniciais de glicação. Os produtos de Amadori possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam, dando origem aos produtos de glicação avançada (do inglês, *advanced glycation endproducts*, ou AGEs) (Figura 1.1). O aumento na produção de AGEs e de outros processos intracelulares como: 1) aumento do fluxo de polióis; 2) aumento do fluxo na via das hexosaminas e 3) ativação de proteína cinase C exacerbam o estresse oxidativo intracelular, perpetuando a geração dos AGEs, que alteram a estrutura e função de proteínas, lípides e ácidos nucleicos, desorganizando a matriz extracelular [20, 21]. Além disso, a presença de AGEs altera o fluxo de lípides celulares, favorecendo o acúmulo de colesterol em macrófagos arteriais [22, 23, 24].

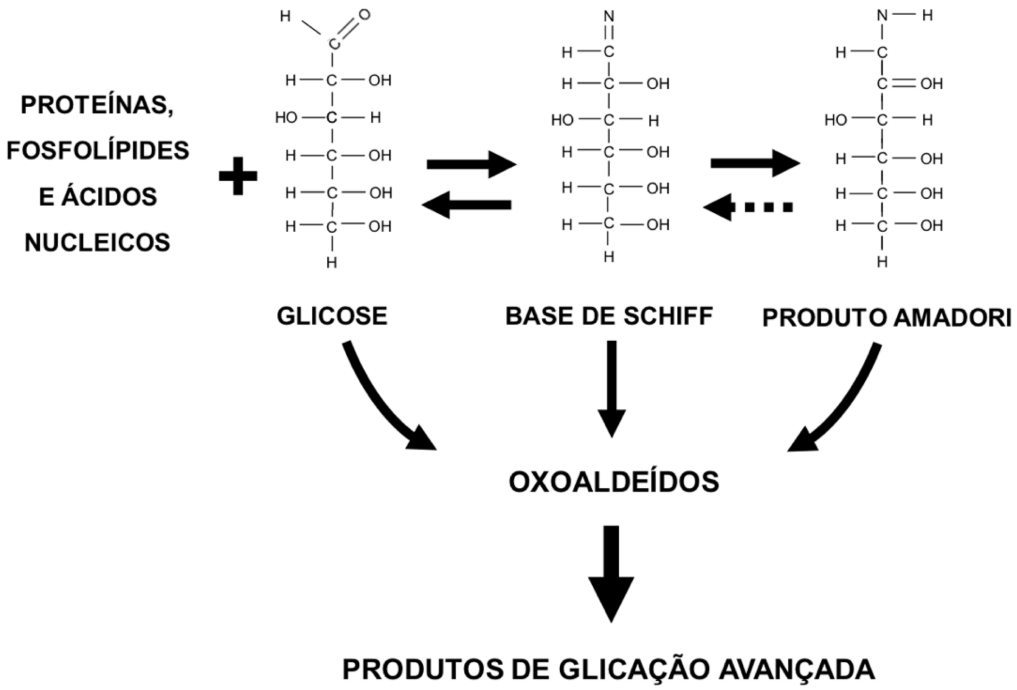


Figura 1.1 Modelo esquemático da glicação de proteínas, fosfolípides, ácidos nucleicos e formação de produtos de glicação avançada

A oxidação da glicose, a degradação da base de Schiff e do produto Amadori também geram oxoaldeídos, como MGO, GO, glicolaldeído (GAD) e 3-deoxiglicosona, os quais interagem com proteínas e lípides, originando AGEs de diferentes complexidades, fluorescência e capacidade de formar cruzamentos entre moléculas [25, 26, 27]. Por exemplo, a carboximetil-lisina (CML), originada da reação do GO com GAD e abundante na lesão aterosclerótica, é um importante marcador do insulto oxidante [28, 29, 30, 31].

Os AGEs se ligam aos seus receptores (RAGE, do inglês *Receptor for Advanced Glycation End Products*) e ativam vias de sinalização intracelulares, aumentando a formação de ROS, fator de transcrição nuclear KB (NF-KB) e a expressão de moléculas de adesão, como molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), interleucina-1 (IL-1), IL-6 , fator de necrose tumoral-α (TNF-α), endotelina-1 e do próprio RAGE; desta forma, propagam a resposta inflamatória e vasoconstrição [31, 32].

1.4 Relação entre doença renal, carbamoilação e produtos de glicação avançada

O declínio da função renal expõe o organismo à maiores concentrações de ureia, gerada no fígado durante o catabolismo de aminoácidos e compostos nitrogenados, estimulando a reação carbamoilação (Figura 2), com modificação pós-traducional de proteínas [8, 33] . A ureia dissocia-se em amônia e cianeto o qual se isomeriza para ácido isociânico, um composto eletrófilo altamente reativo. A carbamoilação é o resultado da ligação covalente não-enzimática do ácido isociânico com resíduos de lisina e cisteína das proteínas, gerando, por

exemplo, a homocitrulina (HCit), formada pela ligação do ácido isociânico a resíduos de lisina. Estas mudanças, com formação de ligações covalentes adicionais, são chamadas produtos derivados da modificação pós-traducionais (PTMDPs) e são responsáveis por alterações estruturais e funcionais das proteínas [9,33].

O ácido isociânico, gerado pela decomposição espontânea da ureia em subprodutos como o cianato, aumenta proporcionalmente com a diminuição da função renal. Do mesmo modo, a oxidação de tiocianato catalisada pela mieloperoxidase, em presença de peróxido de hidrogênio, forma cianato e promove a carbamoilação de proteínas em locais de inflamação [34, 35, 36].

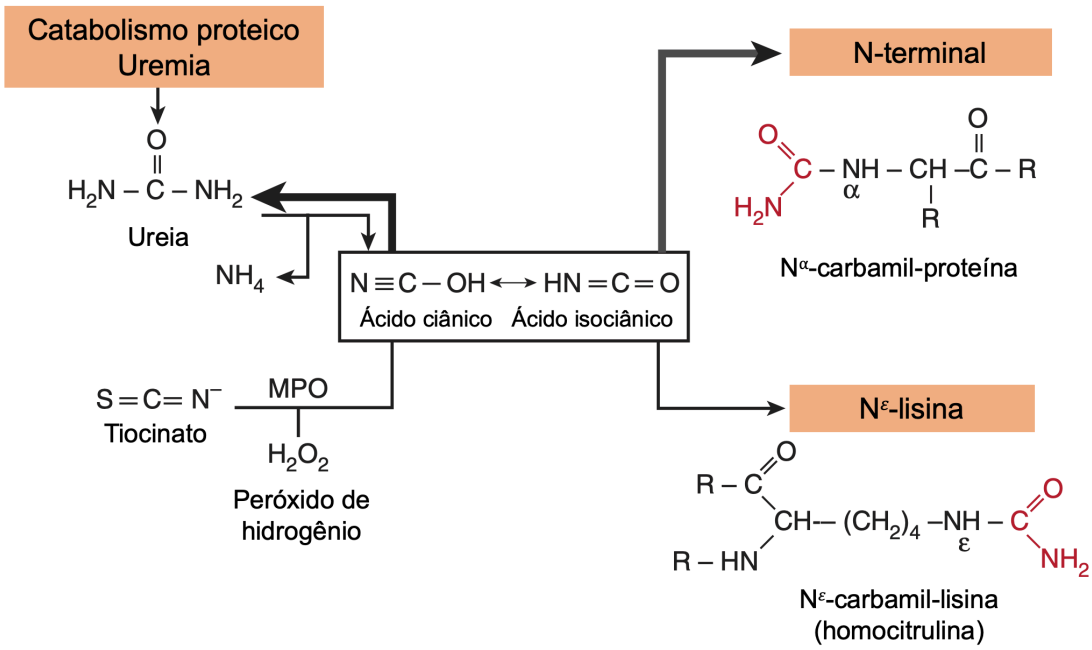


Figura 1.2 - Reação de carbamoilação e vias de ligação às proteínas
MPO: mieloperoxidase
Figura adaptada de Verbrugge *et al.* [37]

A albumina é a principal proteína circulante no plasma, representando 60% da fração proteica e sua concentração na íntima-média arterial é aumentada na lesão aterosclerótica [38]. Uma vez na circulação, a albumina tem meia-vida de aproximadamente 20 dias [39] e está sujeita a reações químicas diversas, podendo ser modificada por reações de glicação avançada e carbamoilação[9, 40].

Aminoácidos séricos são substratos alternativos para carbamoilação pelo cianato e, frequentemente, estão diminuídos nos estágios avançados da DRC. Assim, baixas concentrações de aminoácidos livres e aumento da uremia, situações comuns na DRC, favorecem modificações de proteínas circulantes, como por exemplo, formação de albumina carbamoilada [9]. Diversos estudos demonstraram a associação entre as concentrações séricas de proteínas carbamoiladas e a mortalidade cardiovascular em indivíduos com DRC avançada [8, 9, 41].

Da mesma forma, as reações de carbamoilação podem envolver lipoproteínas, gerando lipoproteínas de baixa densidade (LDL) carbamoiladas que estão mais propensas a oxidação. Adicionalmente, as LDLs carbamoiladas estimulam o desenvolvimento de células espumosas, produção de ROS, disfunção endotelial e, consequentemente, prejuízo do relaxamento vascular [11]. Os efeitos citotóxicos de LDLs carbamoiladas, em células endoteliais da artéria coronariana, foram relacionados à proliferação de células musculares e apoptose [42].

Segundo Drechsler e colaboradores, a maior concentração de proteínas séricas carbamoiladas levou ao aumento de marcadores de estresse cardíaco e mortalidade cardiovascular por morte súbita, em curto prazo, e por insuficiência

cardíaca congestiva, em longo prazo, em indivíduos em terapia renal substitutiva [41]. Por outro lado, Kalim e colaboradores demonstraram redução da carbamoilação de proteínas com o início da diálise. Esta redução foi correlacionada com impacto positivo na sobrevida, independentemente das variáveis tradicionais, como marcadores de adequação de diálise e estado nutricional [43]. Outros PTMDPs, como a HCit, foram reconhecidos com fator preditor independente de mortalidade cardiovascular e por todas causas em pacientes em diálise, bem como aumento do risco de doença arterial coronariana (DAC), infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular encefálico (AVE) e morte em indivíduos com e sem DCV prévia [44 ,45].

Independentemente da hiperglicemia, o predomínio do estresse carbonila na DRC aumenta a concentração sérica de metilglioxal (MGO), glioxal (GO) e 3-DG, gerando AGEs e produtos avançados de lipoxidação (ALEs), que exacerbam o insulto oxidativo, diminuem as defesas antioxidantes, agravando as reações de glicoxidação, que originam os AGEs. Estas mudanças ocorrem devido à menor depuração renal de intermediários da reação de glicação e diminuição do catabolismo de compostos carbonila, como a 3-DG, por deficiência dos sistemas de detoxificação [46].

Portanto, em indivíduos com DRC, o estresse oxidativo e carbonila, acentuam acúmulo dos AGEs e a carbamoilação de lipoproteínas, tornando-se importantes fatores contribuintes na aterogênese [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55].

