

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA – CIÊNCIAS
DA SAÚDE

Eduarda Palanca dos Santos

**SENSIBILIZAÇÃO INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS TUBULARES
RENAIS HUMANAS (HK-2) PELO TRATAMENTO COM
ALBUMINA CONTROLE OU MODIFICADA POR GLICAÇÃO
AVANÇADA COMPLEXADA COM ÁCIDOS GRAXOS LIVRES**

São Paulo, SP

2023

Eduarda Palanca dos Santos

**SENSIBILIZAÇÃO INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS TUBULARES
RENAIS HUMANAS (HK-2) PELO TRATAMENTO COM
ALBUMINA CONTROLE OU MODIFICADA POR GLICAÇÃO
AVANÇADA COMPLEXADA COM ÁCIDOS GRAXOS LIVRES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina – Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Profa. Dra. Marisa Passarelli

São Paulo, SP

2023

Palanca, Eduarda.

Sensibilização inflamatória de células tubulares renais humanas (HK-2) pelo tratamento com albumina controle ou modificada por glicação avançada complexada com ácidos graxos livres. / Eduarda Palanca dos Santos. 2023.

54 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2023.

Orientador (a): Prof. Dr. Marisa Passarelli.

1. Doença renal diabética. 2. Ácidos graxos. 3. Produtos de glicação avançada. 4. Diabetes mellitus. 5. Inflamação.

I. Passarelli, Marisa.

II. Título

CDU 616

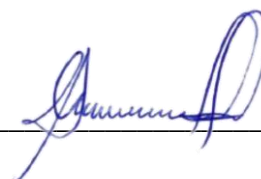
São Paulo, 12 de dezembro de 2023.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluna: **EDUARDA PALANCA DOS SANTOS**

Título da dissertação: **SENSIBILIZAÇÃO INFLAMATÓRIA DE CÉLULAS TUBULARES RENAIAS HUMANAS (HK-2) PELO TRATAMENTO COM ALBUMINA CONTROLE OU MODIFICADA POR GLICAÇÃO AVANÇADA COMPLEXADA COM ÁCIDOS GRAXOS LIVRES.**

Presidente: PROFA. DRA. MARISA PASSARELLI



Membro: PROFA. DRA. MÁRCIA SILVA QUEIROZ



Membro: PROFA. DRA. MARIA LÚCIA CARDILLO CORRÊA GIANNELLA



DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu avô Henrique Palanca, que sem sombra de dúvidas está muito feliz e orgulhoso onde quer que esteja com tudo que venho me tornado. Aos meus pais, principalmente minha mãe, que sempre esteve ao meu lado apoiando meus sonhos. Agradeço aos meus tios, que, mesmo sem compreender completamente o significado disso para mim, estiveram presentes. Aos meus irmãos, Felipe e Evandro, a quem amo profundamente e que sempre estão vivendo meus sonhos comigo. Ao Daniel, meu parceiro de vida, que esteve ao meu lado do início ao fim deste processo, contribuindo e mantendo a confiança de que tudo daria certo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Marisa Passarelli, expresso minha gratidão por toda dedicação, ensinamentos e por confiar em mim durante todo o processo. Agradeço por literalmente segurar minha mão e percorrer este caminho ao meu lado.

Agradeço à Sayonara Assis e à Dra. Adriana Saldiba, que me ensinaram desde o início e me guiaram nos primeiros passos com o cultivo celular.

Um agradecimento especial à Danielle Ribeiro e Vitória Pires, por serem tão solícitas e compreensíveis.

À ME Monique Mello, minha gratidão por sua positividade e disposição em ajudar e contribuir, por me acompanhar e viver essa reta final de experimento comigo. Expresso meu agradecimento à ME Kelly Gomes e Leonardo Szalo por me acompanharem e ajudarem nesta fase final dos experimentos, garantindo que tudo ocorresse conforme planejado.

Ao Dr. Sérgio Catanozi, agradeço por sempre transmitir tranquilidade e demonstrar interesse em minha rotina e atividades.

Aos meus colegas de curso ME Lucas Pereira e ME Amarillis Campos, que além de serem meus companheiros em aulas e trabalhos, foram fundamentais durante toda essa jornada.

Agradeço aos funcionários e alunos do Instituto Pasteur, Butantã e Unifesp pela ajuda e disponibilidade em me receber e auxiliar no cultivo celular, além de concederem alíquotas de células para a estruturação do meu banco.

Aos vizinhos de laboratório, em especial o LIM18, LIM16 e LIM51, agradeço por cederem equipamentos quando necessário para dar continuidade ao projeto.

À Dra. Denise do laboratório LIM51, meu agradecimento por auxiliar na condução desta fase final do experimento e por compartilhar os kits de análise do projeto, sempre nos auxiliando com positividade e gentileza.

À Dra. Maria Lucia Gianella, expresseo minha gratidão por sua contribuição e assistência na execução do projeto.

À Universidade Nove de Julho, agradeço por todo suporte e pela disponibilização de bolsa que viabilizou a realização do curso.

Ao sistema PROSUP e CNPQ, meu reconhecimento pelo suporte e financiamento do projeto.

À meu avô Henrique Palanca (*in memorian*), uma figura de imensa importância em minha vida, que contribuiu significativamente para meu crescimento e formação. Seus ensinamentos e valores serão carregados por toda a minha vida. Ele nunca duvidou do meu potencial, acreditando plenamente que eu conquistaria todos os meus sonhos.

À minha mãe Maria, que personifica força, dedicação e perseverança. Ela sempre me mostrou que o estudo me levaria longe.

Ao meu pai Luiz, que se orgulha e, sempre que possível, comenta com entusiasmo tudo que venho conquistando.

Aos meus irmãos Felipe e Evandro, que sempre me apoiaram e me incentivaram a prosseguir em busca dos meus sonhos.

À minha família (Marlene, Antônio Carlos, João, Henrique), agradeço por abraçarem comigo mesmo que não compreendam completamente minhas escolhas.

Aos meus primos, que demonstraram curiosidade ao longo desse caminho, acompanhando meus experimentos e progressos.

Ao Daniel, meu maior companheiro e apoiador, que compartilha comigo cada etapa do processo e sempre lembra que, no final, tudo dará certo.

À família do Daniel, que, mesmo sem entender completamente meu projeto, sempre torceu pelo meu sucesso.

Ao Fred, minha companhia de quatro patas, que esteve comigo em muitos momentos de estudo na madrugada ao longo de todo esse tempo.

Às minhas meninas (Pamela Medina, Bianca Seródio, Priscila Santos, Esthelinha, Mariana Palanca e Heloysa Lopes), que sempre estiveram ouvindo minhas dificuldades e desafios, fornecendo palavras de apoio e consolo.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este caminho tão importante em minha jornada, minha enorme gratidão.

A Deus por estar sempre ao meu lado, abençoando minhas escolhas e guiando meu caminho.

RESUMO

Palanca E. Sensibilização inflamatória de células tubulares renais humanas (HK-2) pelo tratamento com albumina controle ou modificada por glicação avançada complexada com ácidos graxos livres.

A hiperglicemia, com formação de produtos de glicação avançada (AGE), e as dislipidemias favorecem o desenvolvimento da doença renal diabética (DRD). Ela contribui para o ingresso em terapias renais substitutivas e reduz a expectativa de vida. Avaliou-se o efeito da albumina controle ou modificada por AGE, complexadas com ácidos graxos, sobre a viabilidade e a sensibilização inflamatória em células tubulares renais humanas (HK-2). Albumina controle e AGE (modificada com glicolaldeído) complexadas com ácido palmítico ou oleico (0,1, 0,25 e 0,5mM) foram incubadas com células HK-2, por 48h, seguindo ausência ou presença de LPS (1µg/mL), por 24h. Determinou-se interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1beta (IL-1beta) por ELISA e a viabilidade celular, pela liberação de lactato desidrogenase. Albumina controle ou AGE com ácido palmítico induziu de maneira dose-dependente a secreção de IL-1beta, o que foi potencializado pelo LPS. Albumina-AGE com ácido palmítico 0,25mM aumentou IL-6 em comparação ao controle e 0,1mM. A secreção de IL-6 foi reduzida pelo ácido palmítico 0,5mM na presença de LPS em comparação ao controle, mas foi aumentada nas incubações com albumina-AGE complexada com ácido palmítico 0,25mM. Em comparação à albumina controle, a albumina-AGE apenas ou complexada com ácido palmítico 0,1mM reduziu IL-6 e atenuou IL-1beta. Albumina controle e AGE com ácido oleico 0,1mM aumentaram IL-6 na ausência ou presença de LPS, mas IL-1beta aumentou apenas com albumina-AGE complexada com ácido oleico, seguido de tratamento com LPS. Os resultados apontam para papel do ácido palmítico e oleico na sensibilização inflamatória das HK-2 e ressaltam a complexidade das interações entre albumina-AGE e ácidos graxos.

Palavras chave: Doença renal diabética; Ácidos graxos; Produtos de glicação avançada, Diabetes mellitus; Inflamação.

ABSTRACT

Palanca E. Inflammatory sensitization of human kidney tubular cells (HK-2) by treatment with control or advanced glycated albumin complexed with free fatty acids.

Hyperglycemia, coupled with the formation of advanced glycation products (AGE), and dyslipidemia favor the development of diabetic kidney disease (DKD), leading to the need for renal replacement therapies and a reduction in life expectancy. The effect of control or AGE-modified albumin, complexed with fatty acids, on viability and inflammatory sensitization in human renal tubular cells (HK-2) was evaluated. Control and AGE albumin (modified with glycolaldehyde) were complexed with palmitic or oleic acid (0.1, 0.25, and 0.5mM) by vortexing and incubated with HK-2 cells for 48 h. Subsequently, the cells were exposed to either the absence or presence of LPS (1µg/mL) for an additional 24 h. Interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1beta (IL-1beta) levels were measured using ELISA, and cell viability was assessed by monitoring the release of lactate dehydrogenase. Cell viability was not consistently affected in all experimental conditions. Control and AGE albumin with palmitic acid exhibited a dose-dependent induction of IL-1beta secretion, which was further potentiated by LPS. Notably, AGE albumin with 0.25mM palmitic acid increased IL-6 compared to control and 0.1mM, while IL-6 secretion was reduced by 0.5mM palmitic acid in the presence of LPS compared to control. However, it increased in incubations with AGE albumin complexed with 0.25mM palmitic acid. AGE albumin alone or complexed with 0.1mM palmitic acid promoted a reduction in IL-6 and an increase in IL-1beta compared to control albumin. In the case of oleic acid, both control and AGE albumin with 0.1mM oleic acid increased IL-6 in the absence or presence of LPS. However, IL-1beta increased only with AGE albumin complexed with oleic acid, particularly following LPS treatment. The results underscore the significant role of palmitic and oleic acid in the inflammatory sensitization of HK-2 cells, highlighting the intricate interactions between AGE albumin and fatty acids in the context of DKD.

Keywords: Diabetic kidney disease; Fatty acids; Advanced glycation end products; Diabetes mellitus; Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Lipotoxicidade no túbulo proximal.

Figura 2 - Eixo AGE-RAGE-TLR4 na indução de inflamação.

Figura 3 – Protocolo experimental.

Figura 4 - Protocolo experimental.

Figura 5 – Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina controle apenas ou complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Figura 6 – Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina-AGE apenas ou complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Figura 7 – Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 8 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 9 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 10 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 11 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 12 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS

Figura 13 - Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina controle apenas ou complexada com ácido oleico 0,1mM, seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Figura 14 - Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina-AGE apenas ou complexada com ácido oleico 0,1mM, seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Figura 15 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 16 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS

Figura 17 – Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 18 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 19 – Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Figura 20 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

LISTAS DE ABREVIATURAS

ABCA 1	Proteína cassete A1de ligação ao ATP 1
ABCG1	Proteína cassete G1de ligação ao ATP 1
AcilCoA	Coenzima A acilada
ADP	Difosfato de adenosina
AGE	Produtos de glicação avançada
AGER	Gene que codifica para o receptor de produtos de glicação avançada
AGER 1	Receptor de glicação avançada 1
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína cinase B
ATF4	Fator ativador de transcrição 4
ATF6	Fator ativador de transcrição 6
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPA1	Trifosfato de adenosina 1
BAX	Gene associado a apoptose
CD-36	<i>Cluster</i> de diferenciação 36
CT	Colesterol total
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRD	Doença renal diabética
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
FABP	Proteína de ligação de ácidos graxos
FABP1	Proteína de ligação de ácidos graxos 1
FABP2	Proteína de ligação de ácidos graxos 2
FABP4	Proteína de ligação de ácidos graxos 4
FATP	Proteína transportadora de AGL
FATP2	Proteína transportadora de AGL 2
FATP3	Proteína transportadora de AGL 3
FATP4	Proteína transportadora de AGL 4
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteínas de densidade alta
HDLc	Colesterol na lipoproteína de densidade alta
HIF1	Fator induzido por hipoxia
HK-2	<i>Human kidney -2</i> - Células tubulares proximais humanas imortalizadas
IC	Intervalo de confiança
IL6	Interleucina 6
IL1B	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de massa corporal
KIM-1	Molécula de lesão renal 1
LDL	Lipoproteínas de densidade baixa
LDLc	Colesterol na lipoproteína de densidade baixa
LOX-1	Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada (<i>lectin-type oxidized LDL receptor</i>)

LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NFKB	Fator nuclear KB
NRK-52E	Célula epitelial
PARP	Poli ADP ribose polimerase
PBS	Tampão Fosfato Salino
PKC	Proteína cinase C
PPAR	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma
RAGE	Receptor de produto de glicação avançada
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SLC27 A1	Proteína transportadora de ácidos graxos 1
SLC27 A2	Proteína transportadora de ácidos graxos 2
SLC27 A3	Proteína transportadora de ácidos graxos 3
SLC27 A4	Proteína transportadora de ácidos graxos 4
SREBP	Proteína de ligação ao elemento regulatório de esterol
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TG	Triglicérides
TGFB	Fator de transformação de crescimento beta
TIRAP	Proteína adaptadora contendo domínio do receptor toll-interleucina 1
TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4
TNF	Fator de necrose tumoral
ULK-1	Cinase ativadora de autofagia
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
DIABETES MELLITUS E DOENÇA RENAL DIABÉTICA.....	1
FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA RENAL DIABÉTICA	3
LÍPIDES E DOENÇA RENAL DIABÉTICA	4
ÁCIDOS GRAXOS (AGL) E LIPOTOXICIDADE NA DOENÇA RENAL DIABÉTICA (DRD)	6
PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGE) E DOENÇA RENAL DIABÉTICA	12
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	16
OBJETIVO.....	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
PREPARO DE ALBUMINA MODIFICADA POR GLICAÇÃO AVANÇADA.....	18
COMPLEXAÇÃO DE ALBUMINA COM ÁCIDOS GRAXOS	18
CULTURA DE CÉLULAS TUBULARES PROXIMAIS (HK-2)	18
VIABILIDADE CELULAR – DETERMINAÇÃO DE LACTATO DESIDROGENASE	19
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IL-1BETA E IL-6.....	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS	45

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus e doença renal diabética

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia, condição causada pela deficiência na secreção da insulina, na presença ou não de resistência à ação deste hormônio. A prevalência mundial do DM é elevada, com cerca de 463 milhões de indivíduos adultos (20 a 79 anos) afetados (Federação Internacional de Diabetes (IDF), 2019). O Brasil ocupa a quinta posição para a doença, com, aproximadamente, 16,8 milhões de indivíduos adultos com DM, o que acarreta elevado custo em saúde pública (Brasil, 2022).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) ocorre frente à deficiência de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. Alterações imunológicas parecem contribuir sobremaneira, embora componentes genéticos, exposição a certos vírus e fatores ambientais também exerçam papel na sua etiologia (*American Diabetes Association*, 2014). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é a forma mais comum de DM, caracterizado por um quadro de resistência à insulina e defeitos na sinalização deste hormônio, com posterior falência na secreção de insulina determinada por fatores genéticos, lipo e glicotoxicidade. Isto acarreta hiperinsulinemia compensatória e, ao longo do tempo, falência na produção de insulina (Solis-Herrera et al., 2021). A prevalência de DM2 aumentou grandemente em todos os países nas últimas décadas, em decorrência do incremento da obesidade, sedentarismo e consumo de dietas industrializadas ricas em açúcares e gorduras.

Com a otimização da terapia insulínica e utilização de outras medicações, a sobrevida dos indivíduos com DM aumentou consideravelmente. A hiperglicemia, entretanto, continua como principal fator etiopatogênico para as complicações em longo prazo do DM. Elas incluem as microvasculares, como retinopatia, nefropatia e neuropatia, e as macrovasculares, representadas, principalmente, pelo infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2020). A retinopatia é a principal causa de cegueira na população adulta, acometendo 35,7% dos indivíduos com DM1 e 37,3% dos indivíduos com DM2 (Malerbi et al., 2022). A nefropatia diabética afeta cerca de 10 a 20% dos indivíduos com diabetes tipo 1 e cerca de 30 a 40% dos

indivíduos com diabetes tipo 2 e contribui como principal causa de ingresso em terapias substitutivas e transplante renal (Jung CY, Yoo TH, 2022). A neuropatia acomete aproximadamente 50 % dos indivíduos com DM, sendo a principal causa de amputação (Hicks e Selvin, 2019). As doenças cardiovasculares, têm por base a aterosclerose, e contribuem como principal causa de morbimortalidade no DM. Elas são 15 vezes mais prevalentes em indivíduos com doença renal avançada em comparação à população geral e concorrem para 40-50% de todas as mortes (Sarnak et al., 2003).

Indivíduos com DM, têm 2 vezes mais chance de terem doença renal, em comparação aos não diabéticos. As razões de chances para DRC variam entre 1,3 e 4,6, a depender da região do mundo, e esse risco é agravado pela presença de hipertensão (Koye et al., 2018). A doença renal diabética (DRD) tem maior prevalência entre os afro-americanos, asiáticos e nativos americanos do que entre os caucasianos. O *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) demonstrou que, entre 2009 e 2014, a prevalência da DRD foi de 26,2% em uma população adulta, baseando-se no critério de perda urinária de albumina persistente (Kramer et al, 2003; Afkarian et al., 2016; Koye et al. 2018)

De acordo com a Sociedade Brasileira de Nefrologia, a prevalência mundial da doença renal crônica (DRC) é de 7,2%, aumentando de 28% a 46% em indivíduos com idade superior a 30 e 64 anos, respectivamente. No Brasil, estima-se que a prevalência da doença seja de 50 casos por 100.000 habitantes (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2013).

A DRD é uma doença complexa e heterogênea que contribui para um número elevado de indivíduos em terapia renal substitutiva, transplante renal e morte prematura (Sá et al., 2022). A hiperglicemia é um importante contribuinte para a DRD, embora outros componentes como hipertensão arterial, dislipidemias, disfunção endotelial e tabagismo possam também agravar a gênese e evolução da doença.

A DRD baseia-se na presença de proteinúria, diminuição da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) ou ambos, sem caracterização patológica específica. De outro lado, a nefropatia diabética inclui a caracterização específica de alterações glomerulares estruturais e funcionais específicas (particularmente, aumento do substrato mesangial, lesões nodulares e fibrose

tubulointersticial), clinicamente caracterizadas por perda urinária de albumina e declínio progressivo da função renal.

A nefropatia diabética é a principal causa da DRD no DM1 com cinco ou mais anos de duração com albuminúria, mas a frequência pode variar amplamente no DM2 (*American Diabetes Association*, 2021; Alicic et al., 2017; Tuttle et al., 2014). Estima-se que 20 a 30% dos indivíduos com DM apresentem DRD (Alicic et al., 2017).

Clinicamente, a DRD é definida pela perda gradual de função renal com DM pré-existente ou excreção elevada de albumina na urina, podendo, em alguns casos, apresentar tais características simultaneamente (*American Diabetes Association*, 2021). A estratificação dos estágios da DRD é fundamentada na variação da taxa de filtração glomerular (TFG): estágio 1, com TFG ≥ 90 mL/min/1,73 m²; estágio 2, com TFG entre 60 a 89 mL/min/1,73 m²; estágio 3, TFG entre 30 a 59 mL/min/1,73 m², sendo subdividido em estágio 3a (TFG 45-59 mL/min/1,73 m²) e estágio 3b (TFG 30-44 mL/min/1,73 m²); estágio 4, com TFG entre 15 a 29 mL/min/1,73 m²; e estágio 5, com TFG inferior a 15 mL/min/1,73 m². Nesta etapa, a falta de intervenção específica, ocasiona perda progressiva da função renal, com possível evolução para insuficiência renal avançada e necessidade de tratamento dialítico (*National Kidney Foundation*, 2007; KDIGO 2013).

Fisiopatologia da Doença Renal Diabética

A fisiopatologia da DRD é complexa por envolver a participação de fenômenos metabólicos e hemodinâmicos. A hiperglicemia promove a liberação de mediadores vasoativos que causam dilatação da arteríola aferente e hiperfiltração glomerular (Tonneijck et al., 2017). Conjuntamente com a maior carga filtrada de glicose, a hiperglicemia promove lesões mediadas por insulto oxidativo e inflamatório local e pela formação de produtos de glicação avançada (AGE). Estes eventos culminam em disfunção mitocondrial, prejuízo na autofagia, hipóxia, lesão podocitária e tubuloglomerular (Tonneijck et al., 2017). As lesões glomerulares e vasculares na DRD reduzem o suprimento de oxigênio, o que promove a liberação do fator induzido por hipóxia (HIF) que exacerba a fibrose tecidual (Lin et al., 2018). Além disso, hiperglicemia, resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória são fatores que levam à disfunção endotelial,

Particularmente, destaca-se a liberação aumentada de endotelina-1 que causa, não apenas, vasoconstrição, mas lesão podocitária e fibrose (Lin *et al.*, 2018). Coletivamente, essas alterações resultam em hiperfiltração glomerular, hipertensão glomerular, hipertrofia renal e composição glomerular alterada, que se manifesta clinicamente como albuminúria e hipertensão (Koye *et al.*, 2018). Patologicamente, os rins sofrem várias alterações, incluindo deposição de matriz extracelular, espessamento da membrana basal glomerular, alterações proliferativas e atrofia tubular, resultando em fibrose intersticial e glomeruloesclerose.

As alterações na hemodinâmica glomerular, inflamação e fibrose são mediadores primários de dano tecidual renal, embora a contribuição relativa desses mecanismos, provavelmente, varie entre os indivíduos e ao longo da história natural da doença renal diabética (Yamazaki *et al.*, 2021; Alicic *et al.*, 2017).

Lípides e doença renal diabética

No DM2, a resistência insulínica cursa com hiperinsulinemia compensatória, que favorece vias lipogênicas no fígado, com maior produção de triglicérides (TG) e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Por outro lado, na periferia, a resistência insulínica favorece vias lipolíticas que promovem maior liberação de ácidos graxos livres (AGL) do tecido adiposo. Eles, ao serem captados pelo fígado favorecem a lipogênese hepática, perpetrando a hipertrigliceridemia. Além disso, os AGL, na superfície das lipoproteínas, e a modificação destas partículas por glicação avançada, reduzem a atividade da lipoproteína lipase (LPL). Isto se traduz em maior tempo de residência das lipoproteínas ricas em TG na circulação (Alicic *et al.*, 2017).

A concentração plasmática de TG vincula-se ao prejuízo da função renal e seu incremento é, de fato, potencial fator contribuinte para a evolução da DRD. Além disso, os TG e, em especial os AGL, perpetuam a resistência à insulina (Jenkins *et al.*, 2003).

A contribuição dos lípides plasmáticos para o desenvolvimento e progressão da DRD foi investigada em estudos clínicos em DM2 e DM1. No estudo *Action in Diabetes and Vascular Disease (ADVANCE)*, 11.140 indivíduos com DM2, foram seguidos por cinco anos e, em comparação com aqueles com

valores no tercil mais elevado, os indivíduos com HDLc no tercil mais baixo apresentaram um risco 19% maior de DRD, mesmo após ajuste para fatores confundidores (Niewczas MA et al., 2012). No estudo *Fenofibrate Intervention in End Point Lowering in Diabetes* (FIELD), 2.100 indivíduos com DM2 foram randomizados para receber fenofibrato ou placebo durante cinco anos; o fenofibrato reduziu a excreção urinária de albumina e o declínio da TFGe. Um maior benefício foi observado no subgrupo com TG plasmáticos > 200 mg/dL e o benefício diferiu de acordo com a magnitude de sua redução. Os resultados sugeriram que os efeitos do fenofibrato foram mediados pela redução de TG, embora não se possa afastar benefícios advindos de suas ações antioxidantes e anti-inflamatórias (Monteiro et al., 2016).

A dislipidemia também foi um fator de risco associado à progressão da DRD em indivíduos com DM1 acompanhados no estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT). A DRD associou-se a um maior conteúdo de lipoproteínas ricas em TG e suas subclasses (Jenkins et al., 2003). Na coorte finlandesa de indivíduos com DM1, acompanhada no estudo *Finnish Diabetic Nephropathy Study* (FinnDiane), as concentrações de TG e de colesterol total (CT) em partículas grandes de VLDL associaram-se à incidência de excreção urinária de albumina, enquanto as concentrações de TG e CT em partículas médias de VLDL associaram-se à progressão da perda urinária de albumina (Mäkinen et al., 2013).

Um estudo observacional, entre os anos de 2000 a 2014, em uma população de 911.360 indivíduos (*The English Clinical Practice Research Datalink*) evidenciou que a elevação dos TG plasmáticos e a redução de HDLc associaram-se independentemente com o desenvolvimento de estádios avançados da DRC (estádios 4 e 5) em uma mediana de seguimento de 7,5 anos. A razão de risco para o quartil mais alto de trigliceridemia comparado ao quartil mais baixo foi de 1,28 (95% CI, 1.15–1.43), após ajuste por sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), DM e outras variáveis (Weldegiorgis et al., 2022).

Em um estudo multicêntrico realizado em uma população de indivíduos com DM1 acompanhados em três diferentes hospitais terciários do estado de São Paulo, a concentração de TG plasmáticos conferiu um risco independente de 2,4 vezes para uma TFGe < 60 mL/min/1,73 m², ainda que a as

concentrações de TG estivessem < 150 mg/dL na maioria da população avaliada (Vieira et al., 2011). Da mesma forma, em análise longitudinal realizada numa coorte nacional, a concentração de TG foi significativamente maior nos indivíduos com declínio rápido da função renal em comparação àqueles com declínio lento ou ausente (Pelaes, 2021). Foram analisados 55,3% de indivíduos do sexo feminino, com média de idade de 31,0 (\pm 11,3) anos, duração do DM de 18,0 (\pm 9,7) anos e HbA1c média de 8,8 % (\pm 2,1) no início do seguimento, quanto ao declínio da função renal e fatores associados. No início do seguimento, 100 indivíduos (21,5%) já apresentavam DRD. A incidência acumulada de DRD foi de 28,2% e o tempo médio até a sua ocorrência foi de 13,6 anos. A incidência acumulada de doença renal avançada foi de 15,6% e o tempo médio até a sua ocorrência foi de 14 anos, contemplando uma incidência de 18,2 por 1.000 pessoas-ano. O declínio médio anual observado na TFGe foi de - 6,15 mL/min/1,73m² e o declínio mediano foi de -2,43 mL/min/1,73m². Um declínio anual maior que -7,0 mL/min/1,73m² foi caracterizado como declínio renal rápido e foi observado em 26,9% dos indivíduos; um declínio entre - 6,9 e - 2,43 mL/min/1,73m² foi caracterizado como declínio renal moderado, observado em 23,2% dos indivíduos e um declínio acima da mediana foi chamado de declínio renal lento ou ausente e foi observado em 49,9% dos indivíduos (Pelaes, 2021).

O risco de um indivíduo com declínio médio em desenvolver DRD foi 5,4 vezes maior do que um indivíduo com declínio lento ou ausente e o risco de um indivíduo com declínio rápido desenvolver DRD foi 48 vezes maior do que um indivíduo com declínio lento ou ausente (Pelaes, 2021). Os fatores associados ao declínio rápido da função renal foram: pior controle glicêmico, maior excreção urinária de albumina, maior frequência de hipertensão arterial, neuropatia autonômica cardiovascular, hiperfiltração, DRD no início do seguimento e dislipidemia (elevação de CT, colesterol na lipoproteína de densidade baixa, LDLc e TG) (Pelaes, 2021).

Ácidos graxos (AGL) e lipotoxicidade na doença renal diabética (DRD)

Os AGL são transportados na circulação em associação à albumina e às lipoproteínas. A albumina é a principal proteína sérica que transporta AGL e sua estrutura, rica em domínios hidrofóbicos, garante grande plasticidade no transporte destes lípidos, mesmo quando as concentrações plasmáticas destes

estão muito elevadas, como na descompensação diabética. Nas células, os receptores CD-36 (*cluster of differentiation 36*) atuam como translocases de AGL, favorecendo sua internalização. Além disso, diversas proteínas transportadoras de AGL, como os transportadores de ácidos graxos (FAT; *fatty acid transportes*) apresentam alto grau de seletividade na captação destes lípidos (Anderson; Stahl, 2013).

Na DRD, bem como em outros modelos de injúria glomerular, a albumina ligada aos AGL é filtrada, com elevada exposição às células do túbulo proximal. Nelas, a disponibilização de AGL ocorre após sua dissociação da molécula de albumina ou pela endocitose da albumina ou lipoproteínas.