1.5 Transporte reverso de colesterol, doença renal e diabetes

O transporte reverso de colesterol (TRC) consiste na remoção do colesterol celular (incluindo os macrófagos da íntima arterial) e posterior

eliminação na bile e excreção fecal. O TRC é considerado um mecanismo crucial de defesa contra aterosclerose [56]. Neste processo, a apolipoproteína A-I (apo A-I) sintetizada e secretada pelo fígado e intestino, ou dissociada das HDL, adquire colesterol livre e fosfolípides por meio da interação com o receptor ABCA-1 (do inglês, *ATP binding cassete transporter A-1*) presente na superfície das células, levando à formação de pré-beta1-HDL. Esta também remove colesterol celular, convertendo-se em pré-beta2-HDL, e subsequentemente em alfa3-HDL, alfa2-HDL e alfa1-HDL. As partículas grandes de HDL, designadas como HDL_2, removem colesterol e óxidos de colesterol por meio do receptor ABCG-1 (do inglês, *ATP binding cassete transporter G-1*). As HDL_2 e HDL_3 trocam colesterol esterificado e triglicérides (TG) com lipoproteínas que contêm apo B, quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e LDL, por intermédio da proteína de transferência de colesterol esterificado (CETP). Isto favorece a captação de QM, VLDL e LDL pelos receptores B-E no fígado. Por outro lado, as HDLs mais enriquecidas em triglicérides tornam-se substrato para a lipase hepática e interagem com o receptor SR-BI *(*do inglês, *scavenger receptor class B type I)* que remove, seletivamente, o colesterol esterificado das HDLs. A apo A-I restante, com pequeno conteúdo de lípides, retorna ao interstício onde reinicia o TRC ou pode ser catabolizada no rim [11, 57, 58, 59]. Os receptores ABCA-1 e ABCG-1 têm papel-chave no TRC, pois medeiam o efluxo de colesterol dos macrófagos e impedem sua transformação em células espumosas [60] (Figura 1.3).

A metabolização de lipoproteínas e etapas do TRC são modificadas por glicação e carbamoilação e, estas mudanças no fluxo de colesterol se associam

à maior prevalência de aterosclerose em humanos e em modelos animais experimentais [22, 57, 58, 59].

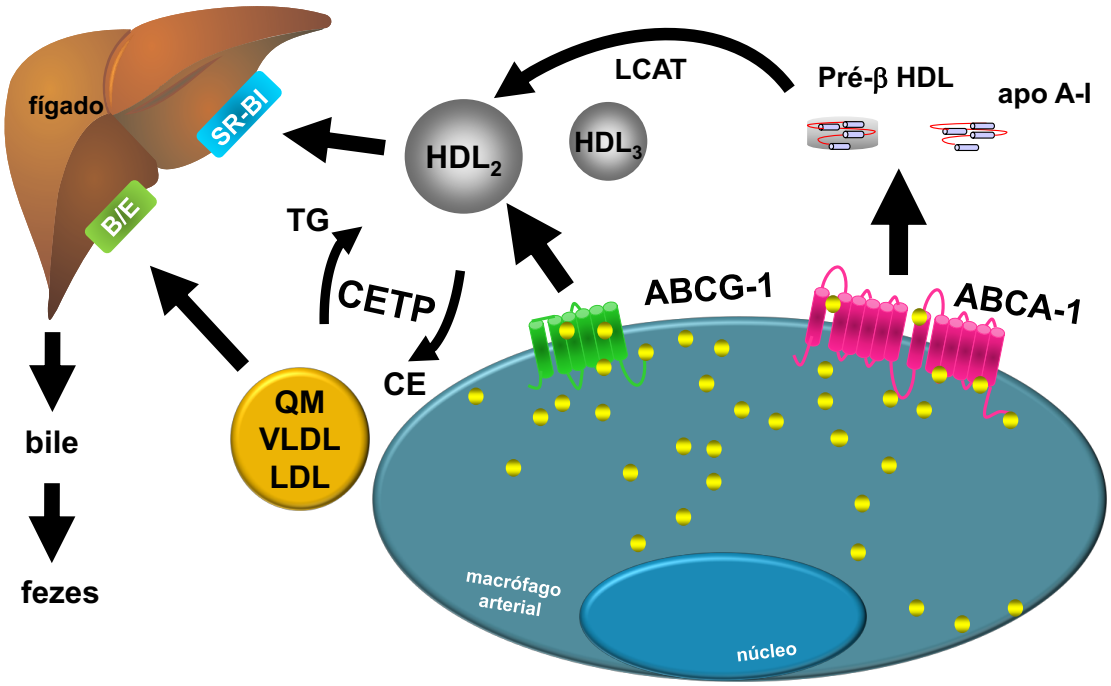


Figura 1.3 - Transporte reverso de colesterol
Apo A-I e partículas nascentes de HDL (pré-beta HDL) removem o excesso de colesterol de macrófagos por meio da interação com os receptores ABCA-1 e ABCG-1. Após esterificação do colesterol pela LCAT, formam-se, gradativamente, partículas maiores de HDL (HDL_3 e HDL_2). O CE pode ser diretamente removido das HDLs pelo receptor SR-BI no fígado, podendo ser convertido em ácidos biliares e eliminado na forma livre na bile. Por intermédio da CETP, o CE é transferido para os QM, VLDL e LDL, podem ser removidas pelos receptores B-E ou proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de densidade baixa (LRP) no fígado. Por fim, elimina-se de colesterol na bile e excreção fecal. ABCA-1 (*ATP binding cassete transporter A-1*); ABCG-1 (*ATP binding cassete transporter G-1*); LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase): SRB-I (receptor *scavenger* classe B tipo I); CE (colesterol esterifiado); CETP (proteína de transferência de colesterol esterificado) Figura adaptada com permissão de Adriana Machado-Lima.

A dislipidemia é comum na DRC e caracterizada por aumento concentração de TG e VLDL-colesterol (VLDL-c), e redução do HDL-colesterol (HDL-c). CT e LDL colesterol (LDL-c) geralmente estão em níveis normais ou levemente reduzidos [11,56]. Com declínio da função renal, várias etapas do TRC são prejudicadas. A uremia reduz a expressão de ABCA-1 e ABCG-1; reduz a

concentração plasmática de apo A-I e de HDL-c; e a atividade da LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase). Por outro lado, a uremia aumenta a atividade da enzima CETP [62, 63]. Além disso, a uremia e o processo inflamatório associado à perda na função renal, altera a atividade biológica das partículas de HDL, reduzindo sua ação antioxidante e anti-inflamatória, provavelmente por menor ação das suas enzimas paraoxonase 1, óxido nítrico sintase e LCAT. A HDL disfuncional promove oxidação de fosfolípides e acúmulo sérico de amiloide A e proteína C reativa (PCR), induz a produção de citocinas, perpetuando dessa forma, o processo inflamatório [63, 64].

Macrófagos tratados com albumina isolada de ratos com uremia induzida em modelo experimental reduziram a remoção de colesterol mediada por apo A-I e HDL_2, em comparação àqueles tratados com albumina controle [65]. Embora a albumina isolada em condições de uremia tenha maior capacidade de remover colesterol celular, sua contribuição no TRC parece ser pouco importante, pela limitada esterificação do colesterol ligado à albumina pela LCAT. Isto pode propiciar a recaptação de colesterol livre, porém sem eficiência na retirada de lípides celulares. Por outro lado, macrófagos tratados com albumina sérica humana, isolada de indivíduos com diabetes tipo 1 e tipo 2 com controle glicêmico ruim, mostraram prejuízo no TRC mediado por ABCA-1 e consequente acúmulo de lípides intracelulares. Essa redução no efluxo de colesterol foi atribuída à mudança no padrão de glicação, repercutindo em alterações seletivas na expressão gênica desses macrófagos e modificação no efluxo de colesterol mediado tanto pela apo A-I, como por HDL_2 [66, 67].

Segundo Xu e colaboradores, o aumento de AGEs influenciou o acúmulo de lípides nos macrófagos, regulando a captação, esterificação e o efluxo de

colesterol, principalmente pela maior interação AGE-RAGE. Desta forma, o incremento na formação de AGEs estaria ligado a progressão acelerada da aterosclerose no DM [68].

Estudos *in vivo*, demostraram que albumina glicada (albumina-AGE) leva acúmulo de colesterol e 7-cetocolesterol intracelular, que está ligado ao estresse do retículo endoplasmático, inflamação e geração de ROS pelas mitocôndrias e pelo sistema NADPH oxidase. Esses efeitos estão relacionados à ação da albumina-AGE diminuindo a expressão dos receptores ABCA-1 e ABCG-1, com consequente prejuízos ao TRC [69, 70, 71]. A albumina-AGE também afeta as propriedades anti-inflamatórias da HDL, independentemente de mudanças na concentração de HDL-c no plasma, evidenciando seu papel no estresse inflamatório, o que em conjunto com as demais alterações levam a aterogênese [72].

Diversos estudos indicam que os valores de HDL não predizem a presença e progressão da DCV em indivíduos com DRC e intervenções voltadas para aumento do HDL-c não mostraram benefício significativo nesta população [10, 56, 73, 74]. Provavelmente, as mudanças induzidas pela DRC, no metabolismo e composição das partículas de HDL, limitam os efeitos favoráveis da redução de lípides no efluxo de colesterol celular, proteção endotelial e controle de inflamação e oxidação. Por isso, a compreensão dos mecanismos relacionados à aterogênese e proteção vascular na doença renal pode levar percepção diferentes alvos terapêuticos e de intervenção nessa população.

2. JUSTIFICATIVA

Indivíduos com DRD têm elevada morbimortalidade por DCV, mesmo com controle intensivo do diabetes, hipertensão arterial e dislipidemia. Por isso, considera-se que fatores de risco não- tradicionais, como inflamação, estresse oxidativo, acúmulo de toxinas urêmicas e AGEs estejam envolvidos na progressão da aterosclerose na DRD. Um melhor entendimento desses fatores de riscos não-tradicionais contribuirá para adequar estratégias de tratamento e prevenção da doença cardiovascular.

A albumina é a principal proteína circulante no plasma, e está sujeita a modificações por reações de glicação avançada e carbamoilação. Estudos prévios, realizados no Laboratório de Investigação Médica–10 (LIM-10) da FMUSP, evidenciaram elevação do conteúdo de carboximetil-lisina na albumina sérica isolada de pacientes com controle glicêmico inadequado, com consequente interferência negativa no efluxo de colesterol de macrófagos e favorecimento no acúmulo de lípides. O impacto da doença renal no TRC também foi previamente avaliado e observou-se que macrófagos tratados com albumina isolada de animais urêmicos reduziram a remoção de colesterol mediada por apo A-I e HDL_2, em comparação àqueles tratados com albumina controle.

Neste sentido, buscamos caracterizar o perfil de glicação e carbamoilação da albumina de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 e doença renal em diferentes estágios e seu impacto sobre a remoção de colesterol celular.

3. OBJETIVOS

Avaliar em indivíduos com DM2 em diferentes estágios de doença renal, com controle glicêmico semelhante e indivíduos controles saudáveis, pareados por idade e sexo:

1) O perfil de modificação da albumina sérica por glicação avançada e carbamoilação;
2) A influência da albumina sérica isolada sobre o efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL_2 e HDL_3

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

Indivíduos com diabetes tipo 2, de ambos os sexos, foram selecionados no Ambulatório de Diabetes e Ambulatório Multidisciplinar de Doença Renal Diabética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

Os critérios de inclusão foram: diabetes *mellitus* tipo 2, diagnosticados há pelo menos 10 anos, idade superior a 45 anos, ambos os sexos, doença renal crônica com estágio 1 a 5, com hemoglobina glicada (HbA1c) entre 7-9%. Os critérios de não-inclusão abrangeram: DRC estágio 5 em terapia renal substitutiva (hemodiálise, diálise peritoneal e transplantados renais), rápida perda na taxa de filtração glomerular (>3 mL/min/ano), síndrome nefrótica, hipertensão arterial refratária ao tratamento ou suspeita de nefroesclerose hipertensiva, presença de sedimento urinário ativo no exame de urina I, doença oncológica ativa, redução da TFG superior a 30% dentro de 2 a 3 meses do início de inibidores da enzima conversora da angiotensina ou bloqueadores do receptor de angiotensina; sorologia positiva para HIV, índice de massa corpórea < 18,5 Kg/m^2. Indivíduos controles foram recrutados de acordo com pareamento por sexo e idade.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento informado, aprovado pela Comissão de Ética do HCFMUSP (CAPPesq #15024). A pesquisa foi registrada na Plataforma Brasil (Parecer #1.982.033).