As células renais apresentam diferentes sensibilidades ao acúmulo de lípidos frente a uma complexa rede regulatória que é estabelecida, determinada pelo tipo de ácido graxo e expressão seletiva de seus transportadores (Wang et al., 2023). Cerca de 70% a 80% dos AGL circulantes compreendem espécies saturadas (palmítico e esteárico) e monoinsaturado (oleico), os quais exercem ações distintas em vias de sinalização intracelular (Makinem et al. 2013). Na DRD prevalecem os AGL saturados de cadeia longa, os quais apresentam menor capacidade de esterificação com o glicerol para a formação de TG, o que favorece suas ações deletérias intracelulares. O acúmulo intracelular de derivados metabólicos dos AGL, como ceramidas, acilcarnitinas, acilCoA e diacilglicerol, vincula-se ao estabelecimento de estresse de retículo endoplasmático, vias inflamatórias e oxidativas que favorecem lipotoxicidade e morte celular por lipoapoptose (Listenberger, L. L 2003; Kang et al. 2015). Estes metabólitos também induzem a ativação de proteínas cinases específicas que fosforilam o receptor de insulina e o substrato do receptor de insulina em resíduos de serina, em detrimento aos de tirosina. Isto compromete a cascata de sinalização da insulina, deflagrando e/ou perpetuando a resistência insulínica e dislipidemia na DRD.

O modelo de lipotoxicidade tubular baseia-se no fluxo de AGL ao longo do podócito lesado e membrana basal glomerular, com captação posterior desses lípidos por transportadores nas membranas apicais dos túbulos proximais. As células tubulares proximais utilizam os AGL como fonte primária de energia e apresentam elevada densidade mitocondrial. Entretanto, na DRD há aumento da demanda de AGL aliada ao prejuízo na função mitocondrial o que compromete

a beta oxidação e promove acúmulo de derivados que levam à lipotoxicidade (Kang et al. 2015; Herman-Edelstein et al. 2014; Proctor et al., 2006). Modelos de animais geneticamente modificados com indução ou restrição de beta oxidação e o tratamento com drogas que potencializam a oxidação mitocondrial de AGL demonstram o papel da metabolização de lípidos como crucial à evolução da injúria renal na DRD (Noels et al., 2021)

Em podócitos, os AGL saturados deflagram lipotoxicidade e morte celular. O mesmo é observado em celulares tubulares renais, com evidência de aumento da produção mitocondrial de ROS e resposta inflamatória, vinculada à geração de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios e à apoptose (Sieber et al., 2010; Lennon et al., 2009).

Na DRD, o acúmulo de AGL favoreceu o desenvolvimento de glomeruloesclerose, paralelamente ao aumento da expressão de genes que codificam para receptores envolvidos na captação de lipoproteína, como receptor de LDL nativa (receptor B-E) e modificada (receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada (*lectin-type oxidized LDL receptor* ou LOX-1), e redução daqueles envolvidos na exportação do excesso de colesterol (proteínas cassete de ligação ao ATP A1, ABCA-1 e G1, ABCG1) e oxidação mitocondrial de AGL (Ueno.T et al., 2003). Há também alteração na ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróis (SREBP) que promove a transcrição de genes envolvidos na captação de colesterol e síntese *de novo* de colesterol e AGL (Sun et al.,2002; Wang et al., 2005).

Cerca de 50% da captação dos AGL no túbulo proximal é mediada pela proteína transportadora de AGL 2 (FATP2) de alta afinidade e baixa capacidade. Em condições de injúria glomerular e elevada taxa de filtração de albumina complexada com AGL, esse transportador assume relevância nos processos de apoptose do epitélio tubular e atrofia (Khan et al, 2018). De fato, animais com nocaute do gene que codifica para a FATP2 apresentaram-se protegidos contra atrofia renal, prejuízo na TFGe e evolução da DRD o que, em parte, também foi devido à melhora da glicemia (Khan et al., 2020.). Inibidores de FATP2 previnem o acúmulo lipídico no epitélio tubular (Chen et al., 2020). O bloqueio do FATP2 cursa com captação residual de AGL, graças à ação de outras FATP (como FATP3 e 4) e da molécula 1 de injúria renal (KIM-1) que também atua como

receptor *scavenger* de lipoproteínas modificadas e se associa à lipoapoptose de células tubulares renais (Ichimura et al., 2008).

As FATP e as proteínas de ligação a AGL (FABP) são proteínas envolvidas no metabolismo de AGL e, portanto, desempenham papéis importantes na manutenção da homeostase lipídica. Embora ambas estejam envolvidas no transporte de AGL, elas têm funções diferentes. As FATP são proteínas transmembrânicas que transportam AGL através da membrana plasmática. Elas estão envolvidas na captação e absorção de AGL na célula e são encontradas em diversos tecidos do corpo, como no fígado, músculos e adipócitos. As FATP têm um papel importante no metabolismo de AGL e são reguladas por hormônios como a insulina e a leptina. Por outro lado, as FABP são proteínas solúveis no citosol que se ligam a AGL, auxiliando em seu direcionamento ao destino final dentro da célula. Elas estão envolvidas no transporte e armazenamento de AGL, e ajudam na regulação do seu metabolismo dentro da célula. As FABP são expressas em diversos tecidos, incluindo fígado, músculos e tecido adiposo. Embora as FATP e FABP tenham funções diferentes, elas compartilham algumas semelhanças em relação ao transporte de AGL. Além disso, ambas têm sido associadas a doenças metabólicas, como a obesidade e a resistência à insulina (Glatz et al., 2010). A concentração sérica de FABP1 e FABP2 é maior em indivíduos diabéticos com nefropatia, em comparação aqueles sem doença renal e se associa com marcadores subclínicos de aterosclerose (Abo El-Asrar et al., 2023).

A hiperglicemia aumenta a expressão do receptor CD-36 (*cluster of differentiation 36*), via ativação da proteína cinase B ou AKT e receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e, conseqüentemente, o maior aporte de AGL às células renais (Wang et al., 2023). Esses eventos favorecem a deposição lipídica tubular e lesão tubulointersticial (Herman-Edelstein et al. 2014). A análise por microárea do tecido renal de humanos com DRD evidenciou elevada expressão de CD-36 no túbulo proximal, mediando a apoptose induzida por palmitato (Susztak et al., 2005). De outro lado, em camundongos com DRD, a expressão tubular de CD36 foi menor (Wilson, et al., 2019) e, em animais transgênicos com superexpressão de CD-36 não se observou fibrose intersticial (Kang et al., 2015). Sendo assim, a contribuição do CD36 para a atrofia tubular

em modelos de DRD é, ainda, incerta e pode estar relacionada à compartimentalização diferencial de gotículas lipídicas no meio intracelular.

Interessante comentar que a dislipidemia que favorece a DRC também é instalada e/ou exacerbada de acordo com o declínio da função renal. A dislipidemia, de fato, é agravada pela perda urinária de proteínas e por modificações das proteínas por glicação e carbamoilação (Sun et al., 2017). O perfil lipídico estabelecido, conforme comentado anteriormente, cursa com elevação de TG, e também com partículas de LDL de menor tamanho e redução do conteúdo de colesterol nas lipoproteínas de densidade alta (HDL-colesterol). A redução de HDLc no plasma é atribuída à menor geração de partículas nascentes de HDL-c, em decorrência do prejuízo da metabolização de lipoproteínas ricas em TG, e à maior degradação de HDL, pelo complexo cubilina/megalina nos rins. A expressão tubular de cubilina e megalina varia em diversas nefropatias que cursam com diferentes estádios de excreção urinária de albumina (Sun et al., 2017).

A albumina, à semelhança da HDL, é removida pelo complexo cubilina/megalina nos túbulos renais, podendo contribuir para efeitos tóxicos, embora este seja um aspecto pouco explorado (Baines *et al.*, 2019; Nielsen *et al.*, 2016). O papel da albumina modificada por glicação ou por carbamoilação tem sido evidenciado em células intimamente relacionadas à homeostase lipídica no organismo, embora sua contribuição como fonte de AGL não esteja, ainda, caracterizada.

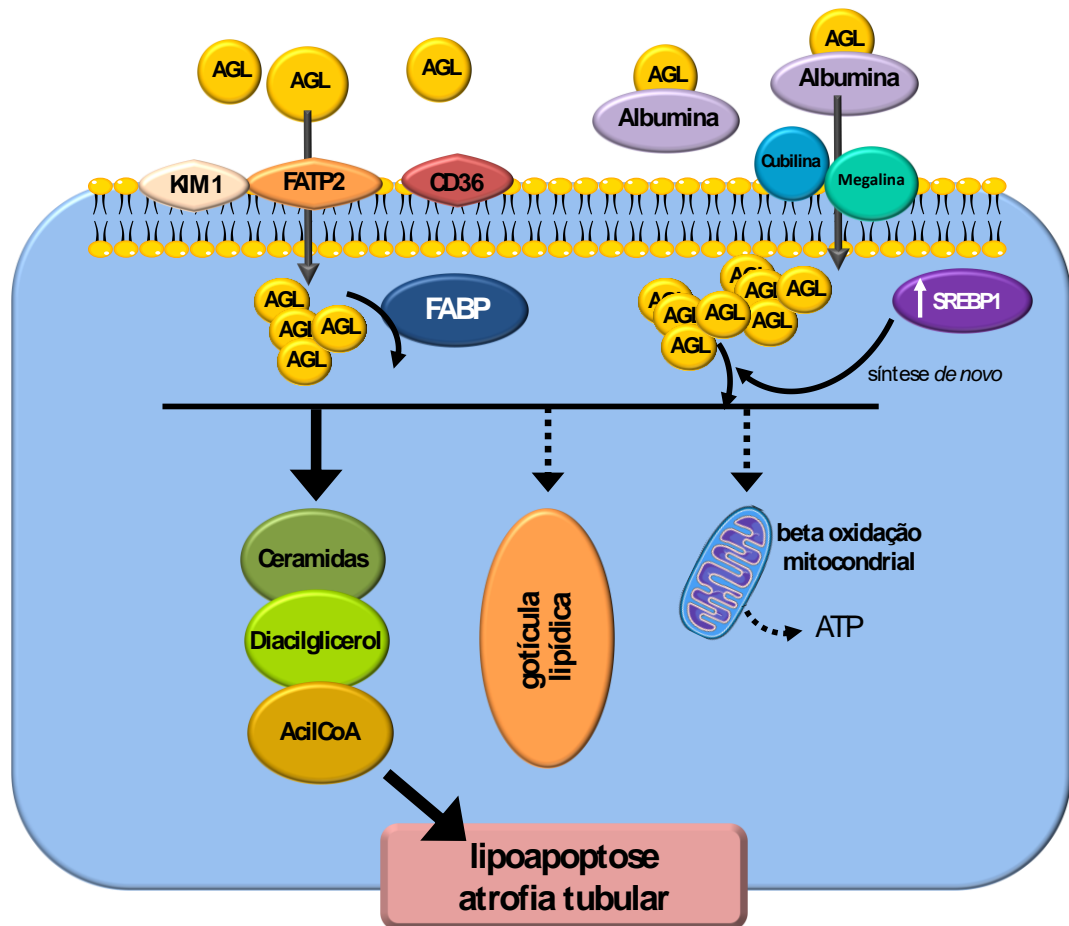


Figura 1. Lipotoxicidade no túbulo proximal. A lipotoxicidade em células do túbulo proximal ocorre devido ao maior aporte de AGL advindos da circulação e seu acúmulo intracelular. Os AGL complexados à albumina atravessam a barreira glomerular, sendo captados pelo epitélio tubular proximal, após dissociação da albumina, por meio dos transportadores de AGL (FATP2, KIM-1, e CD-36, principalmente). Intracelularmente os AGL são direcionados pelas FABP. O complexo albumina-AGL pode ser captado pelo pelos receptores cubilina/megalina. A sobrecarga celular de AGL induz a formação de derivados metabólicos, como ceramidas, diacilglicerol e acilCoA, os quais medeiam a lipotoxicidade, com morte celular e atrofia tubular. Isto é em grande parte determinado pela redução da re-esterificação de AGL e o depósito de TG na gotícula lipídica. Além disso, há diminuição da beta oxidação mitocondrial, aliada à maior síntese de lípidos, por maior ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a esterol (SREBP).

Em um estudo conduzido por (Cobbs et al., 2018), evidenciou-se que a sobrecarga de ácido palmítico, em animais com DM, aumentou a expressão e clivagem da citocina pró-inflamatória. O estudo também demonstrou que a exposição direta aos AGL em células renais NRK-52E estimulou a expressão e clivagem da osteopontina, o que pode contribuir para a inflamação intersticial e

agravamento da lesão tubular na doença renal proteinúrica. (Chem e cols 2018), observaram deposição de lípidos e apoptose em células renais tubulares HK-2, mediante tratamento com ácido palmítico (200 $\mu\text{mol/L}$ por 24h).

De outro lado, evidenciou-se uma ação benéfica dos de AGL de cadeia curta, administrados oralmente à camundongos com DM, refletida pela melhora da autofagia e redução da fibrose renal. Esses eventos foram vinculados à inibição de histonas desacetilases e à regulação positiva da enzima ULK1, associada à autofagia (Ma X, Wang, 2022).

Produtos de glicação avançada (AGE) e doença renal diabética

Os AGE são formados em grande quantidade na presença de hiperglicemia; embora tenham sua geração intensificada frente ao prejuízo da função renal, por si. A glicose e outros açúcares redutores interagem com resíduos de lisina e arginina das proteínas e com a porção amino terminal de alguns fosfolípidos e ácidos nucleicos. A reação inicial é lenta, com a formação de uma base de Schiff. Gradualmente, ela progride para um produto Amadori mais estável e, posteriormente para reação irreversível que culmina na geração dos AGE. Intermediários dos AGE são gerados, em sua maioria, por vias oxidativas, o que incrementa a reação na doença renal frente à redução de defesas antioxidantes. Além disso, na DRC há prejuízo na depuração de intermediários da reação de glicação, o que acarreta maior formação de AGE, independentemente da hiperglicemia (Singh et al., 2014; Barbosa et al., 2008, Santana MFM et, al. 2020)

Os AGE alteram proteínas da matriz extracelular, comprometendo sua estrutura e função. Em particular, isso se vincula ao espessamento de membranas glomerulares, alteração na membrana podocitária e aumento de citocinas inflamatórias relacionadas à fibrose renal (Thieme et al., 2016; Brennan et al., 2021). Intracelularmente, os AGE são formados pelo maior fluxo de glicose na via glicolítica, o que acarreta maior fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial e escape de ROS. Em consequência, há aumento da atividade da poli ADP ribose polimerase (PARP), enzima que auxilia no reparo à quebra de fita simples da molécula do DNA. De outro lado, a PARP modifica, por ribosilação, a gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase, comprometendo o fluxo ao longo da via glicolítica e favorecendo o desvio de substratos que geram

metilglioxal. Este oxoaldeído é cerca de 300 vezes mais reativo que a glicose, promovendo a rápida geração intracelular de AGE (Vlassara et al. 2014; Ahmed et al., 2002). Os AGEs exacerbam o insulto oxidativo, criando um ciclo vicioso que perpetua o estresse glicoxidativo e as complicações resultantes. Glicação avançada e estresse oxidativo promovem modificações epigenéticas que alteram a expressão de genes e se associam à fisiopatologia da DRD (Vistoli et al., 2013).