4.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal englobando pacientes selecionados a partir do seguimento regular Ambulatório de Diabetes e Ambulatório Multidisciplinar de Doença Renal Diabética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre abril de 2016 a dezembro de 2018. Após avaliação de dados clínicos e demográficos, os participantes foram submetidos a coleta de amostras de sangue periférico para as seguintes dosagens bioquímicas: hemograma, HbA1c, frutosamina, ureia, creatinina, colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicérides. A classificação de albuminúria, utilizando relação albumina/creatinina urinária e/ou excreção urinária de albumina em urina de 24 horas, foi baseada na média dos resultados de exames realizados nos 12 meses precedentes à inclusão do paciente na pesquisa.

4.3 Metodologia

4.3.1 Isolamento e purificação de albumina do soro humano

Amostras de sangue dos participantes foram colhidas, após jejum de 12 h, em tubos secos e centrifugadas imediatamente a 3000 rpm, por 20 min, a 4°C, para obtenção do soro. Adicionamos os seguintes conservantes, para cada 1 mL de soro: 20 µL de cloranfenicol/gentamicina (0,25%), 10 µL de azida sódica (5%) (Merck, Darmastadt, Alemanha); 5 µL de benzamidina (2 mM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), 5 µL de aprotinina (0,5%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e 0,5 µL de PMFS (fluoreto de fenil metila sulfonila) diluído em 30 mM de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Em seguida, as amostras foram estocadas a -70°C até posterior processamento.

A albumina foi extraída por cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (FPLC – *Fast Protein Liquid Chromatography*), utilizando-se coluna de afinidade para albumina, HiTraptmBlue (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), seguida de purificação por extração alcoólica, segundo técnica padronizada no laboratório [67]. Ao término do processo, as albuminas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e sua migração comparada à de albumina humana obtida comercialmente (Sigma Chem Aldrich, St Louis, MO, EUA).

4.3.2. Isolamento de lipoproteínas do plasma e acetilação de LDL

Lipoproteína de densidade baixa (LDL; densidade = 1,019 – 1,063 g/mL), subfrações de HDL_2 (densidade = 1,063 – 1,125 g/mL) e de HDL_3 (densidade = 1,125 – 1,21 g/mL), foram isoladas do plasma de indivíduos saudáveis recrutados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para tanto, utilizamos técnica de ultracentrifugação sequencial e purificação por gradiente descontínuo de densidade [75].

A LDL foi acetilada segundo protocolo descrito por Basu *et al.* 1976 [76]. Para cada 16 mg de proteína de LDL, foi adicionado 1 mL de solução saturada de acetato de sódio e 1 mL de cloreto de sódio (NaCl 0,15 M), sob constante agitação, utilizando-se de agitador magnético, em banho gelo com temperatura próxima a 0 ˚C. Gradativamente, pequenas quantidades de anidrido acético foram acrescentadas, por um período de 1 h, até atingir o volume de 1,5 vezes a massa de proteína de LDL; em seguida, a amostra foi agitada por mais 30 minutos. A final desta etapa, a LDL acetilada foi dialisada contra tampão salino-fosfato (PBS) com EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido

etilenodiamino tetra-acético), pH = 7,4 por 24 h a 4 ˚C e esterilizada em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína da amostra foi determinada pelo método de Lowry *et al.* 1951[77].

4.3.3 Determinação de produtos de glicação avançada no plasma

Para detecção de carboximetil-lisina, principal produto de glicação avançada, utilizamos o método ELISA, imunoensaio enzimático (*Circulex CML/N$^{\varepsilon}$–(Carboxymethyl)lysine ELISA Kit*. O plasma foi diluído 4 vezes, em tubos eppendorf, ao qual foi adicionado o anticorpo primário diluído em 36 vezes com solução tampão (3 µL de anticorpo primário: anti-CML (Circulex – Catalog number CY 8066 - Woburn, MA, USA)) mais 105 µL de solução tampão de diluição). Em seguida os tubos foram agitados no aparelho vortex para completa homogeneização e 100 µL da amostra adicionados, em duplicatas, a cada poço da placa de ELISA previamente conjugada. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente (25°C), em agitação de 300 rpm, a placa foi lavada com solução tampão de lavagem (200 µL) por 4 vezes e as amostras foram incubadas com anticorpo secundário HRP (*enzyme horseradish peroxidase* - Circulex – Catalog number CY 8066 - Woburn, MA, USA), por mais 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação (300 rpm). Novamente, a placa foi lavada 4 vezes com solução tampão de lavagem e incubada com 100 µL do substrato reagente por 10 a 20 minutos, em temperatura ambiente, até intensificar a coloração dos poços, quando adicionou-se 100 µL da solução de bloqueio e utilizamos um leitor de microplacas, com um comprimento de onda de 450 nm, para interpretar os resultados.

4.3.4 Determinação de proteínas carbamoiladas no plasma e na albumina

Utilizamos método ELISA, imunoensaio enzimático (*The OxiSelect™ Protein Carbamylation Sandwich ELISA Kit*) para rápida detecção e quantificação de proteínas carbamoiladas. Foram adicionados 100 µL da amostra (plasma ou albumina isolada dos participantes do estudo) e de carbamil-lisina albumina sérica bovina padrão (CBL-BSA do inglês, *Carbamyl-Lysine Bovine Serum Albumin*) - *CELL BIOLABS, INC – Catalog number STA-877* – San Diego, CA, USA) à placa revestida com anticorpo anti-CBL (*anti-Carbamyl-Lysine*), e incubado a 37°C por 2 horas. A placa foi lavada com solução tampão de lavagem por 3 vezes, e novamente incubada com 100 µL do anticorpo anti-CBL (diluído 1:1000), por 1 hora à temperatura ambiente em um agitador orbital. Após novo processo de lavagem (solução tampão de lavagem por 3 vezes), adicionou-se à placa 100 µL do anticorpo HRP secundário, seguido por incubação à temperatura ambiente, por 1 hora, em agitador orbital. A placa foi lavada mais uma vez com solução tampão de lavagem e, a seguir, 100 µL da solução de substrato reagente foi adicionado à cada poço, incluindo os referentes à curva-padrão, e incubado por 20 a 30 minutos sob agitação, com a intensificação da cor nos poços, adicionou-se 100 µL da solução de bloqueio. A leitura foi realizada com um leitor de microplacas e 450 nm de comprimento de onda

4.3.5 Quantificação de homocitrulina no plasma

Utilizamos método ELISA para detecção de homocitrulina no plasma dos indíviduos do estudo. O plasma armazenado em tubos eppendorf foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos para remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante foi transferido, em duplicata, para tubos poliestireno de 2 mL

com tampa de rosquear e anel de vedação e adicionado 50 µL de homocitrulina-padrão (Homocitulline / Citrulline Assay Kit- *CELL BIOLABS, INC – Catalog Number MET-5027* — San Diego, CA, USA), 5µL de solução dodecil-sulfato de sódio (SDS, do inglês sodium dodecyl sulfate) e 5µL de solução de proteinase K a cada tubo. As amostras foram misturadas aos reagentes movimentando-se os tubos para cima e para baixo e incubadas por 2 horas a 37°C. Na sequência, adicionou-se 250µL de reagente do Teste A e 50µL de reagente do Teste B a cada tubo, com novo período de incubação de 30 minutos, em banho seco, a 95° C. Os tubos foram transferidos para 4°C por 5 minutos e centrifugados a 18.000 x g por 10 minutos a 4°C; então 200 µL de cada sobrenadante foi transferido para placa de microtitulação de 96 poços e procedeu-se a leitura em leitor de placas (absorbância no comprimento de onda de 540-560 nm).

4.3.6 Determinação de pentosidina e AGE total na albumina

Os conteúdos de AGE total e pentosidina na albumina isolada dos pacientes foram determinados por método de fluorescência. As amostras tinham uma concentração de 40 µg/mL, de acordo com Lowry *et al.* 1951. 100 µL de albumina foram adicionados a 100 µL de tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) com EDTA para volume final 200 µL em cada poço, utilizando-se microplacas de 96 poços (placa Black Costar).

As amostras foram excitadas sob um comprimento de onda de 370nm e a medida da fluorescência emitida para AGE total foi em 440 nm e para pentosidina de 378 nm, realizada utilizando o fluorímetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader.

4.3.7 Cultura de macrófagos derivados de células da medula óssea

O protocolo para utilização de animais obedeceu aos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA #1015/2018).

A obtenção de macrófagos, a partir de células isoladas da medula óssea de camundongos machos da linhagem C57/BL6 ocorreu por dissecção do tecido das patas de camundongos. A extremidade de cada osso foi cortada e a medula óssea lavada com meio DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) contendo antibióticos, soro fetal bovino e meio condicionado advindo de células L929. A medula foi gentilmente aspirada com dissolução dos agregados celulares. As células foram centrifugadas a 1000 rpm, durante 6 minutos, temperatura ambiente, sendo, a seguir, semeadas em placas de cultura com incubação por 5 dias, em atmosfera de CO_2 5%. No quinto dia, o meio de cultura foi trocado por novo meio condicionado de células L929. No sexto dia, as células foram incubadas com meio DMEM com baixa concentração de glicose (Gibco), contendo 10% de FCS (soro fetal de bezerro).

4.3.8 Tratamento de macrófagos derivados de células da medula óssea e efluxo de ^{14}C-colesterol

Para os experimentos relacionados ao efluxo de colesterol, utilizamos um *pool* de albuminas isoladas de 3 a 5 participantes, para cada um dos estágios de DRC e controle**.** A porcentagem de efluxo de colesterol de macrófagos foi determinada após sobrecarga celular com ^{14}C-colesterol (0,3 µCi/mL de meio de cultura) e LDL acetilada (50 µg /mL de meio) durante 48 horas. Após lavagem

com PBS/FAFA, as células foram tratadas com meio DMEM suplementado com 1 mg de albumina (para concentração 1mg/mL) do *pool* de albuminas isoladas dos diferentes grupos por 18 horas ou 48 horas, em dois tempos diferentes em experimentos distintos. Após nova lavagem, as células foram incubadas com aceptores de colesterol: HDL_2 (50 µg/mL de meio) e HDL_3 (50 µg/mL de meio) por 6 horas, conforme protocolo descrito previamente Machado *et al.* 2006[22]. Por sua vez, incubações controles foram realizadas na ausência de HDL_2 e HDL_3, e os resultados subtraídos daqueles obtidos da incubação com aceptores. Desta forma, o efluxo mediado por HDL_2 e HDL_3, e a porcentagem de remoção de colesterol calculada utilizando a seguinte fórmula:

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

Passado o período de tratamento, removemos cuidadosamente o meio de cultura e as células foram lavadas, então realizamos a contagem da viabilidade celular, pelo método de exclusão, com o corante Trypan Blue 0,4% (em PBS - NaCl 150 mmol/L, Na_2HPO_4 20 mmol/L, NaH_2PO_4 14 mmol/L, NaOH 1mmol/L - pH 7,4).

4.4 Cálculo da amostra

Partimos do princípio que as variáveis propostas neste estudo (concentração de AGE total e pentosidina, carboximetil-lisina, proteínas carbamoiladas, homocitrulina e capacidade de efluxo de colesterol) têm correlação com perda de função renal, ou seja, que os valores encontrados para

as variáveis seriam maiores nos estágios avaçados de DRC. Assim para cálculo do tamanho amostral supondo um poder de 80% e nível de significância de 5%, para detectar uma correlação maior que 0,5 seriam necessários no mínimo 33 pacientes.

4.5 Análise estatística

Utilizamos teste ANOVA ou Kruskal-Wallis para comparação entre mais de dois grupos das variáveis quantitativas, dependendo da suposição de normalidade dos dados. Na presença de significância estatística, realizamos a análise de comparações múltiplas em pares para verificar qual par se diferencia, aplicando-se o teste de Brunner ou teste Newman-Keuls. O teste de Jonckheere-Terpstra foi utilizado para avaliar se com aumento de grau de uma condição, há aumento ou diminuição da variável estudada. Para a comparação de uma variável quantitativa entre dois grupos utilizamos o teste de Mann-Whitney, enquanto o teste exato de Fisher foi empregado para verificar a associação entre uma variável categórica com o grupo. O nível de significância adotado foi de 5% ($p<0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Prism, Inc., San Diego, CA, EUA), R Core versão 3.6.1 (Auckland, Nova Zelândia) e o IBM SPSS versão 19 (IBM, Inc, Armonk, NY, EUA)

5. RESULTADOS

A população estudada incluiu 49 indivíduos com diabetes *mellitus* e doença renal diabética e 8 controles saudáveis, a média de idade dos participantes foi de 70±9 anos e a média do IMC variou entre 25,2 e 33,3 Kg/m^2. Os pacientes com DRD foram estratificados em 5 grupos, de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada, calculada a partir da dosagem de creatinina sérica, empregando-se a fórmula CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) [15] (Tabela 5.1).