Os AGE são reconhecidos por diversos receptores celulares, dos quais se destaca o receptor para produto de glicação avançada, codificado pelo gene *AGER* (RAGE). Ele é expresso em diferentes tipos celulares, mas particularmente em células mesangiais e podócitos. A interação AGE-RAGE promove a ativação da NADPH oxidase, com geração de ROS e ativação do fator nuclear KB (NFKB) que promove a transativação de genes inflamatórios e do próprio *AGER*. A ativação do RAGE também promove a expressão de componentes do sistema renina angiotensina aldosterona, que aumentam o insulto oxidativo e o dano renal (Wu et al., 2023). Há uma convergência entre a sinalização do RAGE e do receptor toll like 4 (TLR-4) que apresenta o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) como principal ligante. Ela é mediada pela ativação de TIRAP/MyD88 que promovem a ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e NFKB. Estas vias também favorecem a morte celular por apoptose, graças à ativação do fator ativador de transcrição 4 (ATF4) e fator ativador de transcrição 6 (ATF6) (Figura 2). Produtos de glicação avançada sensibilizam macrófagos à estimulação inflamatória por meio do eixo LPS/TLR-4 (Okuda et al., 2012; Minanni et al., 2021), embora em algumas linhagens e modelos celulares especula-se que possa induzir tolerância ao LPS. A contribuição exata dos eventos de sensibilização e tolerância ao LPS induzidas pelos AGE ainda não estão completamente elucidadas, mas podem assumir importância na modulação da inflamação que norteia a injúria renal.

Em células renais, também é descrita a expressão do receptor *AGER1* que se contrapõe à sinalização deletéria do RAGE, por favorecer a expressão de genes que codificam para proteínas antioxidantes. Assim, embora não haja comprovação em modelos animais ou em humanos, é provável que o balanço entre a expressão de RAGE e *AGER1* contribua para o desfecho na sinalização

dos AGE e as vias que modulam a glicotoxicidade e evolução da DRD (Feng et al. 2020; Eleftheriadis et al., 2020).

Os AGE ainda prejudicam a sinalização insulínica no DM2, agravando os distúrbios na homeostase glicêmica (Pinto-Junior, D.C. et al 2018; Da Silva et al.,2017) e afetam adversamente o metabolismo de lípidos e lipoproteínas nos compartimentos plasmático e tecidual (Wu et al., 2023). Sendo assim, participam do desenvolvimento da DRD pela modulação de vários contribuintes de injúria renal.

A albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE), administrada cronicamente a ratos saudáveis, aumentou a razão proteína/creatinina, a área glomerular, o infiltrado macrofágico, o conteúdo de AGE e a expressão de genes oxidativos, inflamatórios e apoptóticos no rim (Thieme et al., 2016). Além disso, a albumina-AGE, alterou o perfil de metilação de histonas e a expressão do microRNA-29a, o que, potencialmente, deve favorecer a injúria glomerular e disfunção de podócitos (Thieme et al. 2021).

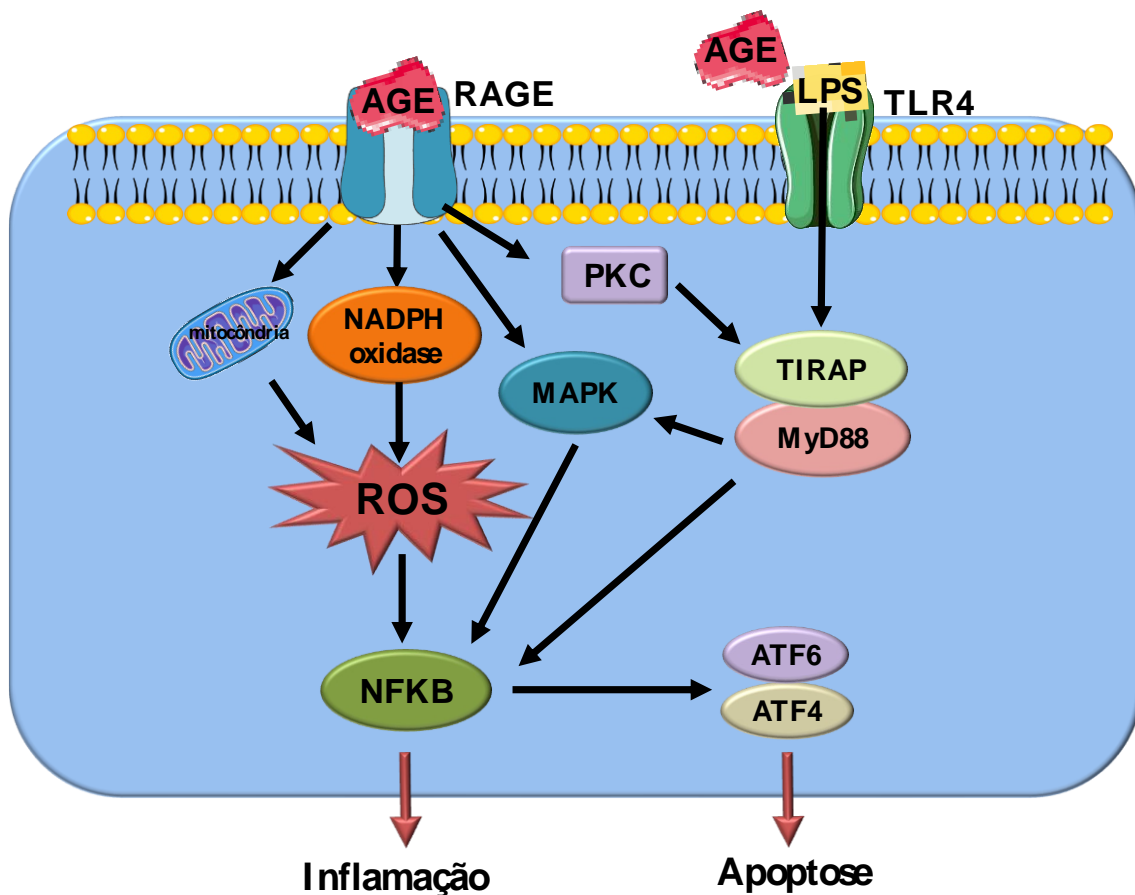


Figura 2. Eixo AGE-RAGE-TLR4 na indução de inflamação. Os AGE interagem com o RAGE promovendo a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo sistema NADPH oxidase e mitocondrial. Juntamente com a ativação da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), as ROS ativam o fator nuclear KB (NF-KB) que promove a transativação de genes relacionados à resposta inflamatória. Além disso, os AGE interagem com o receptor *toll like 4* (TLR4) que apresenta via de sinalização inflamatória convergente ao RAGE, via TIRAP/MyD88 (proteína adaptadora contendo domínio do receptor toll-Interleucina 1/fator de diferenciação mieloide 88) e proteína cinase C (PKC). O NFKB também promove a transativação de genes que codificam para os fatores ATF6 (fator ativador de transcrição 6) e ATF4 (fator ativador de transcrição 4) relacionados à morte celular por apoptose. (Volpe, et al 2018; Kay et al 2016)

JUSTIFICATIVA e HIPÓTESE

A dislipidemia é um fator contribuinte para a perda da função renal e progressão da DRD. Particularmente, os TG apresentam associação com o declínio da função renal (Muntner et al., 2000; Tong L, Adler SG. 2017) o que é observado para incrementos da trigliceridemia dentro da faixa de normalidade. Além disso, a concentração plasmática de TG é apontada como preditora ao desenvolvimento de proteinúria, independentemente do colesterol total e LDLc (Tozawa et al., 2002). A lipotoxicidade renal, induzida pelo acúmulo de AGL, principalmente saturados de cadeia longa, é apontada como um dos mecanismos chave para a lipoapoptose associada à injúria renal no DM (Khan S et al, 2014, Cobbs et al 2019). A albumina é a principal transportadora de AGL e disponibiliza estes lípidos às células o que, quando em excesso, vincula-se à doença tubulointersticial. Neste cenário, observa-se que derivados de AGL, como ceramidas, diacilglicerol e acilCoA, se associam à atrofia tubular, fibrose intersticial e progressão da DRD. Isto ocorre, em grande parte, devido à indução de estresse de retículo endoplasmático e aumento do estresse inflamatório e oxidativo. Produtos de glicação avançada encontram-se elevados no DM e DRC e induzem estresse oxidativo e inflamatório por meio da ativação do sistema RAGE-TLR-4. No DM, os AGE contribuem para a lesão glomerular com aumento da carga filtrada de albumina-AGE ao compartimento tubular.

A exata compreensão dos AGL e AGE para fisiopatologia da DRD em humanos é limitada pela impossibilidade de obtenção rotineira de amostras a partir de biópsias renais. Desta forma, a utilização de linhagens de células tubulares renais representa uma importante ferramenta para compreensão do papel de metabólitos prevalentes no DM que contribuem para a injúria celular.

Nossa hipótese é de que os AGL - palmítico e oleico - e os AGE possam atuar sinergicamente, sensibilizando células tubulares proximais ao insulto inflamatório basal e promovido por LPS. Ela se baseia na premissa de que o tráfego tubular de albumina enriquecida em AGL possa favorecer o aporte destes lípidos às células tubulares, que conjuntamente à maior geração de AGE, deflagre vias inflamatórias, com aumento da produção de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 beta (IL-1beta), que contribuam para a gênese e evolução da DRD.

OBJETIVO

Avaliar em linhagem de células tubulares proximais humanas (HK-2) o efeito do tratamento com albumina controle ou modificada por glicação avançada (albumina-AGE), complexadas com concentrações crescentes de ácido palmítico e oleico, sobre a viabilidade celular e sensibilização à inflamação na ausência ou presença de insulto com LPS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo de albumina modificada por glicação avançada

Albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE) foi preparada mediante incubação de 40 mg de albumina bovina isenta em AGL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) com solução recém preparada de glicaldeído 10 mM (GAD; Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha) dissolvido em tampão fosfato (PBS; NaCl 137 mmol/L; Na₂HPO₄ 4 mmol/L; KCl 2 mmol/L; K₂PO₄ 1 mmol/L; pH 7,4) contendo ácido etileno diaminotetracético EDTA (pH 7,4). A albumina controle foi preparada apenas na presença de PBS com EDTA. Todas as incubações foram realizadas em condições estéreis, atmosfera de nitrogênio, banho de água a 37°C, com agitação, durante 4 dias, no escuro. Em seguida, as amostras foram dialisadas contra PBS com EDTA e esterilizadas em filtro de 0,22 µm. A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

Complexação de albumina com ácidos graxos

Ácido graxo palmítico (C16:0; P0500/Sigma-Aldrich Steinheim, Alemanha) e oleico (C18:1; O1383 -/ Sigma-Aldrich Steinheim, Alemanha), diluídos em etanol, foram complexados a 1 g de albumina controle ou albumina modificada por glicação (AGE) nas concentrações de 0,1mM, 0,25mM e 0,5mM. O preparo foi realizado em meio de cultura contendo baixa concentração de glicose (DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium/Gibco, Estados Unidos), com rápida agitação em vórtex e incubação em banho maria à 37°C por 1h.

Cultura de células tubulares proximais (HK-2)

Células do epitélio renal embrionário humano (HK-2; ATCC, CRL-2190) foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Niels Olsen Câmara do Laboratório de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo. Constituem uma linhagem de células tubulares proximais derivadas de rim normal, imortalizadas por transdução com genes E6/E7 do vírus do papiloma humano 16 (HPV-16), com crescimento dependente do fator de crescimento epidérmico. As células HK-2 retêm fenótipo positivo para fosfatase alcalina, gama glutamiltranspeptidase, leucina aminopeptidase, fosfatase ácida, citoqueratina, integrina alfa 3- beta 1 e fibronectina, e negativo para antígeno relacionado ao fator VIII, antígeno 6.19 e

endopeptidase CALLA). Além disso apresentam características funcionais, entre elas o transporte de glicose dependente de Na⁺/sensível à florizina, indicativas de células tubulares proximais bem diferenciadas (Ryan et al, 1994).

O cultivo celular foi realizado em garrafas 75cm² com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Estados Unidos). O cultivo foi realizado a 37° C em atmosfera umidificada e controlada à 5% de CO₂, sendo o meio trocado em dias alternados. Após atingir confluência, as células foram descoladas com tripsina 0,25% (Gibco) e a contagem realizada com trypan blue. Para os experimentos, 3x 10⁶ células foram cultivadas em placas de 24 wells com tratamento com albumina não glicada (controle) ou albumina modificada por glicação avançada (albumina-AGE) complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico ou oleico, durante 48h (Figura 3). Em algumas condições, após o tratamento com albumina controle ou AGE, as células foram lavadas e incubadas, por 24h, com LPS (1µg/mL) (Figura 4). O meio de cultura foi recolhido e congelado a -80°C para posterior determinação de citocinas. A concentração de proteína celular foi determinada pelo método de Lowry et al, (1951), após lavagem dos poços das placas com PBS e incubação com NaOH 0,2 N por 2 h.

Viabilidade celular – determinação de lactato desidrogenase

O meio de cultura celular foi removido após os diferentes tratamentos para avaliar a liberação de lactato desidrogenase (LDH), que indica a citotoxicidade. Este teste foi realizado usando o kit CyQUANTTM LDH Cytotoxicity Assay da (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Resumidamente, o ensaio avalia a atividade da enzima LDH liberado ao meio de cultura, como um indicador de citotoxicidade. Danos à membrana celular liberam LDH citosólica para o meio de cultura, que é avaliado por meio de uma reação enzimática em que a LDH catalisa a conversão de lactato em piruvato, reduzindo NAD⁺ em NADH. A oxidação resultante do NADH pela diaforase leva à redução do sal tetrazólico para um produto de formazan, que pode ser medido por espectrofotometria. A quantidade de formazan gerado é proporcional à quantidade de LDH liberada no meio de cultura.

Determinação da concentração de IL-1beta e IL-6

A concentração de IL-6 e IL-1 beta no meio de cultura foi determinada por ELISA (kit Duo Set ELISA Development System, R&D System, Human, Minnesota, Estados Unidos; IL-6 e IL-1 beta Duo Set – R&D Systems, Minnesota, Estados Unidos). Anticorpos de captura das citocinas de interesse (IL-6 e IL-1 beta) foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e, em seguida, 100 µL dessa solução foram adicionados a cada poço da placa. Após 12 h de incubação, a placa foi lavada com tampão de lavagem para remover o excesso de anticorpos. Posteriormente, a placa foi bloqueada com tampão específico pelo kit, por 1 h. Após uma nova lavagem com tampão, foram adicionados 100 µl das amostras previamente diluídas nos poços, com incubação por 2 h, para permitir a ligação da citocina presente nas amostras com o anticorpo de captura. O excesso de amostra foi removido por lavagens adicionais, e então foi introduzido o anticorpo de detecção. Após 2 h de incubação, a peroxidase e seu substrato, estreptavidina, foram adicionados aos poços, com incubação na ausência de luz, por 20 min. A reação foi encerrada com a adição de ácido sulfúrico (H₂SO₄), e a densidade óptica de cada poço medida por espectrofotômetro (545 nm). A concentração de IL-6 e IL-1 beta foi corrigida por miligrama de proteína celular.