O grupo controle tinha menor IMC entre os grupos, exceto em relação a G3a e G4, além de menor associação com hipertensão.

Os participantes com DM2 tinham tempo de diagnóstico de DM de 16±8 anos. O grupo G3a tinha média de idade maior entre os grupos, excetuando controle e G4; assim como maior tempo de DM entre todos.

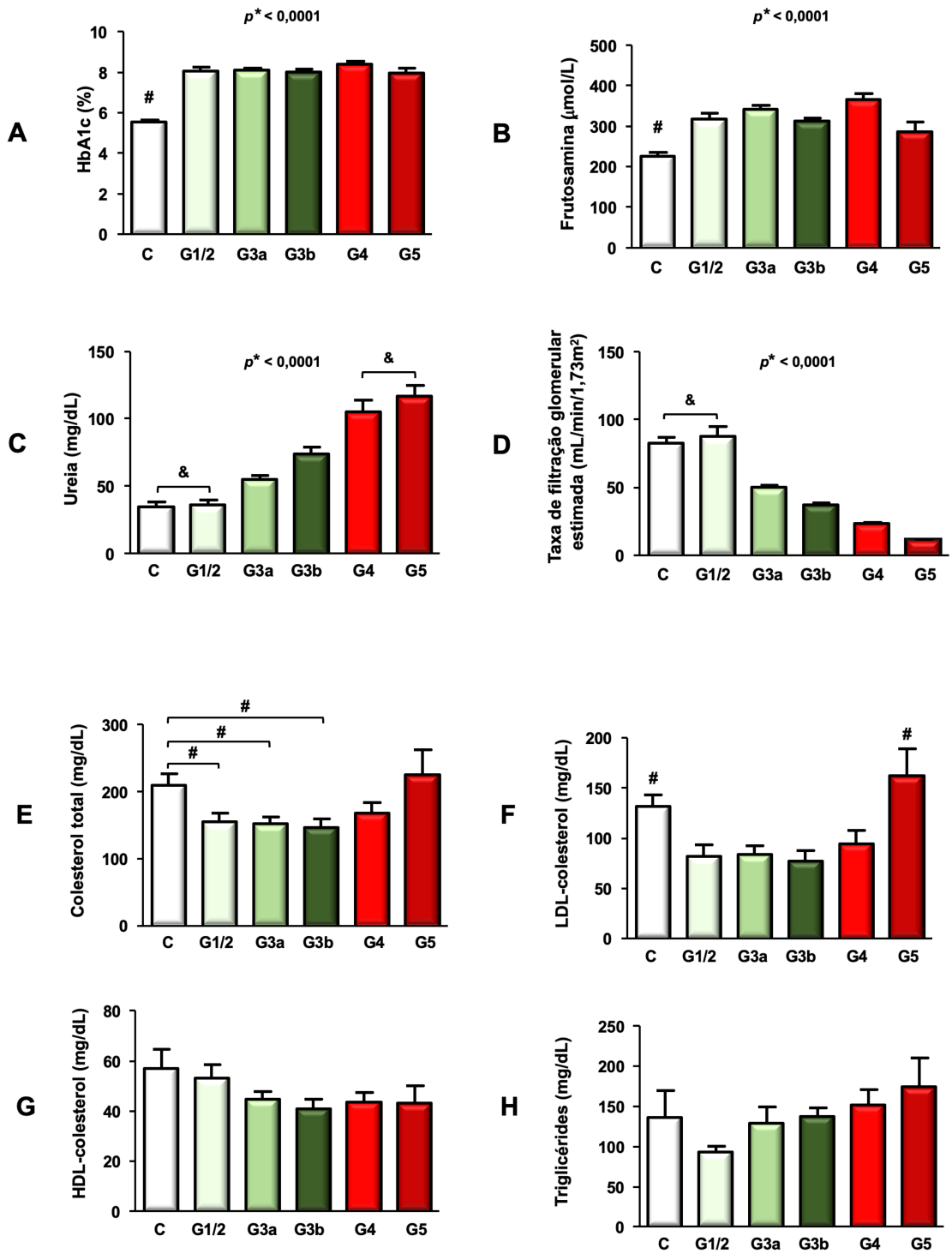
Observamos aumento no diagnóstico de retinopatia diabética e de albuminúria A3 com a progressão da DRC; no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa em relação à presença de doença macrovascular (DAC, IAM e AVE) entre aqueles com diagnóstico de DM2. A maioria das pessoas com diabetes, independentemente da TFGe, estava em uso insulina, beta-bloqueador, estatina e ácido acetilsalicílico, enquanto 37% dos indivíduos no grupo controle estavam em uso de bloqueador do receptor de angiotensina, 25% estatina e 12% beta-bloqueador.

Tabela 5.1 - Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com DM2 e DRC divididos por estágio e controle

Características	Controle	G1/2	G3a	G3b	G4	G5	p^1
n	8	10	11	13	11	4	
Sexo (M/F)	4 / 4	3 / 7	6 / 5	12 / 1	7 / 4	3 / 1	0,1574
Idade (anos)	70 (9)	65 (8)	78 (10)	69 (6)	69 (9)	63 (6)	0,0392
IMC (Kg/m^2)	25,2 (3)	33,3 (6)	28,4 (6)	31,3 (5)	26,6 (4)	30,1 (3)	0,0070
Tempo de DM (anos)	NA	14 (7)	27 (12)	16 (6)	16 (5)	15 (4)	0,0290
Retinopatia DM (%)	NA	20	54	77	91	100	0,0028
Albuminúria % (A1/A2/A3)	-	80/ 20/0	45/ 45/10	8/ 38/ 54	18/18/64	0/ 0/100	0,0001
DAC/IAM (%)	0	10	27	46	45	25	0,1173
AVE (%)	0	0	9	15	9	50	0,1422
HAS (%)	50	100	91	92	100	100	0,0126
HbA1c (%)	5,6 (0,2)	8,1 (0,6)	8,1 (0,4)	8,0 (0,5)	8,4 (0,5)	8,1 (0,5)	< 0,0001
Cr sérica (mg/dL)	0,8 (0,2)	0,8 (0,2)	1,2 (0,2)	1,8 (0,3)	2,6 (0,6)	4,7 (0,7)	< 0,0001
Ureia (mg/dL)	35 (10)	37 (10)	55 (10)	74 (20)	105 (30)	117 (16)	< 0,0001

Dados apresentados com média (desvio-padrão. Realizado comparações das variáveis quantitativas entre com grupos com teste de Kruskal-Wallis pós-teste de Brunner; Realizado teste exato de Fisher para variáveis qualitativas. DRC: doença renal crônica. n: número de pacientes; M: masculino; F: feminino; IMC: índice de massa corpórea; DM: diabetes *mellitus*; Albuminúria em mg/g de creatinina; A1: <30 ; A2: 30-300 ; A3 > 300 ; DAC: doença arterial aterosclerótica; IAM: infarto agudo do miocárdio; AVE: acidente vascular encefálico: Cr: creatinina; TFGe: taxa de filtração gloremular estimada (CKD-EPI); NA: Não se aplica.

Os resultados das variáveis laboratoriais foram semelhantes entre os estágios de DRC para o controle glicêmico, aferido pela HbA1c (média 8,2 ±0,5%) e frutosamina (média 330 ±45) (Figura 5.1 A e B), assim como para HDL-c e TG (Figura 5.1 G e H). As concentrações séricas de ureia e creatinina se elevaram com perda de TFGe, com esperada diferença significativa entre os grupos (Figura 5.1 C e D); Para ureia, grupo controle e G1/2 foram semelhantes entre si, assim como G4 e G5. Para creatinina e TFGe, grupo controle e G1/2 foram semelhantes. O grupo controle e grupo G5 tinham maior LDL-c em relação a G1/2, G3a e G3b. A concentração de CT também foi maior no controle em relação a G1/2, G3a e G3b (Figura 5.1 E e F).



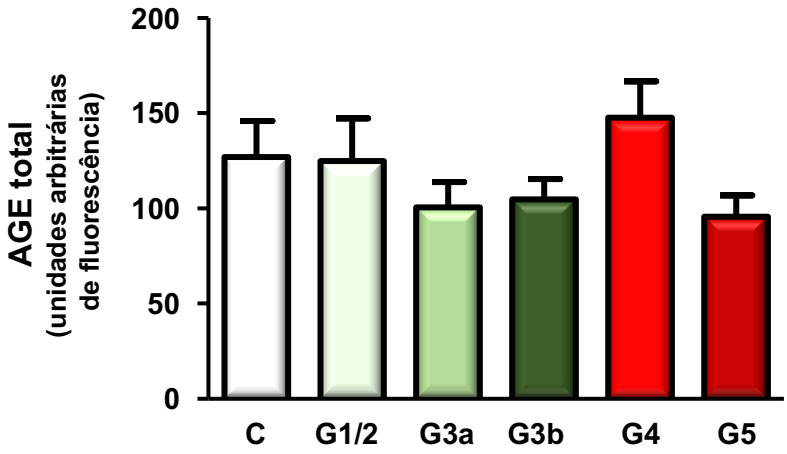
Dados apresentados com média (desvio-padrão). Realizado comparações entre grupos com teste de Kruskal-Wallis: *p**. Comparações entre pares com pós-teste de Brunner; #: *p*<0,05 (significativo); *&*: *p* >0,05 (não-significativo); C: controle; CT: colesterol total; LDL: lipoproteínas de densidade baixa; HDL: lipoproteínas de densidade alta; TG: triglicérides; Cr: creatinina; TFGe: taxa de filtração gloremular estimada (CKD-EPI); G1/2: TFGe ≥60mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29mL/min/1,73m²; G5: TFGe< 15mL/min/1,73m²;

O perfil de modificação da albumina por glicação avançada foi avaliado determinando-se AGE total e pentosidina, os quais foram semelhantes nas albuminas isoladas de ambos os grupos, controle e com DRD (Tabela 5.2 e Figura 5.2).