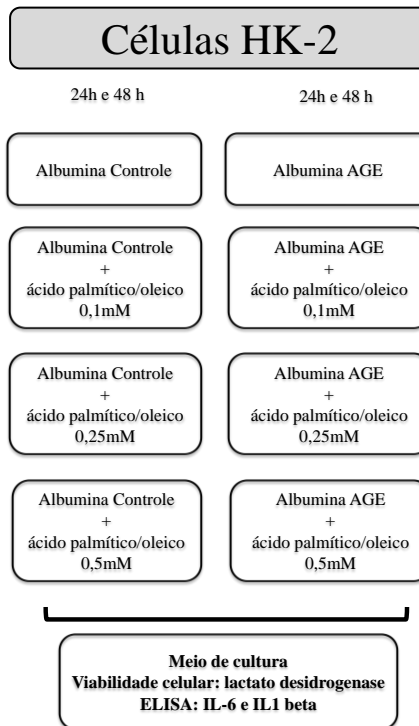


Figura 3 – Protocolo experimental. Tratamento das células HK-2 com albumina controle ou albumina-AGE complexadas a concentrações crescentes de ácido palmítico ou oleico (48h) para determinação da viabilidade celular e produção de citocinas inflamatórias.

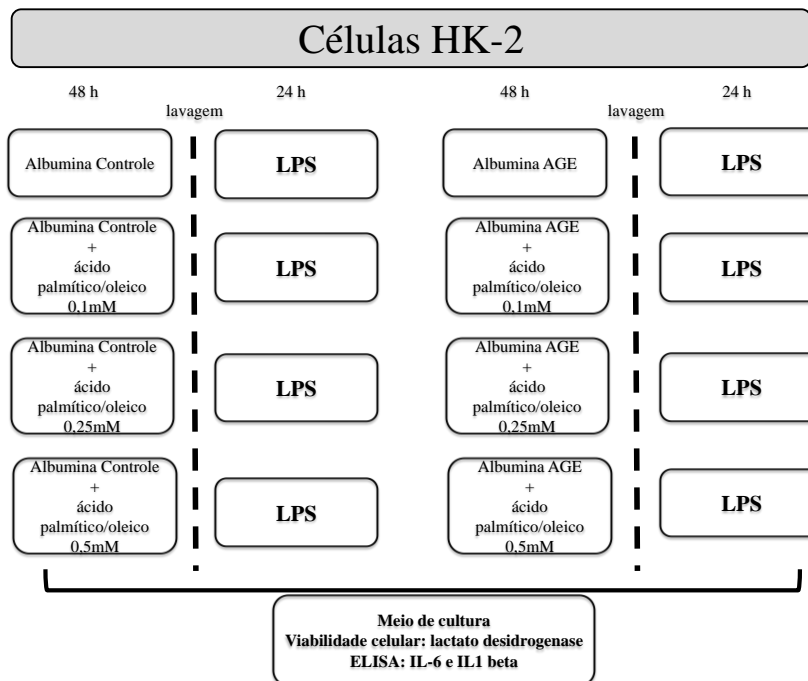


Figura 4 – Protocolo experimental. Tratamento das células HK-2 com albumina controle ou albumina-AGE complexadas a concentrações crescentes de ácido palmítico ou oleico (48h), seguido do desafio com LPS (24h) para determinação da viabilidade celular e produção de citocinas inflamatórias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Softwares, EUA). As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney. Foram consideradas significantes as situações nas quais o nível descritivo de significância foi menor a 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Albumina controle e albumina-AGE complexadas com ácidos graxos em diferentes concentrações (0,1mM, 0,25 mM e 0,5 mM) foram incubadas com células HK-2, as quais foram posteriormente desafiadas com LPS. Menor liberação de LDH foi observada nas incubações com albumina controle complexada ácido palmítico 0,5mM em comparação à incubação com ácido palmítico 0,1 mM, ambos seguidos de LPS. Nas demais condições não houve alteração na viabilidade celular (Figura 5).

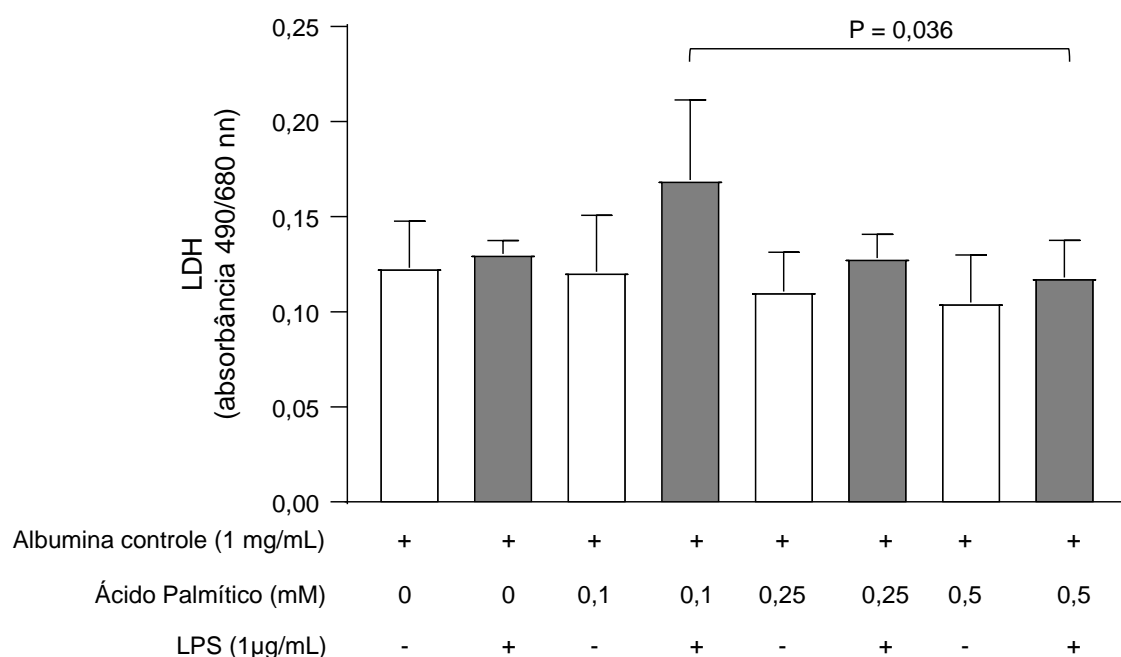


Figura 5 – Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina controle apenas ou complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle (1mg/mL) apenas ou complexada com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM 0,25 mM e 0,5 mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a viabilidade celular, inferida pela concentração de lactato desidrogenase (LDH). Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nas incubações com albumina-AGE complexada com ácido palmítico, observou-se maior liberação de LDH na concentração de 0,25 mM na ausência e presença de LPS em comparação à situação controle e albumina-AGE com 0,1 mM de ácido palmítico (Figura 6).

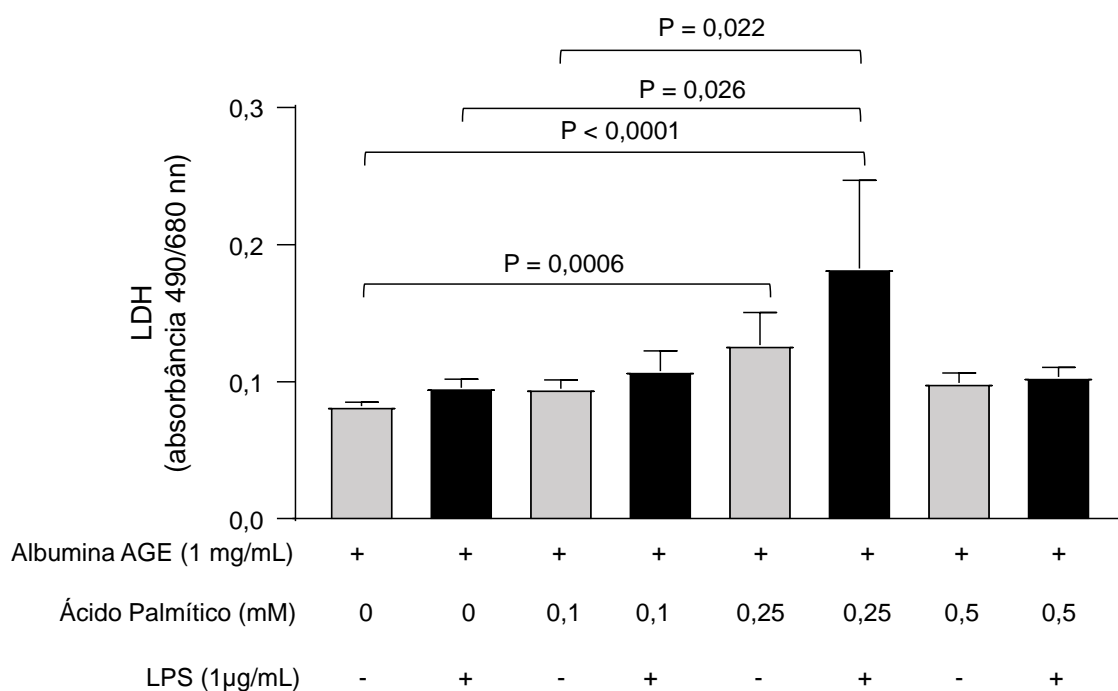


Figura 6 – Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina-AGE apenas ou complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina-AGE apenas (1mg/mL) ou complexada com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM, 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença de LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a viabilidade celular, inferida pela concentração de lactato desidrogenase (LDH). Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Não se observou efeito do ácido graxo palmítico, nas concentrações de 0,1mM e 0,25 mM, sobre a produção de IL-6, quando este foi complexado à albumina controle (Figura 7). Entretanto, a incubação com albumina controle complexada com ácido palmítico 0,5 mM reduziu a secreção de IL-6 em comparação à situação controle (ausência de ácidos graxos). O desafio com LPS induziu maior produção de IL-6 em todas as condições experimentais, conforme esperado por esta clássica estimulação inflamatória. Entretanto, este efeito não foi observado mediante incubação prévia com albumina controle complexada com ácido palmítico 0,5 M (Figura 7).

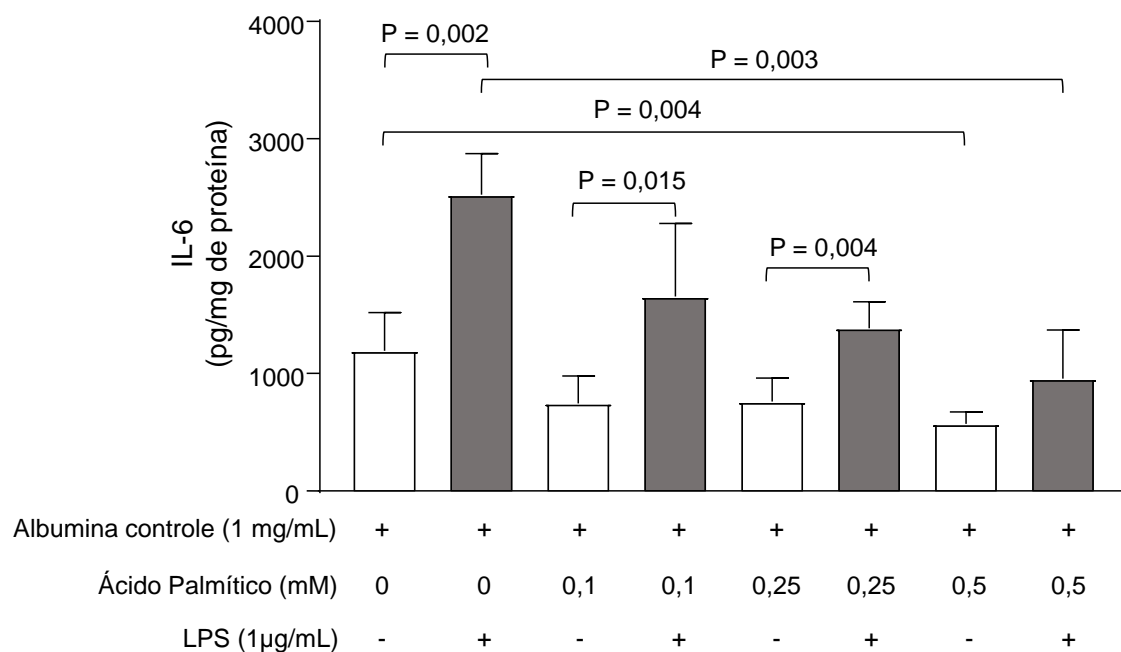


Figura 7 – Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle (1mg/mL) apenas ou complexada com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-6 determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

Na figura 8, observa-se que nas incubações realizadas com albumina-AGE complexada com ácido palmítico 0,25mM, seguido de LPS houve elevação da secreção de IL-6 em comparação à situação controle. Também houve maior liberação de IL-6 nas incubações com albumina-AGE com incubação com ácido palmítico 0,25mM na ausência de LPS em comparação à condição com ácido palmítico 0,1mM. O desafio com LPS elevou a produção de IL-6, com exceção das células incubadas previamente albumina-AGE complexada com ácido palmítico 0,5mM, onde a ação do LPS foi abolida.

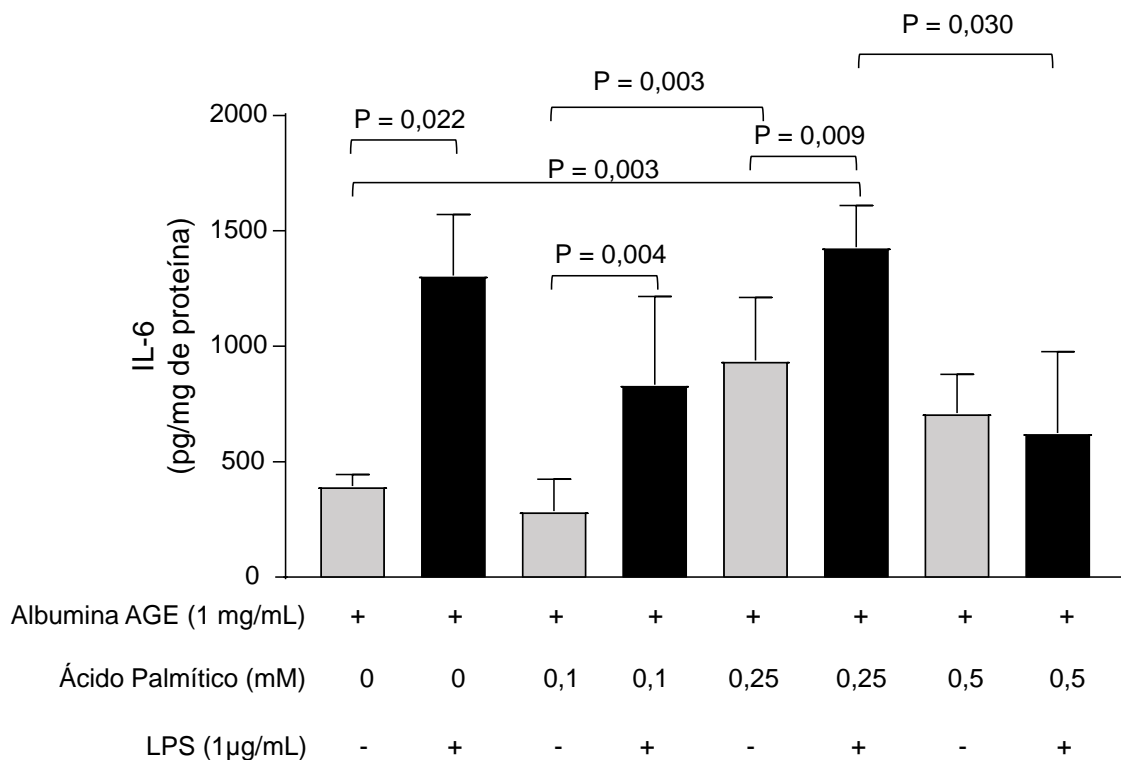


Figura 8 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina-AGE apenas (1mg/mL) ou complexada com concentrações crescentes de ácido palmítico (0mM, 0,1mM, 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença de LPS (1 µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-6 determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

Comparando-se albumina controle e albumina-AGE, observa-se na figura 9 que a albumina-AGE na ausência de ácidos graxos e complexada com 0,1mM de ácido palmítico reduziu a secreção de IL-6 em comparação à respectiva albumina controle. Além disso, a secreção de IL-6, após desafio com LPS, foi menor nas incubações com albumina-AGE isoladamente e complexada com ácido palmítico 0,1mM.

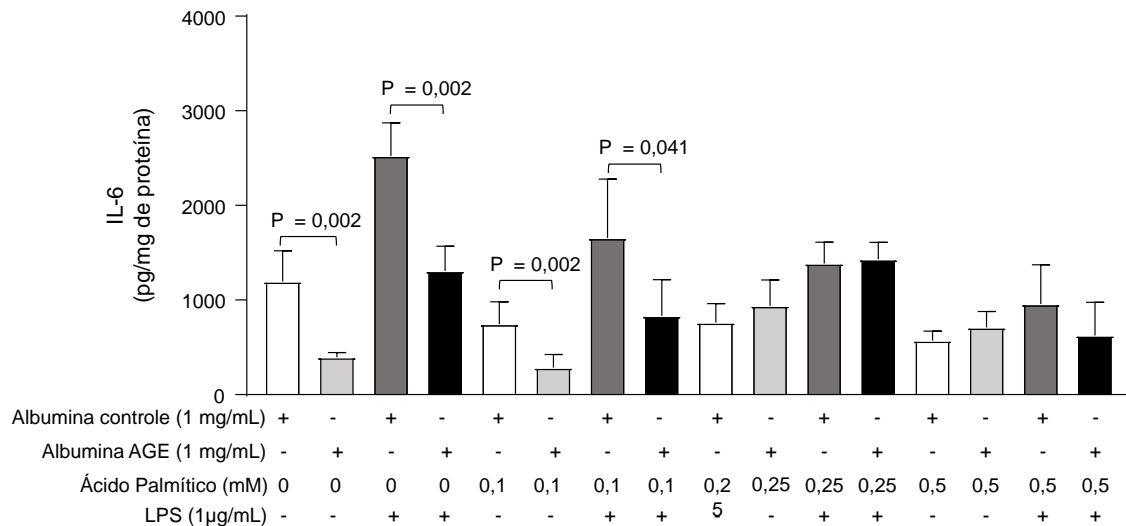


Figura 9 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle ou AGE (1mg/mL) apenas ou complexadas com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-6 determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações entre os tratamentos com albumina controle e AGE foram feitas pelo teste de Mann-Whitney.

A secreção de IL-1 beta foi maior nas incubações com albumina controle complexada com ácido palmítico 0,1mM e 0,5mM, sem LPS, em comparação à condição basal (ausência de ácido graxo) (Figura 10). Após estimulação com LPS a secreção de IL-1 beta aumentou em todas as incubações, tendo sido potencializada na presença de ácido palmítico 0,5mM em comparação à condição basal sem ácido graxo (Figura 11).

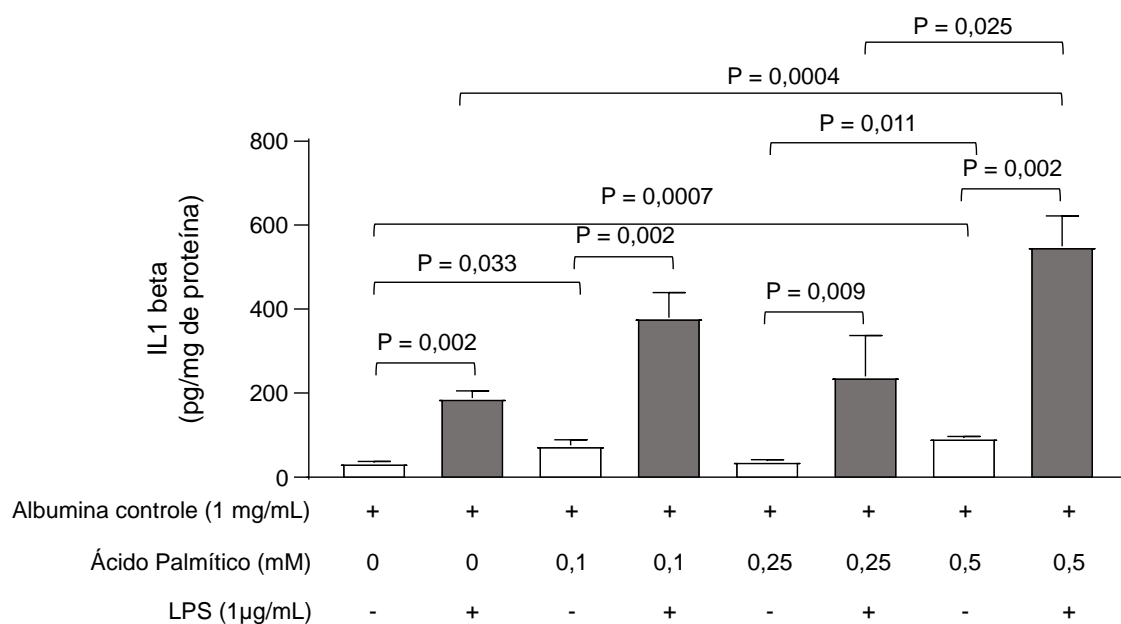


Figura 10 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle apenas (1mg/mL) ou complexada com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-1 beta determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

Na figura 11, observa-se que a albumina-AGE complexada com ácido palmítico 0,5mM aumentou a secreção de IL-1 beta em comparação à condição controle e 0,1mM. O insulto com LPS aumentou a produção de IL-1 beta em todas as condições experimentais. O efeito de potencialização da ação do LPS foi observado com ácido palmítico 0,25mM e 0,5 mM quando complexado à albumina-AGE, em comparação à condição controle. A incubação com ácido palmítico 0,5mM também resultou em maior liberação de IL-1 beta em comparação à concentração de 0,1mM.

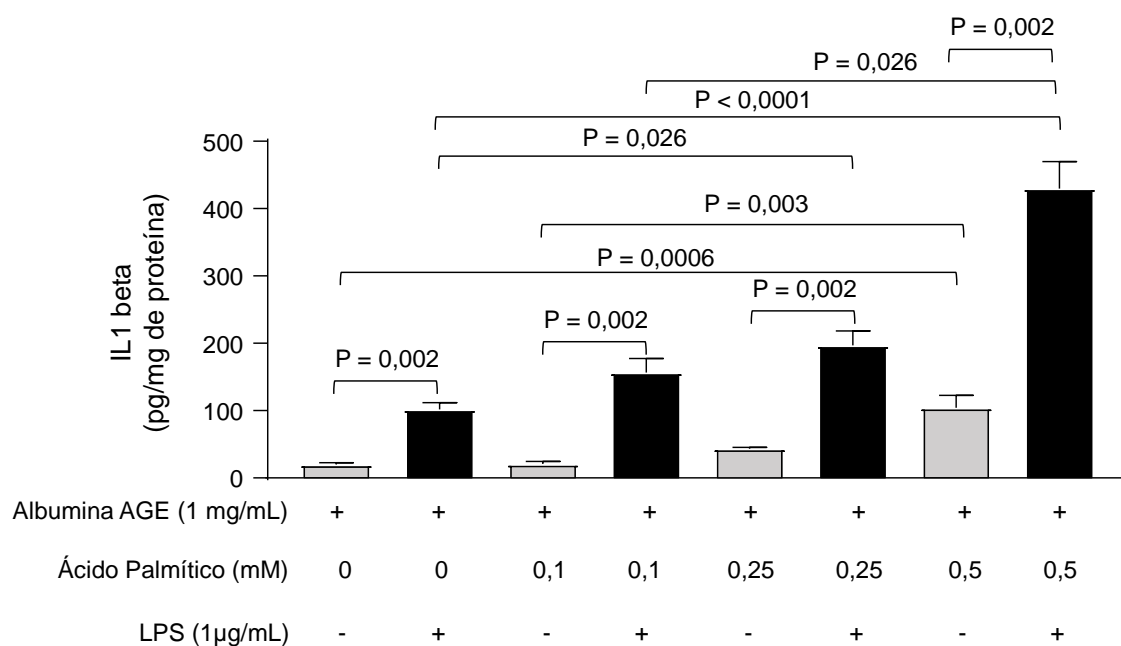


Figura 11 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina-AGE apenas (1mg/mL) ou complexada com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM, 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença de LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-1 beta determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

Novamente, comparando-se albumina controle e albumina-AGE, observa-se na figura 12 que a albumina-AGE, na ausência de ácidos graxos e complexada com 0,1mM de ácido palmítico, reduziu a secreção de IL-1 beta, à semelhança do que ocorreu com a IL-6. Além disso, a secreção de IL-6, após desafio com LPS, foi menor nas incubações com albumina-AGE isoladamente e complexada com ácido palmítico 0,1mM e 0,5mM.

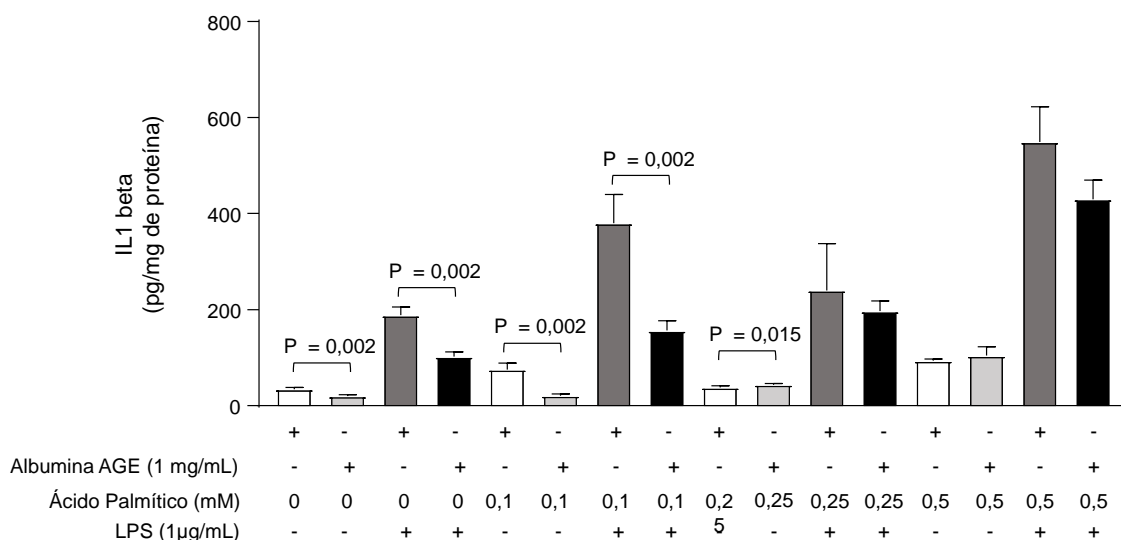


Figura 12 - Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com diferentes concentrações de ácido palmítico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle ou AGE apenas (1mg/mL) ou complexadas com concentrações crescentes de ácido palmítico (0,1mM 0,25mM e 0,5mM), por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-1 beta determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações entre os tratamentos com albumina controle e AGE foram feitas pelo teste de Mann-Whitney.

As incubações de albumina controle ou AGE complexadas com ácido oleico foram realizadas apenas na concentração de 0,1mM, devido ao desprendimento de células da placa quando foram utilizadas maiores concentrações deste ácido graxo. Na figura 13, observa-se que a albumina controle complexada com ácido oleico, seguida de LPS, reduziu a liberação de LDH em comparação ao tratamento com albumina controle sem este ácido graxo e albumina controle complexada com ácido oleico na ausência de LPS.

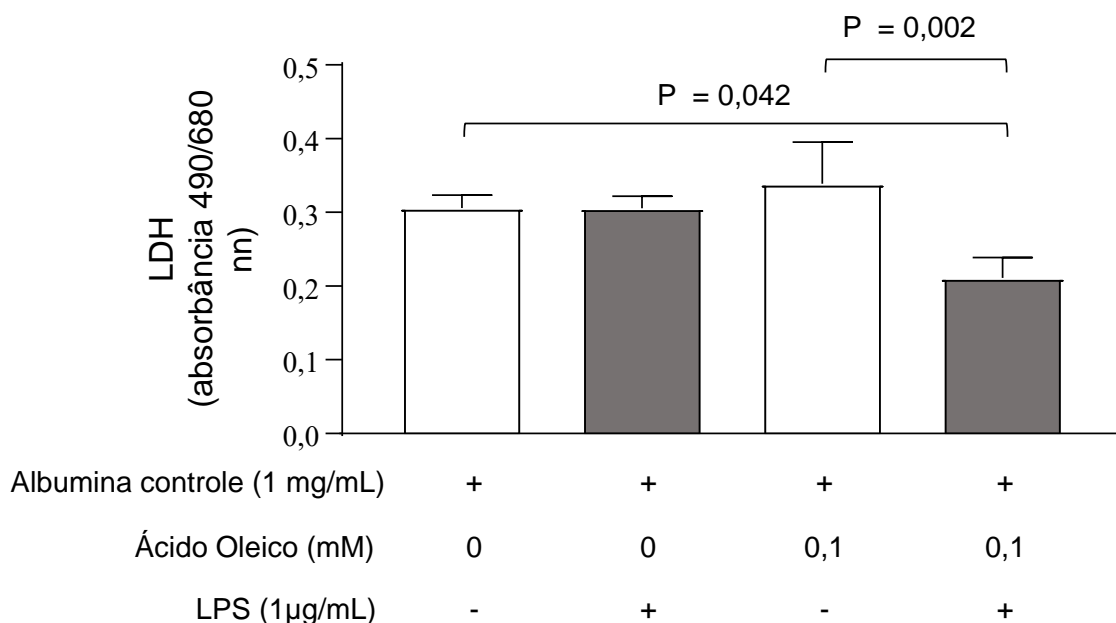


Figura 13 – Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina controle apenas ou complexada com ácido oleico 0,1mM, seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle apenas (1mg/mL) ou complexada 0,1mM de ácido oleico, 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a viabilidade celular, inferida pela concentração de lactato desidrogenase (LDH). Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nas incubações com albumina-AGE houve redução na liberação de LDH nas incubações com ácido oleico 0,1mM na ausência e presença de LPS, em comparação à condição basal (ausência de ácidos graxo). (Figura 14).