Tabela 5.2 - Determinação de AGE total e pentosidina nas albuminas dos indivíduos controle e estágios de DRC

	Controle	G1/2	G3a	G3b	G4	G5	p^1	p^2
AGE total (unidades arbitrárias de fluorescência)	127,1 (49,9)	125,0 (59,5)	100,5 (42,4)	104,9 (35,2)	147,8 (56,8)	95,8 (22,3)	0,4027	0,9855
Pentosidina (unidades arbitrárias de fluorescência)	2504 (1029)	2443 (1284)	1760 (635)	2070 (851)	2827 (861)	2131 (430)	0,2553	0,3649

Dados apresentados com média (desvio-padrão). Determinações feitas com medida de fluorescência em 440nm (AGE total) e 378 nm (pentosidina). Realizado comparações entre com grupos com p^1: teste de Kruskal-Wallis; p^2: teste de Jonckheere-Terpstra; AGE: produtos finais de glicação avançada; G1/2: TFGe ≥60mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29mL/min/1,73m²; G5: TFGe< 15mL/min/1,73m²;



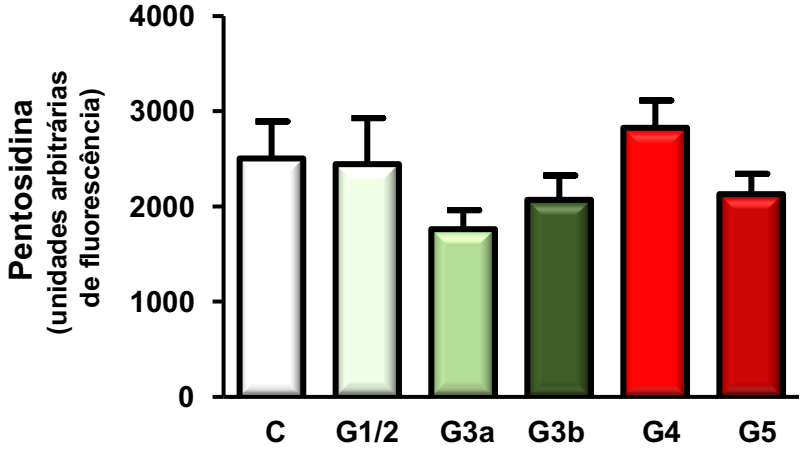


Figura 5.2 - Quantidade de AGE total e pentosidina em albuminas isoladas de indivíduos controle e estágios de DRC

Determinações feitas com medida de fluorescência em 440nm (AGE total) e 378 nm (pentosidina).Realizado comparações entre com grupos com *p*¹: teste de Kruskal-Wallis; *p*²: teste de Jonckheere-Terpstra; C: Controle G1/2: TFGe ≥60mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29mL/min/1,73m²; G5: TFGe< 15mL/min/1,73m²;

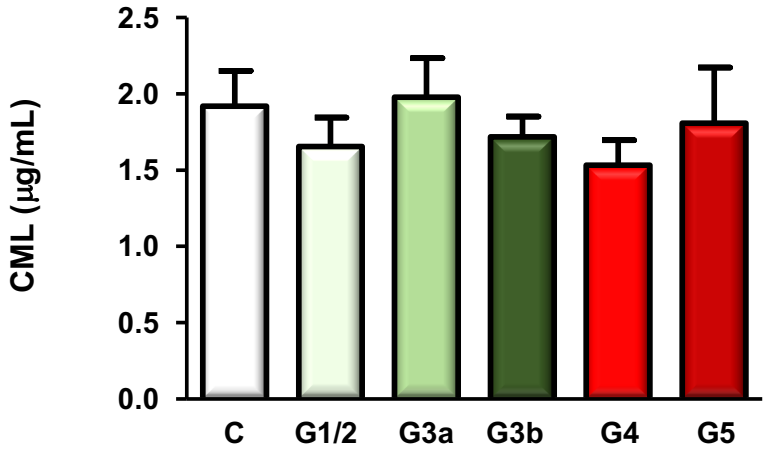
Para avaliar glicação e carbamoilação no plasma, dosamos carboximetil-lisina, homocitrulina e proteínas carbamoiladas.

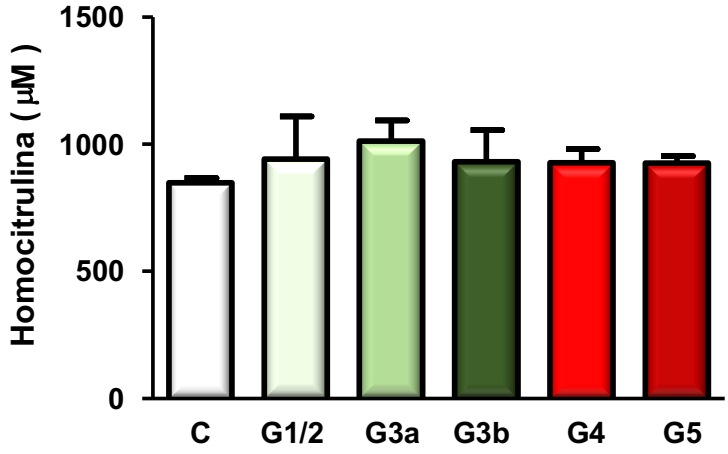
Não observamos diferença na concentração plasmática de homocitrulina, carboximetil-lisina e proteínas carbamoiladas nos indivíduos com DRD e controles, assim como entre os estágios de DRC (Tabela 5.3 e Figura 5.3)

Tabela 5.3 - Determinação de carboximetil-lisina, homocitrulina e proteínas carbamoiladas no plasma dos indíviduos controle e estágios de DRC

	Controle	G1/2	G3a	G3b	G4	G5	p^1	p^2
CML (µg/mL)	1,92 (0,65)	1,65 (0,57)	1,98 (0,85)	1,72 (0,46)	1,53 (0,54)	1,80 (0,73)	0,7088	0,3474
Homocitrulina (µM)	848,8 (26,3)	942,2 (289,6)	1013,4 (180,0)	932,0 (275,6)	928,0 (132,6)	926,5 (47,6)	0,8230	0,9596
Proteínas Carbamoiladas - CBL (ng/mL)	20,9 (13,8)	26,1 (10,4)	38,7 (49,9)	27,1 (16,5)	39,5 (47,6)	11,3 (5,5)	0,3978	0,3066

Dados apresentados com média (desvio-padrão). Determinações plasmáticas feitas por ELISA. Realizado comparações entre com grupos com p^1: teste de Kruskal-Wallis; p^2: teste de Jonckheere-Terpstra; DRC: doença renal crônica; G1/2:TFGe ≥60mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59 mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29mL/min/1,73m²; G5: TFGe <15 mL/min/1,73m²;CML: carboximetil-lisina; CBL (Carbamil-lisina).





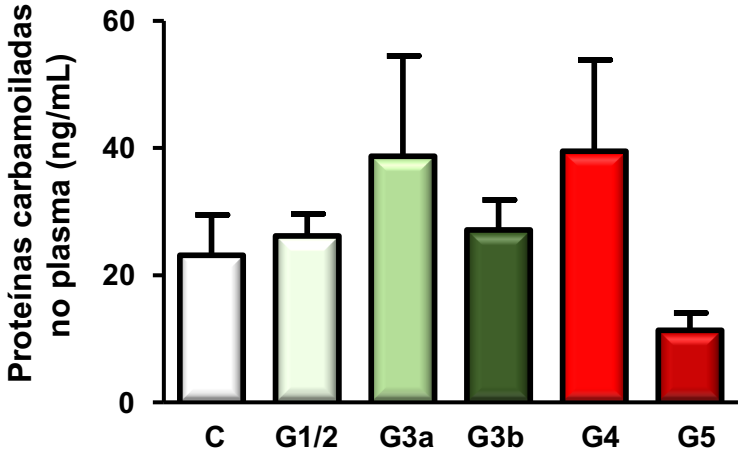


Figura 5.3 - Dosagem de homocitrulina, carboximetil-lisina e proteínas carbomoiladas em albuminas isoladas de indivíduos controle e estágios de DRC

Realizado comparações entre com grupos com p^1: teste de Kruskal-Wallis; p^2: teste de Jonckheere-Terpstra; C:controle; G1/2:TFGe ≥60 mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59 mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44 mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29 mL/min/1,73m²; G5: TFGe < 15 mL/min/1,73m².

Ao avaliar a carbamoilação nas albuminas isoladas, não encontramos diferenças entre os estágios de DRC (p=0,2163); no entanto, identificamos um aumento estatisticamente significativo (p=0,0414) com a piora taxa de filtração glomerular nos indivíduos com DM2 e DRD (Tabela 5.4 e Figura 5.4)

Tabela 5.4 - Determinação da carbamoilação nas albuminas dos indivíduos controle e estágios de DRC

	Controle	G1/2	G3a	G3b	G4	G5	p^1	p^2
Proteínas Carbamoiladas - CBL (ng/mL)	10,0 (0,8)	9,3 (2,7)	10,3 (2,9)	12,8 (0,3)	16,8 (8,6)	13,3 (6,8)	0,2163	0,0414

Dados apresentados como média (desvio-padrão). Determinações nas albuminas isoladas feitas por ELISA. Realizado comparações entre com grupos com p^1: teste de Kruskal-Wallis; p^2: teste Jonckheere-Terpstra. G1/2: TFGe ≥60 mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44 mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29 mL/min/1,73m²; G5: TFGe < 15 mL/min/1,73m². CBL: carbamil-lisina.

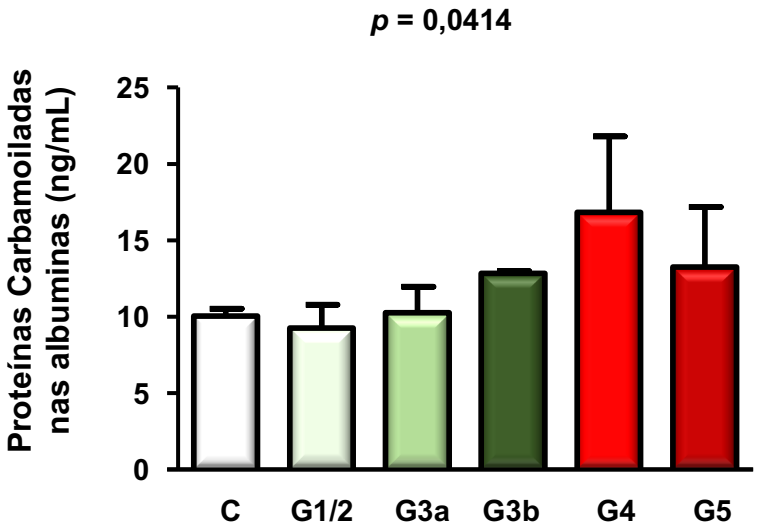


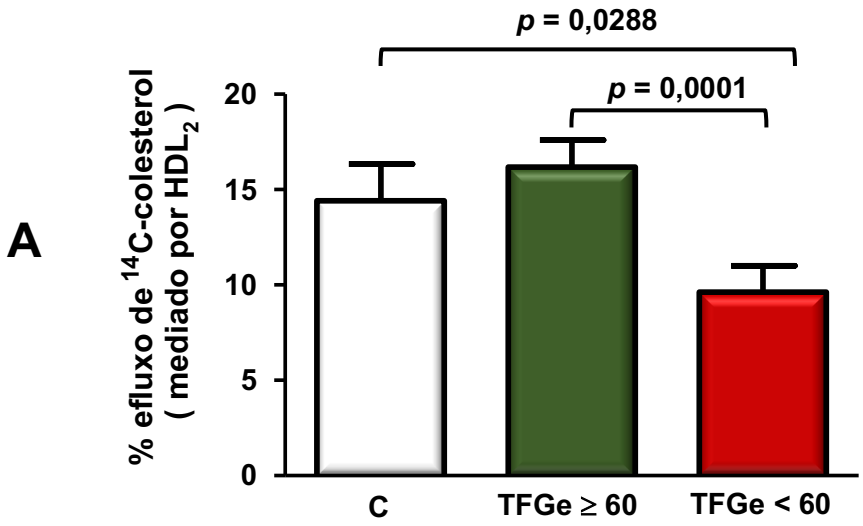
Figura 5.4 - Carbamoilação nas albuminas dos indivíduos controle e estágios de DRC

Dados apresentados como média (desvio-padrão).Realizado comparações entre com grupos com p^1: teste de Kruskal-Wallis (p=0,2163),; p^2: teste Jonckheere-Terpstra (p < 0,0414) DRC: doença renal crônica; C: controle; G1/2:TFGe ≥60 mL/min/1,73m²; G3a: TFGe 45-59mL/min/1,73m²; G3b: TFGe 30-44 mL/min/1,73m²; G4: TFGe:15-29 mL/min/1,73m²; G5: TFGe < 15 mL/min/1,73m².CBL: carbamil-lisina.).

Após a caracterização do perfil da albumina, examinamos sua influência sobre o efluxo de colesterol celular, mediado por subfrações de HDL. Neste sentido, macrófagos foram tratados com *pool* de albuminas isoladas de indivíduos controles e DRD em diferentes estágios de doença renal crônica, por 18 h e 48 h.