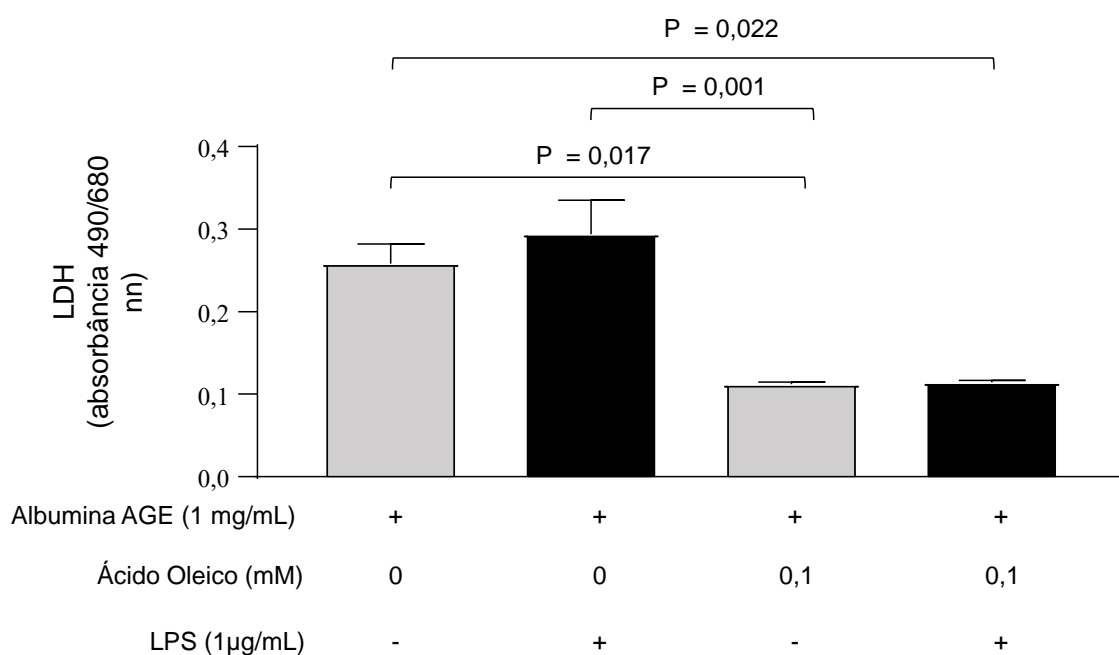


Figura 14 – Viabilidade das células HK-2 tratadas com albumina-AGE apenas ou complexada com ácido oleico 0,1mM, seguindo-se tratamento na ausência ou presença de LPS.

Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina-AGE apenas (1mg/mL) ou complexada 0,1mM de ácido oleico, 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a viabilidade celular, inferida pela concentração de lactato desidrogenase (LDH). Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskall-Wallis.

A secreção de IL-6 pelas células HK-2 foi maior após tratamento com albumina controle complexada com 0,1mM de ácido oleico, com ou sem exposição ao LPS, em comparação à condição basal (sem ácido graxo e sem LPS). O insulto com LPS resultou em maior secreção de IL-6 em nas incubações com albumina controle na ausência de ácido oleico (Figura 15).

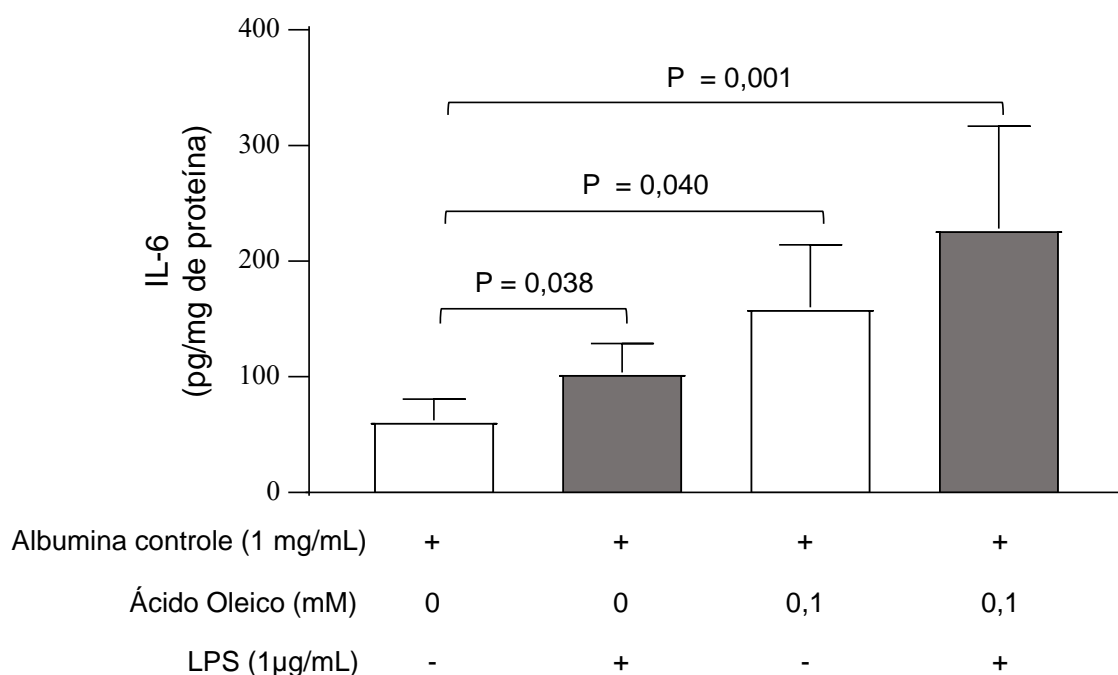


Figura 15 – Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS.

Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle (1mg/mL) apenas ou complexada com 0,1mM de ácido oleico, por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-6 determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskall-Wallis ou Mann-Whitney.

Na figura 16, observa-se o mesmo perfil de resposta, com maior secreção de IL-6 pelas células incubadas com albumina-AGE complexada com ácido

oleico 1mM e LPS em comparação à condição sem LPS. Além disso, a incubação com albumina controle complexada ao ácido oleico, seguida de exposição ao LPS, aumentou IL-6 em comparação à incubação sem ácido graxo e sem LPS.

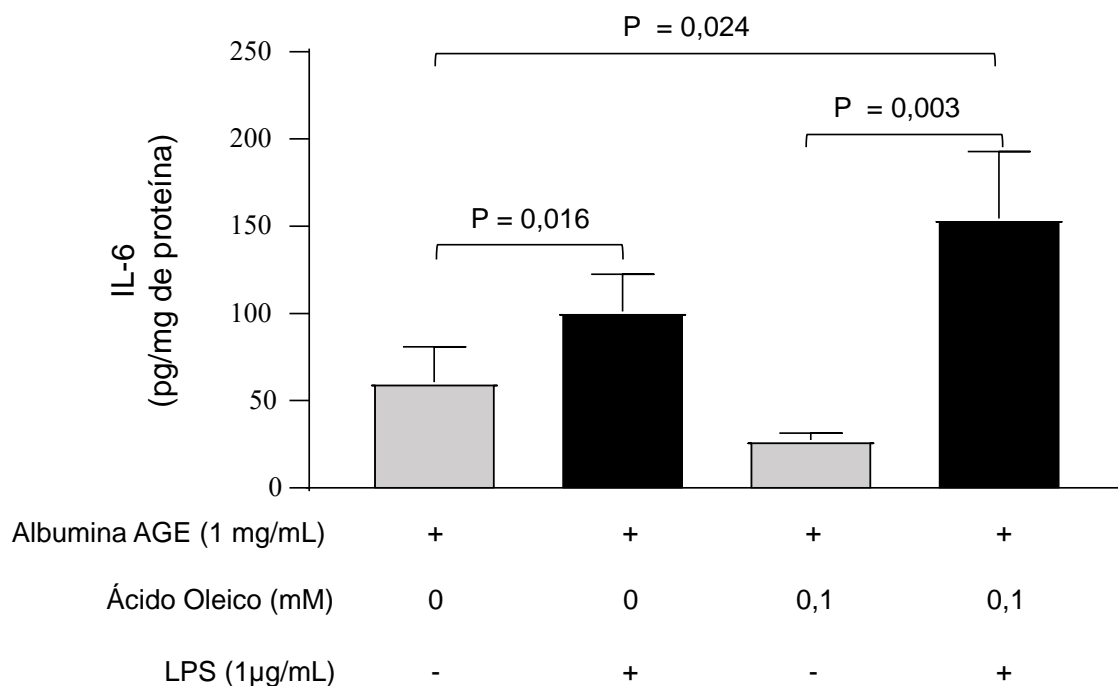


Figura 16 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina-AGE (1mg/mL) apenas ou complexada com 0,1mM de ácido oleico, por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-6 determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

Na figura 17, nota-se que a secreção de IL-6 foi menor após incubação com albumina-AGE complexada com ácido oleico na ausência de LPS em comparação à albumina controle.

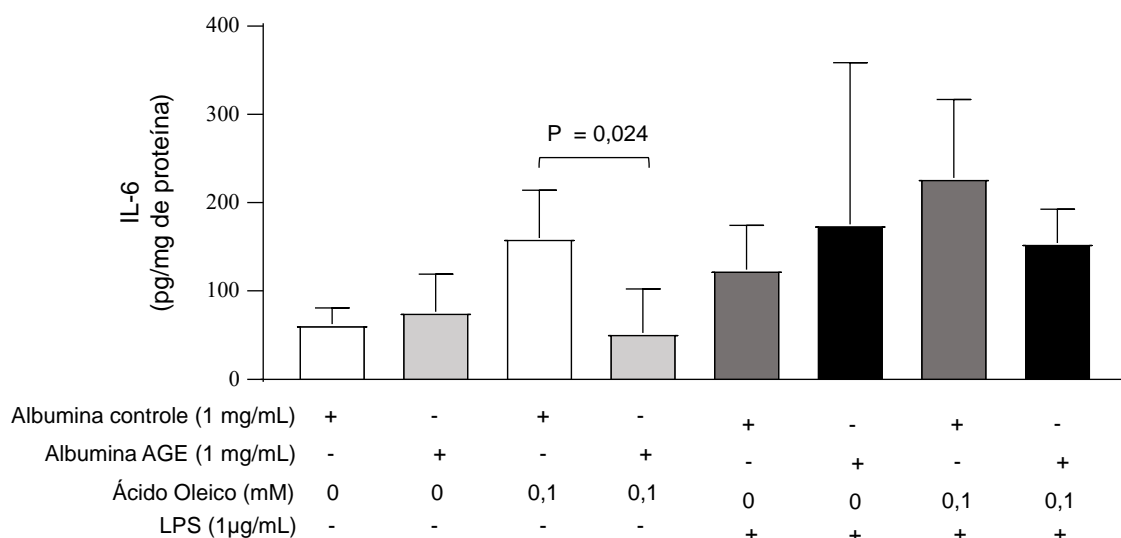
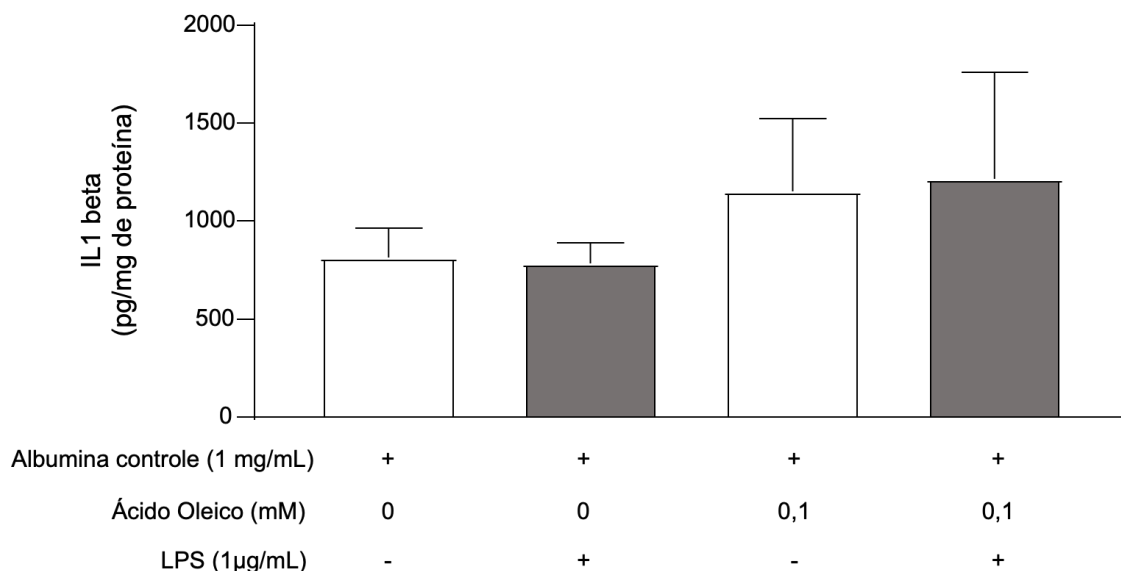


Figura 17 - Concentração de IL-6 no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle ou AGE (1mg/mL) apenas ou complexadas com 0,1mM de ácido oleico, por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-6 determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney.

A secreção de IL-1 beta foi semelhante entre as diferentes incubações das células HK-2 com albumina controle (Figura18).



.Figura 18 – Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle (1mg/mL) apenas ou complexada com

0,1mM de ácido oleico, por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-1 beta determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskall-Wallis ou Mann-Whitney.

Quando submetidas ao tratamento com albumina-AGE complexada com ácido oleico, as células HK-2 produziram maior quantidade de IL-1 beta em comparação ao tratamento com albumina controle sem ácido graxo, com LPS em ambas as condições (Figura 19).