Para a primeira avaliação da porcentagem (%) de efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL_2 e HDL_3, incubamos os macrófagos por 18 h com o *pool* de albuminas isoladas dos indivíduos divididos em três categorias: controle, DRC com função renal normal (TFGe ≥60mL/min/1,73m²) ou reduzida (TFGe <60 mL/min/1,73m²). Verificamos que houve redução significativa da porcentagem de

efluxo mediado tanto pela HDL_2 , como HDL_3, relacionada diminuição da função renal, ou seja, com valores de TFGe <60mL/min/1,73m^2, como mostrado na figura 5.5. A e B. Não houve diferença estatisticamente significativa entre controle e DRC com função renal normal na remoção de colesterol mediado por HDL_2 (p=0,9569) e HDL_3 (p=0,2865).



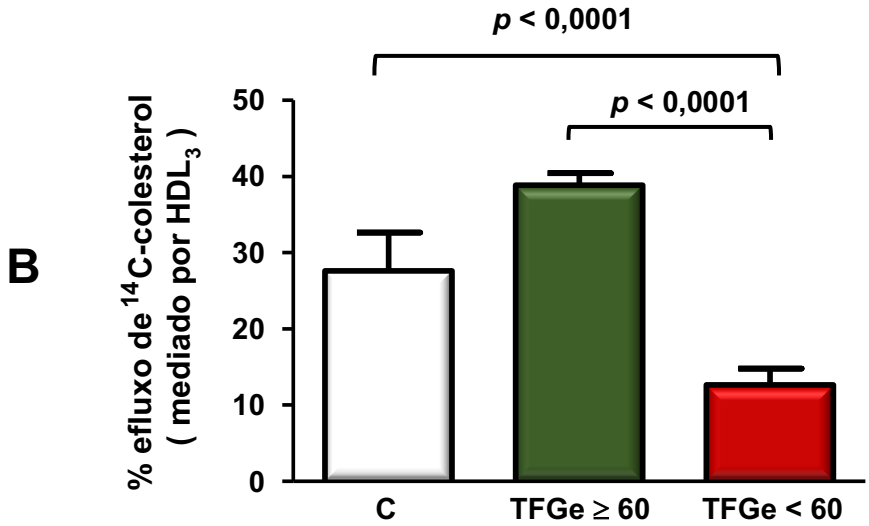


Figura 5.5 - Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL_2 e HDL_3 após tratamento por 18 horas com albumina isolada dos indivíduos controle e divididos conforme TFGe normal ou reduzida

Macrófagos derivados de medula óssea foram sobrecarregados com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol por 48 h. Células foram tratadas por 18 horas com DMEM suplementado com 1 mg/mL do *pool* de albuminas dos indivíduos controle (barras brancas), DRC com TFG ≥ 60 (barras verdes) ou DRC com TFG <60 (barras vermelhas) sozinhos ou na presença de HDL_2 ou HDL_3 por 6 h para determinar efluxo de ^{14}C-colesterol. Comparações entre os grupos com teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Brunner. Comparação efluxo de ^{14}C-colesterol entre grupo controle e TFG ≥60 mediado por HDL_2 (p=0,9569) e HDL_3 (p=0,2865). DRC: doença renal crônica; C: controle; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada pela fórmula CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) em mL/min/1,73m².

Uma segunda análise foi realizada incubando os macrófagos por 48 h com o *pool* de albuminas isoladas dos indivíduos divididos em diferentes estágios de DRC. O estágio G5 (TFGe <15 mL/min/1,73m²) apresentou menor porcentagem de efluxo de ^{14}C-colesterol mediado pela HDL_2 em comparação aos demais grupos, como demonstra figura 5.6.

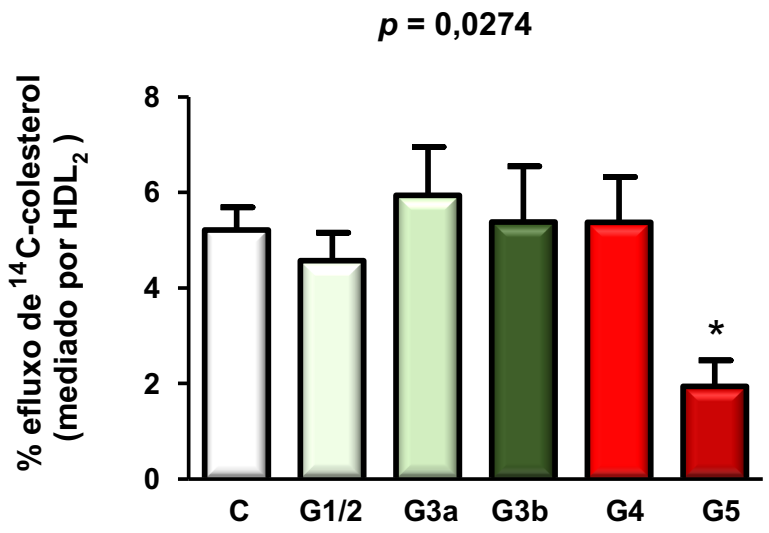


Figura 5.6 - Efluxo de ^{14}C-colesterol mediado por HDL_2 e HDL_3 após tratamento por 48 horas com albumina isolada dos indivíduos divididos em controle e estágios de DRC

Macrófagos derivados de medula óssea foram sobrecarregados com LDL acetilada e ^{14}C-colesterol por 48 h. As células foram tratadas por 48 h horas com DMEM suplementado com 1 mg/mL do *pool* de albuminas dos indivíduos controle e dos estágios de DRC, sozinhos ou na presença de HDL_2 ou HDL_3 por 6 h para determinar efluxo de ^{14}C-colesterol. Comparações entre os grupos com teste *One-way* ANOVA e pós-teste Newman-Keuls (p=0,0274*).* Comparações em pares do estágio G5 com controle e demais estágios de DRC (p*<0,05). DRC: doença renal crônica ; C: controle ; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada pela fórmula CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) em mL/min/1,73m².

6. DISCUSSÃO

Alterações no transporte reverso de colesterol e outras anormalidades relacionadas à quantidade, perfil e funcionalidade de lipídes, além de acúmulo de AGEs, toxinas urêmicas, estresse oxidativo e inflamação foram descritas como fatores contribuintes no desenvolvimento e intensificação da aterosclerose tanto no diabetes *mellitus*, como na doença renal crônica [9, 65, 66, 67]. No entanto, não há na literatura estudos em humanos, voltados para identificação dessas alterações na presença das duas doenças, diabetes *mellitus* e doença renal crônica. Neste sentido, buscamos avaliar a influência da albumina sérica, isolada de pessoas com DM e DRC, em diferentes estágios de função renal, sobre transporte reverso de colesterol em macrófagos. Por se tratar da principal proteína circulante no plasma, sujeita a modificações por reações de glicação avançada e carbamoilação, a albumina representaria bem o insulto químico característico do diabetes e na uremia.

A população estudada incluiu indivíduos com DM2 e DRD estratificada de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada. Os pacientes com diabetes tinham controle glicêmico bem semelhante (HbA1c 8,2±0,5%) e características clínicas também parecidas como mostra tabela 5.1 e figura 5.1.

Para avaliar as particularidades da glicação nesta população, determinamos a quantidade de AGE total e pentosidina nas albuminas e dosagem na plasmática de CML. A dosagem de HCit plasmática, proteínas carbamoiladas, no plasma e nas albuminas isoladas, serviram para analisar a carbamoilação. As dosagens de AGE total e pentosidina nas albuminas foram semelhantes entre indivíduos controle e aqueles com DRD, assim como entre os

diferentes estágios da DRC. Observamos as mesmas características na avaliação de produtos plasmáticos, ou seja, a concentração de CML, HCit e proteínas carbamoiladas plasmáticas não foram modificadas por variações da glicemia ou pelo prejuízo da função renal e consequente aumento da uremia.

Nas albuminas, por meio de dosagem de CBL, principal produto decorrente da reação de carbamoilação, encontramos maiores concentrações das proteínas carbamoiladas nos estágios avançados de doença renal, como mostrado na tabela 5.4 e figura 5.4. Apesar da diferença entre os grupos não ter atingido significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis (p=0,2163), a análise pelo teste de Jonckheere-Terpstra mostrou que quanto maior a perda de função, ou seja, a progressão dos estágios de DRC, maior será a carbamoilação (p=0,0414). De maneira similiar à HbA1c para monitoramento glicêmico no DM, a medida de proteínas carbamoiladas representa um registro médio do tempo de exposição à ureia, caracterizando a duração e severidade da doença renal, pois com a perda de TFGe há acúmulo de ureia e, naturalmente, aumento da carbamoilação de proteínas plasmáticas [35]. Em modelo animal este incremento também foi associado à maior carbamoilação de proteínas teciduais [79]. Por outro lado, o trabalho de Nicolas e colaboradores mostrou que, cinco semanas após a indução da DRC in vivo, as concentrações plasmáticas de homocitrulina foram semelhantes em ratos diabéticos com DRC, em comparação aos apenas diabéticos, sugerindo a inibição recíproca entre carbamoilação e glicação [80].

Kalim e colaboradores mostraram que a carbamoilação da albumina atinge sua concentração máxima durante o estágio 5 da DRC, enquanto estudos clínicos de Berg e colaboradores associaram a concentração de albumina carbamoilada com a maior mortalidade em pacientes com doença renal

avançada. Os resultados de sobrevida foram melhores naqueles com maior redução da carbamoilação, com o início de terapia renal substitutiva, independentemente dos fatores de risco tradicionais [9, 43].

A interpretação dos nossos achados e da literatura permite inferir que a presença de diabetes e de doença renal não acarreta mudanças significativas nas proteínas plasmáticas, provavelmente pela competição dos produtos glicação e carbamoilação pelos mesmos sítios de ligação. Contudo, a albumina, por ser a proteína plasmática de maior meia-vida, está mais exposta a variações glicêmicas e a uremia, justificando a maior carbamoilação nos estágios mais tardios da DRC do diabetes.

Em uma segunda fase deste projeto, o transporte reverso de colesterol, mediado por HDL_2 e HDL_3, que reflete a exportação de colesterol via ABCG-1, foi avaliado utilizando macrófagos obtidos a partir de células isoladas da medula óssea de camundongos machos da linhagem C57/BL6. Observamos que os macrófagos tratados por 18 horas com albumina isolada de indivíduos com diabetes e função renal reduzida (TFG < 60 mL/min/1,73m²) tiveram significativa redução do efluxo de colesterol em relação aos indivíduos do grupo controle e DRC com função renal normal (TFG ≥ 60 mL/min/1,73m²), como mostrado na figuras 5.5 A e B. Não houve diferença estatisticamente significativa entre controle e DRC com função renal normal mediado por HDL_2 (p=0,9569) e HDL_3 (p=0,2865).

Em outro experimento, incubamos albumina isolada de indivíduos separados por estágio de DRC, sob mesma metodologia, mas com tempo de tratamento de 48 horas, encontramos menor efluxo de mediado pela HDL_2 no TFGe < 15 mL/min/1,73m², comparado aos outros estágios (p=0,0274), presente

na figura 5.6. Trabalhos anteriores, utilizando pool de albuminas isoladas de ratos com DRC induzida cirurgicamente após nefrectomia 5/6, demonstraram redução de efluxo de colesterol em macrófagos mediado por apo A-I e por HDL_2 em comparação a albuminas isoladas de ratos sem DRC [65]. Em humanos, a capacidade de remoção de colesterol celular, via HDL, foi discretamente superior no soro de adultos e crianças com DRC estágios 3-5 do que os controles sem DRC [81]. Indivíduos com DM2 e controle glicêmico ruim tiveram alteração seletiva na expressão gênica de macrófagos, prejudicando o efluxo de colesterol mediado pela apo AI, HDL_2 e HDL_3, provocando acúmulo de lípides intracelulares e contribuindo para a aterogênese [67]. Outros trabalhos na literatura buscaram mensurar as implicações da carbamoilação sobre perfil de diversas proteínas séricas, como as lipoproteínas. A LDL carbamoilada tem menor reconhecimento/depuração pelo receptor de LDL, maior poder de adesão e de apoptose endotelial, bem como de promover estresse oxidativo [82, 83, 84]. De maneira semelhante, a HDL carbamoilada é disfuncional e promove formação de células espumosas [85]. Tan e colaboradores, em recente estudo de coorte com 1320 pacientes com DM2 e TFGe ≥30 mL/min/1,73m^2, acompanhados em média por 9 anos, encontrou associação entre maior concentração de HDL carbamoilada com a progressão da DRC, definida pela duplicação da creatinina sérica ou início de diálise [86]. Em relação à albumina, Berg e colaboradores têm resultados em estudos clínicos que correlaciona albumina carbamoilada com maior mortalidade em pacientes com insuficiência renal tratada com diálise [9].

Vários estudos prévios descreveram que a ligação do colesterol livre à albumina atuaria como transportador de colesterol de baixa afinidade e alta capacidade. Embora a apo A-I tenha maior eficiência no efluxo, as altas

concentrações de albumina no plasma compensariam sua menor taxa de efluxo em comparação com a apo A-I. Desta forma, especula-se que albumina possa ser a protagonista no TRC em células dos tecidos periféricos [87, 88, 89]. Esses resultados, em conjunto, reforçam que a albumina isolada num contexto de DRC e uremia prejudica o efluxo de colesterol e favorece acúmulo de lípides em macrófagos.

Ao considerarmos as possíveis limitações desse estudo, nos deparamos com os valores de uremia que atingem diferença estatística apenas entre os estágios extremos da DRC, pois o aumento é gradativo com mudanças sutis entre os grupos, completamente distinto de modelos experimentais de DRC induzida por nefrectomia com uremia grave, nos quais comparações acontecem entre dois grupos distintos, normal e urêmico. Isto provavelmente explique as respostas biológicas de glicação e carbamoilação mais discretas à uremia, quando comparamos os vários estágios de DRC nesse estudo de vida real. Possivelmente, se tivéssemos estratificado a população com a mesma TFGe e diferentes HbA1c; para tanto com aumento o número de participantes, talvez conseguiríamos tornar mais evidentes essas diferenças entre os grupos no que se refere ao perfil de glicação das albuminas e o impacto dessa condição sobre efluxo de colesterol celular.

O transporte reverso de colesterol é processo crucial em defesa da aterogênese e a HDL é peça-chave nesse mecanismo. As concentrações de HDL-c no plasma são parâmetros limitados para predizer desfechos cardiovasculares, estudos clínicos voltados para aumentar a HDL-c não se mostraram eficazes [74, 89]. Neste sentido, o presente estudo traz como novos achados o papel da albumina sérica, que num contexto de hiperglicemia crônica

e uremia, tem suas propriedades funcionais alteradas e prejudica o efluxo de colesterol celular mediado por subfrações de HDL, favorecendo o acúmulo de lipídes, inflamação e aterosclerose em uma população considerada de alto risco cardiovascular

7. CONCLUSÃO

A albumina isolada de pacientes com diabetes e DRC, com TFG <60 mL/min/1,73m², é modificada por maior carbamoilação e prejudica o efluxo de colesterol mediado por HDL_2 e HDL_3, o que poderia favorecer o acúmulo de lípides em macrófagos e distúrbios no transporte reverso de colesterol. Nossos achados podem contribuir para um maior entendimento sobre a avançada aterosclerose nos pacientes com DRC.

8. ANEXOS

8.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....
E.MAIL: .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....
E.MAIL: .....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em diferentes estágios de doença renal.

2. PESQUISADOR: Márcia Silva Queiroz, médica, CRM: 77963
Aécio Lopes de Araújo Lira, médico, CRM: 147659
Marisa Passareli, bióloga, responsável substituta pelo Laboratório de Lípides (LIM 10) da Faculdade de Medicina da USP

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia e Metabologia da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Laboratório de Investigações Médicas da Faculdade de Medicina da USP – LIM 10

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

(em virtude da necessidade de coletas de sangue)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

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

1. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa mostrar que a diminuição progressiva de função renal contribui para várias mudanças metabólicas, hemodinâmicas e inflamatórias que levam a alterações em algumas proteínas e no colesterol, aumentando as chances de doenças do coração. Este estudo tem a finalidade de avaliar parâmetros relacionados a essas mudanças metabólicas e inflamatórias em diversos tipos de colesterol (gorduras do sangue) em pessoas com diabetes e doença renal crônica. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação e consentimento são muito importantes. Este termo de consentimento faz parte do processo de consentimento livre e esclarecido e tem como objetivo informar-lhe sobre o estudo e o que irá lhe acontecer se você decidir participar dele. Leia este documento atentamente para ter certeza de que entendeu todas as informações que ele apresenta.

2. Os procedimentos de rotina como coleta de amostras de sangue serão realizados por um profissional de enfermagem qualificado, após jejum de 12 horas, no início da manhã, colocando uma agulha na veia, utilizando seringas e agulhas descartáveis.

3. Os riscos e desconfortos serão mínimos, apenas decorrentes da coleta de sangue, que podem ser: dor no local da punção e formação de pequena mancha roxa sem risco à saúde ou decorrentes do jejum de 12 horas, que podem ser tonturas, náuseas, mal estar ou hipoglicemias.

4. Esperamos que os resultados deste estudo contribuam para o melhor entendimento do impacto da redução progressiva da função dos rins em pessoas com diabetes no transporte e utilização do colesterol do sangue, na resposta inflamatória, desta forma, ajudando a esclarecer fatores que possam aumentar as doenças do coração.

5. A dieta e a medicação habitual serão mantidas, de acordo com recomendação médica, bem como o agendamento das consultas.

6. Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Márcia Silva Queiroz, que pode ser encontrado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar sala 3305, telefone 3061-7263, e.mail: marcia.queiroz@hc.fm.usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

7. Você tem o direito de acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas, assim como a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

8. Seu direito de confidencialidade será garantido. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9. Toda a assistência médica será realizada pela equipe do Ambulatório de Nefropatia Diabética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

10. Não cabe indenização pelo fato do estudo apresentar risco mínimo à saúde.

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

(.....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar a cada pesquisa futura na qual será utilizado com o meu material.

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

O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq).

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **"Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 em diferentes estágios de doença renal".**
Eu discuti com o Dra. Márcia Silva Queiroz sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data_____/_____/_____

Assinatura da testemunha Data_____/_____/_____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data_____/_____/_____

8.2 Plataforma Brasil

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios de doença renal .

Pesquisador: Márcia Silva Queiroz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65670017.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.982.033

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de coorte transversal envolvendo indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2, diagnosticados há pelo menos 10 anos,com idade superior a 45 anos, ambos os sexos, com doença renal diabética estágio 1 a 5 ou em terapia renal substitutiva e valores de hemoglobina glicada entre 7-9%, em seguimento regular no Hospital das Clínicas da FMUSP. Os pesquisadores vão avaliar o transporte reverso de colesterol,inflamação e estresse do retículo endoplasmático.O projeto apresenta seus objetivos bem descritos, faz parte da linha de pesquisa dos pesquisadores e o TCLE obedece as normas exigidas pela comissão.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores pretendem avaliar o papel das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes. Os objetivos estão claros e apresentam relevância científica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O desenvolvimento do protocolo não apresenta riscos para o sujeito da pesquisa e trarão a longo prazo esclarecimentos sobre a patogênese da doença.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5° andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande relevância na área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado e cumpre as regras exigidas pela comissão.

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_702936.pdf	13/03/2017 21:14:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_DRD_e_transporte_coleterol.docx	13/03/2017 21:13:31	Márcia Silva Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_DRD_e_transporte_colesterol_2017.pdf	13/03/2017 21:11:15	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Outros	documento_cappesq.pdf	13/03/2017 21:05:38	Márcia Silva Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	13/03/2017 21:04:04	Márcia Silva Queiroz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Não

SAO PAULO, 24 de Março de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

8.3 Comissão de Ética no uso de animais (CEUA)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada **"Influência das modificações decorrentes da glicação da albumina e carbamilação de lipoproteínas no transporte reverso de colesterol, resposta inflamatória e estresse de retículo endoplasmático em portadores de diabetes mellitus tipo 2 em diferentes estágios da Doença Renal Diabética"**, registrada com o **nº 1015/2018**, sob a responsabilidade de **Marisa Passarelli** e **Aecio Lopes de Araujo Lira**, apresentada pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 21.03.18

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03-04-2018 Término: 03-04-2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	**72**
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 21 de Março de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

9. REFERÊNCIAS

1. Molitch ME, Adler AI, Flyvbjerg A, Nelson RG, So W-Y, Wanner C, et al. Diabetic kidney disease: a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes. Kidney Int 2014;87(1):1–11.
2. Kdoqi. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. Am J Kidney Dis 2007;49(2 Suppl 2):S12-154.
3. Levey AS, Eckardt K, Dorman NM, Christiansen SL, Hoorn J, Ingelfinger JR, et al. Nomenclature for Kidney Function and Disease: Report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. Kidney Int 2020;
4. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. J Bras Nefrol. 2019;41(2):208–14.
5. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, Boer IH De, Goldstein-fuchs J, et al. Diabetic Kidney Disease : A Report From an ADA Consensus Conference. Diabetes Care. 2014;37(October):2864–83.
6. IDF. IDF Diabetes Atlas 2019 International Diabetes Federation. 2019. 1
7. de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J, et al. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. JAMA. 2011 Jun 22;305(24):2532–9.
8. Delanghe S, Delanghe JR, Speeckaert R, Van Biesen W, Speeckaert MM. Mechanisms and consequences of carbamoylation. Nat Rev Nephrol. 2017;13(9):580–93.
9. Berg AH, Drechsler C, Wenger J, Buccafusca R, Hod T, Kalim S, et al.

Carbamylation of serum albumin as a risk factor for mortality in patients with kidney failure. Sci Transl Med 2013;5(175):175ra29.

10. Tonelli MA, Wanner C, Cass A, Garg AX, Holdaas H, Jardine AG, et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) lipid work group. KDIGO clinical practice guideline for lipid management in chronic kidney disease. Kidney Int Suppl. 2013;3(3):1–315.
11. Reiss AB, Voloshyna I, De Leon J, Miyawaki N, Mattana J. Cholesterol Metabolism in CKD. Am J Kidney Dis 2015;1–12.
12. Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, Francisco A, Jong PE, et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kidney Int Suppl. 2013 Jan 1;3:1–150.
13. American Diabetes Association. 11. Microvascular Complications and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. Diabetes Care. 2020;43(January):S135–51.
14. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. In 2019. p. 318–37.
15. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro III AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. Ann Intern Med. 2009 May 5;150(9):604–12.
16. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: Synopsis of the kidney disease: Improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. Ann Intern Med. 2013;158(11):825–30.
17. Earley A, Miskulin D, Lamb EJ, Levey AS, Uhlig K. Estimating Equations for Glomerular Filtration Rate in the Era of. Ann Intern Med.

2012;156(11):785–96.

18. Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, et al. KDOQI Commentary KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. Am J Kidney Dis. 2014;63(5):713–35.
19. Kirsztajn GM, Filho NS, Draibe SA, Netto MV de P, Thomé FS, Souza E, et al. Fast reading of the KDIGO 2012: guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease in clinical practice. J Bras Nefrol orgão Of Soc Bras e Latino-Americana Nefrol. 2014;36(1):63–73.
20. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature. 2001 Dec;414:813.
21. Mora-Fernández C, Domínguez-Pimentel V, de Fuentes MM, Górriz JL, Martínez-Castelao A, Navarro-González JF. Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. J Physiol. 2014;592(18):3997–4012.
22. Machado AP, Pinto RS, Moysés ZP, Nakandakare ER, Quintão ECR, Passarelli M. Aminoguanidine and metformin prevent the reduced rate of HDL-mediated cell cholesterol efflux induced by formation of advanced glycation end products. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(3):392–403.
23. Marsche G, Weigle B, Sattler W, Malle E. Soluble RAGE blocks scavenger receptor CD36-mediated uptake of hypochlorite-modified low-density lipoprotein. FASEB J. 2007 Oct;21(12):3075–82.
24. Brown BE, Imran R, M. van RD, J. DM. Glycation of low-density lipoprotein results in the time-dependent accumulation of cholesteryl esters and apolipoprotein B-100 protein in primary human monocyte-derived macrophages. FEBS J. 2007 Feb;274(6):1530–41.

25. Kato H. Chemical Studies on Amino — Carbonyl Reaction. 2014;1369(1962).

26. Rabbani N, Thornalley PJ. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease. Kidney Int. 2018;93(4):803–13.

27. Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins. 1998;273(30):18714–9.

28. Baidoshvili A, Niessen HWM, Stooker W, Huybregts RAJM, Hack CE, Rauwerda JA, et al. N(Carboxymethyl)lysine depositions in human aortic heart valves: similarities with atherosclerotic blood vessels. Atherosclerosis. 2004 Jun;174(2):287–92.

29. Ahmed MU, Thorpes SR, Baynesst JW. Identification of W-Carboxymethyllysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein. 1986;

30. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. J Intern Med. 2002 Feb 1;251(2):87–101.

31. Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. Redox Biol. 2015;6(2):495–504.

32. Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: Untangling ariadne's thread. Int J Mol Sci. 2019;20(15):1–17.

33. Jaisson S, Gillery P. Evaluation of nonenzymatic posttranslational modification-derived products as biomarkers of molecular aging of proteins. Clin Chem. 2010;56(9):1401–12.

34. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and

atherogenesis. Nat Med. 2007 Oct;13(10):1176–84.

35. Kalim S, Karumanchi SA, Thadhani RI, Berg AH. Protein Carbamylation in Kidney Disease: Pathogenesis and Clinical Implications. Am J Kidney Dis. 2014;64(5):793–803.

36. Jaisson S, Pietrement C, Gillery P. Carbamylation-derived products: Bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. Clin Chem. 2011;57(11):1499–505.

37. Verbrugge FH, Tang WHW, Hazen SL. Protein carbamylation and cardiovascular disease. Kidney Int. 2015;88(3):474–8.

38. 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):709–15.

39. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin Synthesis. N Engl J Med. 1972 Apr 6;286(14):748–57.

40. Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. Arch Biochem Biophys 2003 Nov 1;419(1):25–30.

41. Drechsler C, Kalim S, Wenger JB, Suntharalingam P, Hod T, Thadhani RI, et al. Protein carbamylation is associated with heart failure and mortality in diabetic patients with end-stage renal disease. Kidney Int. 2015;87(6):1201–8.

42. Ok E, Basnakian AG, Apostolov EO, Barri YM, Shah S V. Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells : A link to atherosclerosis in patients with kidney disease. 2005;68:173–8.

43. Kalim S, Trottier CA, Wenger JB, Wibecan J, Ahmed R, Ankers E, et al. Article Longitudinal Changes in Protein Carbamylation and Mortality Risk

after Initiation of Hemodialysis. 2016;11(1):1809–16.

44. Gillery P, Jaisson S. Post-translational modification derived products (PTMDPs): toxins in chronic diseases?. Vol. 52, Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2014. p. 33.

45. Sun JT, Yang K, Lu L, Zhu Z Bin, Zhu JZ, Ni JW, et al. Increased carbamylation level of HDL in end-stage renal disease: Carbamylated-HDL attenuated endothelial cell function. Am J Physiol - Ren Physiol. 2016;310(6):F511–7.

46. Meerwaldt R, Zeebregts CJ, Navis G, Hillebrands J-L, Lefrandt JD, Smit AJ. Accumulation of Advanced Glycation End Products and Chronic Complications in ESRD Treated by Dialysis. Am J Kidney Dis. 2009 Jan;53(1):138–50.

47. Henle T, Miyata T. Advanced glycation end products in uremia. Adv Ren Replace Ther. 2003 Oct;10(4):321–31.

48. Kalousová M, Havrdová E, Mrázová K, Špaček P. Advanced Glycoxidation End Products in Patients with Multiple Sclerosis. Prague Med Rep. 2005;(February):167–74.

49. Miyata S, Koshikawa N, Higashi S, Miyagi Y, Nagashima Y, Kato Y, et al. Expression of Trypsin in Human Cancer Cell Lines and Cancer Tissues and Its Tight Binding to Soluble Form of Alzheimer Amyloid Precursor Protein in Culture. J Biochem. 1999;125(6):1067–76.

50. Blaauw J, Smit AJ, van Pampus MG, van Doormaal JJ, Aarnoudse JG, Rakhorst G, et al. Skin autofluorescence, a marker of advanced glycation end products and oxidative stress, is increased in recently preeclamptic women. Am J Obstet Gynecol. 2006 Sep;195(3):717–22.

51. Chiang K-H, Huang P-H, Huang S-S, Wu T-C, Chen J-W, Lin S-J. Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products are associated with endothelial function and predict cardiovascular events in nondiabetic patients. Coron Artery Dis. 2009;20(4).

52. Semba RD, Ferrucci L, Sun K, Beck J, Dalal M, Varadhan R, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors predict cardiovascular disease mortality in older community-dwelling women. Aging Clin Exp Res. 2009 Apr;21(2):182–90.

53. Baumann M, Richart T, Sollinger D, Pelisek J, Roos M, Kouznetsova T, et al. Cardiovascular Diabetology. 2009;8:1–8.

54. Pu LJ, Lu L, Shen WF, Zhang Q, Ding FH, Chen QJ, et al. Increased Serum Glycated Albumin Level is Associated With the Presence and Severity of Coronary Artery. 2007;71(July):1067–73.

55. Gryszczyńska B, Formanowicz D, Budzyń M, Wanic-Kossowska M, Pawliczak E, Formanowicz P, et al. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. Biomed Res Int. 2017;2017.

56. Ferro CJ, Mark PB, Kanbay M, Sarafidis P, Heine GH, Rossignol P, et al. Lipid management in patients with chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol 2018;14(12):727–49.

57. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. ClinChemLab Med. 2013;52(1434-6621 (Electronic)):1–33.

58. Lusis A. Atherosclerosis. Nature. 2000;407(6801):233–41.

59. Levinson SS, Wagner SG. Implications of reverse cholesterol transport: Recent studies. Clin Chim Acta 2015 Jan 15;439:154–61.

60. Ye D, Lammers B, Zhao Y, Meurs I, J.C. Van Berkel T, Van Eck M. ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1, HDL Metabolism, Cholesterol Efflux, and Inflammation: Important Targets for the Treatment of Atherosclerosis. Curr Drug Targets. 2011;12(5):647–60.

61. Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. J Lipid Res. 2014;55(3):561–72.

62. Vaziri ND. Lipotoxicity and Impaired High Density Lipoprotein-Mediated Reverse Cholesterol Transport in Chronic Kidney Disease. J Ren Nutr 2010;20(5):S35–43.

63. Merscher S, Pedigo CE, Mendez AJ. Metabolism, energetics, and lipid biology in the podocyte - cellular cholesterol-mediated glomerular injury. Front Endocrinol (Lausanne) 2014;5(October):169

64. Kon V, Ikizler TA, Fazio S. Importance of high-density lipoprotein quality: Evidence from chronic kidney disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2013;22(3):259–65.

65. Machado JT, Iborra RT, Fusco FB, Castilho G, Pinto RS, Machado-Lima A, et al. N-acetylcysteine prevents endoplasmic reticulum stress elicited in macrophages by serum albumin drawn from chronic kidney disease rats and selectively affects lipid transporters, ABCA-1 and ABCG-1. Atherosclerosis 2014;237(1):343–52.

66. Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Sartori CH, Oliveira ER, Nakandakare ER, et al. 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 2013 Jan 1;29(1):66–76.

67. Machado-Lima A, Iborra RT, Pinto RS, Castilho G, Sartori CH, Oliveira ER, et al. In Type 2 Diabetes Mellitus Glycated Albumin Alters Macrophage Gene Expression Impairing ABCA1-Mediated Cholesterol Efflux. J Cell Physiol 2015;230(6):1250–7.

68. Xu L, Wang YR, Li PC, Feng B. Advanced glycation end products increase lipids accumulation in macrophages through upregulation of receptor of advanced glycation end products: Increasing uptake, esterification and decreasing efflux of cholesterol. Lipids Health Dis 2016;15(1):1–13.

69. Castilho G, Okuda LS, Pinto RS, Iborra RT, Nakandakare ER, Santos CX, et al. 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 2012;44(7):1078–86.

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

71. Iborra RT, MacHado-Lima A, Castilho G, Nunes VS, Abdalla DS, Nakandakare ER, et al. Advanced Glycation in macrophages induces intracellular accumulation of 7-ketocholesterol and total sterols by decreasing the expression of ABCA-1 and ABCG-1. Lipids Health Dis. 2011;10:1–7.

72. Okuda LS, Castilho G, Rocco DDFM, 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 - Mol Cell Biol Lipids 2012 Dec;1821(12):1485–92.

73. Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, Tomson J, et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. N Engl J Med. 2014;371(3):203–12.

74. Kalil RS, Wang JH, De Boer IH, Mathew RO, Ix JH, Asif A, et al. Effect of extended-release niacin on cardiovascular events and kidney function in chronic kidney disease: A post hoc analysis of the AIM-HIGH trial. Kidney Int 2015;87(6):1250–7.

75. Havel RJ, Eder HA, Bragdon HJ. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest. 1955;34(9):1345–53.

76. Basu SK, Goldstein JL, Anderson GW, Brown MS. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 1976 Sep;73(9):3178–82.

77. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 Nov 1;193(1):265–75.

78. Pietrement C, Gorisse L, Jaisson S, Gillery P. Chronic increase of urea leads to carbamylated proteins accumulation in tissues in a mouse model of CKD. PLoS One. 2013;8(12):1–10.

79. Nicolas C, Jaisson S, Gorisse L, Tessier FJ, Niquet-Léridon C, Jacolot P, et al. Carbamylation is a competitor of glycation for protein modification in vivo. Diabetes Metab. 2018;44(2):160–7.

80. Meier SM, Wultsch A, Hollaus M, Ammann M, Pemberger E, Liebscher F,

et al. Effect of chronic kidney disease on macrophage cholesterol efflux. Life Sci 2015;136:1–6.

81. Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Hörkkö S, Barnard J, et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. Nat Med. 2007;13(10):1176–84.

82. Carracedo J, Merino A, Briceño C, Soriano S, Buendía P, Calleros L, et al. Carbamylated low-density lipoprotein induces oxidative stress and accelerated senescence in human endothelial progenitor cells. FASEB J. 2011;25(4):1314–22.

83. Apostolov EO, Basnakian AG, Yin X, Ok E, Shah S V. Modified LDLs induce proliferation-mediated death of human vascular endothelial cells through MAPK pathway. Am J Physiol - Hear Circ Physiol. 2007;292(4):1836–46.

84. Holzer M, Gauster M, Pfeifer T, Wadsack C, Fauler G, Stiegler P, et al. Protein carbamylation renders high-density lipoprotein dysfunctional. Antioxidants Redox Signal. 2011;14(12):2337–46.

85. Tan KCB, Cheung C-L, Lee ACH, Lam JKY, Wong Y, Shiu SWM. Carbamylated Lipoproteins and Progression of Diabetic Kidney Disease. Clin J Am Soc Nephrol 2020 Feb 19;CJN.11710919.

86. Zhao Y, Marcel YL. Serum albumin is a significant intermediate in cholesterol transfer between cells and lipoproteins. Biochemistry. 1996;35(22):7174–80.

87. Sankaranarayanan S, De La Llera-Moya M, Drazul-Schrader D, Phillips MC, Kellner-Weibel G, Rothblat GH. Serum albumin acts as a shuttle to enhance cholesterol efflux from cells. J Lipid Res. 2013;54(3):671–6.

88. Ha JS, Ha CE, Chao JT, Petersen CE, Theriault A, Bhagavan N V. Human

serum albumin and its structural variants mediate cholesterol efflux from cultured endothelial cells. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res. 2003;1640(2–3):119–28.

89. Boden W, Probstfield J, Anderson T. Niacin in Patients with Low HDL Cholesterol Levels Receiving Intensive Statin Therapy. N Engl J Med. 2011 Nov 15;365(24):2255–67.