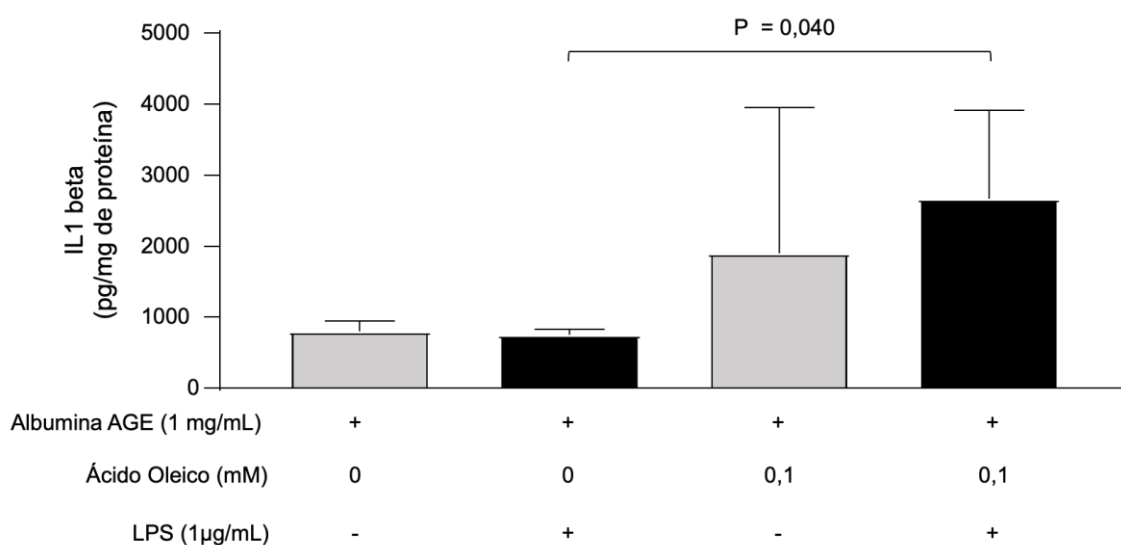


Figura 19 – Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina-AGE complexada com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina-AGE (1mg/mL) apenas ou complexada com 0,1mM de ácido oleico, por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-1 beta determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Kruskall-Wallis ou Mann-Whitney.

A concentração de IL-1 beta foi maior no meio de cultura das células tratadas com albumina-AGE complexada com ácido graxo e LPS em comparação à albumina controle (Figura 20).

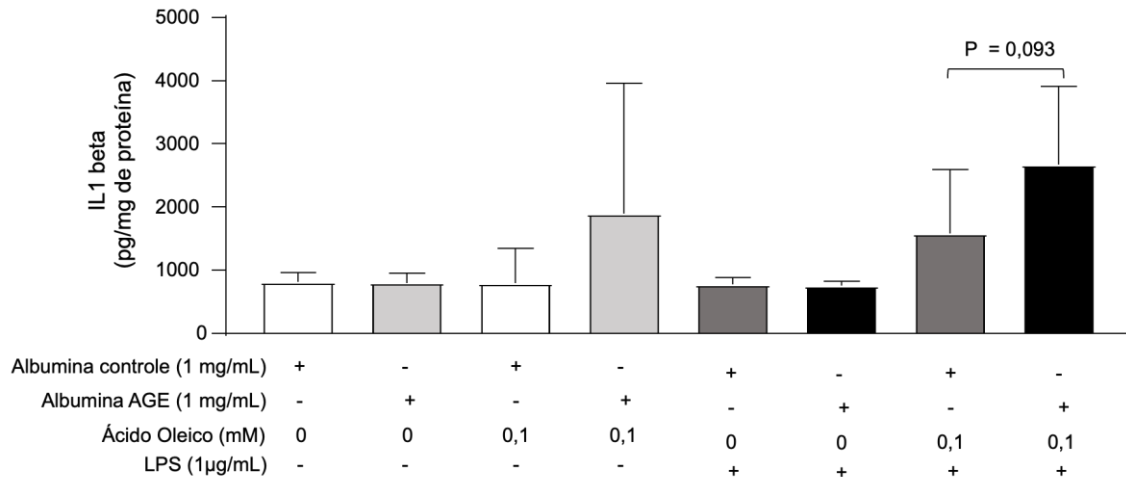


Figura 20 – Concentração de IL-1 beta no meio de cultura de células HK-2 tratadas com albumina controle ou AGE complexadas com ácido oleico, seguindo-se incubação na ausência ou presença de LPS. Células da linhagem HK-2 foram tratadas com albumina controle ou AGE (1mg/mL) apenas ou complexadas com 0,1mM de ácido oleico, por 48h. Após lavagem, as células foram incubadas na ausência ou presença LPS (1µg/mL), por 24h (n = 6). O meio de cultura foi recolhido e a concentração de IL-1 beta determinada por ELISA. Os resultados estão apresentados em mediana. As comparações foram feitas pelo teste de Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

A DRD é uma manifestação frequente do DM, contribuindo como importante causa de ingresso em terapia renal substitutiva e redução da expectativa de vida. Considerando-se a contribuição da hiperglicemia e dislipidemia para a gênese e evolução da DRD, avaliou-se na presente investigação, o impacto da albumina controle e AGE complexada a ácido palmítico ou oleico sobre a sensibilização inflamatória de células tubulares renais humanas. As células HK-2, utilizadas no presente estudo, apresentam características histoquímicas, imunocitoquímicas e funcionais, que reproduzem de maneira satisfatória os resultados obtidos com células tubulares proximais primárias. Sendo assim, constituem um modelo útil e adequado para o estudo da fisiopatologia da DRD.

Ácido graxo palmítico complexado com albumina controle ou AGE aumentou de maneira dose-dependente a secreção de IL6 e IL1 beta. Particularmente, a secreção de IL 1 beta foi maior com albumina controle complexada com palmítico 0,1 e 0,5mM. Após estimulação com LPS, a secreção de IL-1 beta aumentou em todas as incubações, tendo sido potencializada na presença de ácido palmítico 0,5mM em comparação à condição basal sem ácido graxo. Isto reitera que a presença de ácidos graxos na albumina exerce efeito inflamatório maior em comparação à albumina isoladamente, conforme previamente descrito (Kamijo et al., 2002).

As alterações no metabolismo de lípidos, colesterol, triglicérides e AGL contribuem para a injúria glomerular e tubular, favorecendo inflamação e fibrose teciduais. O rim saudável apresenta uma pequena quantidade de lípidos e o acúmulo destes compostos favorece a gênese e evolução da DRC. Interessantemente, de acordo com estudos clínicos e experimentais, o acúmulo renal de lípidos ocorre independentemente da dislipidemia diabética em indivíduos com DRD (Herman-Edelstein et al, 2014) e não é melhorado pelo tratamento com estatinas (Su et al, 2016).

No mesmo modelo celular utilizado na presente investigação, Nakatsuji et al (2020) demonstraram que AGL, em particular o ácido araquidônico, complexado à albumina, induzem a produção de prostaglandina E2 e fator induzido por HIF1-alfa o que contribui para a nefrotoxicidade. Isto não foi

observado quando incubações foram realizadas na ausência de albumina. Em condições de função renal preservada, apenas uma diminuta quantidade de pequenas proteínas é filtrada no glomérulo e reabsorvida no túbulo proximal. Entretanto, o aumento da permeabilidade glomerular por alteração na barreira de filtração, o que ocorre na doença renal, favorece o aumento do aporte de albumina ao túbulo proximal, o que promove evolução da doença renal (Baines et al, 2011). Isto é, em grande parte, determinado pelo aporte de AGL complexados com albumina ao epitélio tubular. Em camundongos que receberam injeção intraperitoneal de albumina apenas, albumina complexada com AGL ou salina, evidenciou-se que os AGL complexados com albumina são responsáveis pelo dano tubulointersticial, muito mais do que a albumina isoladamente (Kamijo et al, 2002). Além disso, AGL complexados à albumina favorecem a liberação de um fator quimiotático para macrófagos que contribui para o insulto inflamatório tubulointersticial (Kees-Folt et al, 1994).

A albumina atua como ligante de AGL no fluido extracelular e apresenta em sua estrutura sete domínios de ligação aos AGL com alta afinidade, determinada por sua estrutura tridimensional. Isto propicia grande plasticidade na capacidade de ligação de albumina aos AGL o que pode aumentar a concentração transportada de AGL em grande magnitude. Em condições fisiológicas, entre 0,1mol e 2mol de AGL encontram-se ligados à albumina humana, mas a razão molar ácido graxo:albumina pode elevar-se acima de 6:1 na vasculatura periférica, durante o jejum ou exercício extremo (Brodersen et al, 1990) ou no DM, doença hepática e doença cardiovascular (Cistola et al, 1991). Ácidos graxos de natureza distinta apresentam diferentes afinidades pela albumina, o que pode interferir em sua função biológica (Petitpas et al, 2001).

Apesar desta alta afinidade de ligação aos AGL, a albumina otimiza a captação destes lípides pelas células (Van der Vusse, 2009). Várias possibilidades são consideradas para a entrega de AGL às células pela albumina, incluindo: 1) a difusão do complexo albumina plasmática/AGL através de fendas endoteliais até o interstício; 2) o transporte do complexo albumina/AGL através das células endoteliais por endocitose e transporte de vesículas intracelulares; 3) a dissociação dos AGL da albumina plasmática no lúmen capilar seguido pela difusão de AGL não ligados através de fendas endoteliais e 4) a dissociação do complexo albumina plasmática / AGL no lúmen capilar antes

do transporte de AGL através das células endoteliais e sua subsequente liberação no compartimento intersticial (van der Vusse, 2009).

Os AGL são transportados ao interior das células renais, principalmente as tubulares, pela FATP1, FATP2 e FATP4, que se associam às anormalidades na captação de lípidos na DRD. Além disso, o receptor CD-36 também atua como transportador de AGL em podócitos, células mesangiais e, em menor escala, em células do epitélio proximal e distal. As FABP reconhecem AGL de cadeia longa como substrato e a maior eliminação urinária de FABP1 é apontada como indicadora de desenvolvimento da DRD. A posterior análise da expressão desses transportadores de AGL contribuirá para a melhor compreensão dos achados.

Os AGL são importantes fontes de energia e podem ser armazenados em gotículas lipídicas, quando incorporados à molécula de glicerol. De outro lado, atuam como importantes mediadores de sinalização intracelular e são capazes de deflagrar a resposta inflamatória, estresse de retículo endoplasmático, ativação do sistema imunológico inato, remodelagem do citoesqueleto e resistência insulínica (Mitrofanova et al, 2023). Estas vias associam-se à fibrose e morte celular por apoptose, piroptose e necroptose (Yu et al, 2023).

A análise da lipidômica do plasma de indivíduos com DRC revelou aumento da concentração plasmática de AGL livres, principalmente saturados e monoinsaturados, aliada a glicerolípides e glicerofosfolípides. Eles se correlacionaram positivamente com a elevação da trigliceridemia (Chen et al, 2017) e inversamente com a TFGe. De outro lado, a concentração de poli-insaturados é apontada como reduzida na maioria dos estudos. Ceramidas, derivadas de AGL também estão elevadas na circulação e, juntamente com outros metabólitos de AGL, se vinculam ao estresse inflamatório e oxidativo. Esta condição caracterizada pela menor beta oxidação mitocondrial de AGL, constitui uma das bases da inflexibilidade metabólica que norteia a evolução da doença renal (Baek et al, 2022).

Ácidos graxos saturados apresentam maior potencial inflamatório quando comparados aos insaturados e, em especial, monoinsaturados. O ácido palmítico e o ácido oleico são dois tipos de ácidos graxos que desempenham papéis diversos no organismo. O ácido palmítico, encontrado em alimentos de origem animal e óleos vegetais, é um ácido graxo saturado de

cadeia longa com 16 átomos de carbono. Embora seja uma fonte de energia durante o metabolismo, seu consumo excessivo tem sido associado a processos inflamatórios crônicos, resistência à insulina e doenças cardiovasculares. Por outro lado, o ácido oleico é um ácido graxo monoinsaturado presente, principalmente, e em alimentos de origem vegetal, como azeite de oliva e abacates. Com uma estrutura de cadeia longa, o ácido oleico é conhecido por seus potenciais benefícios à saúde, vinculados a efeitos anti-inflamatórios e redução de potencial oxidativo (Listenberger et al, 2003).

A complexação do ácido palmítico à albumina controle não exerceu efeitos significativos na produção de IL-6, independentemente das concentrações utilizadas (0,1 mM e 0,25 mM). Curiosamente, a presença de ácido palmítico em 0,5 mM reduziu a produção de IL-6, em comparação com a condição de controle. Esta diminuição foi ainda mais evidente quando as células foram pré-incubadas com albumina controle complexada com ácido palmítico 0,5 mM na ausência do insulto com LPS.

A complexação da albumina controle com ácido palmítico em concentrações de 0,1 mM e 0,5 mM resultou em um aumento na produção de IL-1 beta em comparação com a condição basal. Após o estímulo com LPS, todas as condições experimentais causaram um aumento na produção de IL-1 beta, sendo esse efeito potencializado na presença de ácido palmítico 0,5 mM. Os resultados sugerem que o ácido palmítico, especialmente em concentrações mais elevadas, pode intensificar a resposta inflamatória, evidenciada pelo aumento na produção de IL-1 beta.

A albumina é uma proteína de meia-vida média (cerca de 21 dias) o que, aliado à sua elevada concentração no plasma e à presença de vários resíduos de lisina e arginina (59 e 24, respectivamente) em sua estrutura, favorece sua modificação pela glicose ou oxoaldeídos reativos. De fato, a albumina é a principal proteína modificada por glicação na circulação, correspondendo a 10% do total de proteínas glicadas (Belinskaia et al, 2021; Rabbani et al, 2019). As propriedades físico-químicas e diversas funções biológicas da albumina são alteradas por sua modificação por glicação, incluindo as atividades antioxidantes e de transporte de lípidos e drogas (Anguizola et al, 2013). Particularmente, a alteração da reatividade do grupo tiol parece afetar a capacidade antioxidante da albumina humana modificada por metilgloxal (Pavićević et al, 2014). Além disso,

a albumina-AGE afeta adversamente o metabolismo de lípidos, prejudicando o transporte reverso de colesterol o que favorece o acúmulo intracelular de colesterol e óxidos de colesterol tóxicos. Isto se vincula às complicações do DM e aterosclerose (Pinto et al, 2022).

Na presente investigação, células tratadas com albumina-AGE, na ausência de ácidos graxos e complexada com 0,1 mM de ácido palmítico, apresentaram menor secreção de IL-6 e IL-1 beta, em comparação com a albumina controle. Após LPS, a produção de IL-6 também foi menor nas células pré- tratadas com albumina -AGE e ácido palmítico 0,1mM. Estes achados podem ser reflexo da menor capacidade de ligação da albumina-AGE aos ácidos graxos, conforme descrito por Henning e cols (2022). Desta forma, a quantidade de ácidos graxos ofertada às células pela albumina-AGE seria menor, em comparação àquela fornecida pela albumina controle.

Por outro lado, em algumas condições experimentais avaliadas na presente investigação, a albumina-AGE potencializou a ação do LPS favorecendo, por exemplo, maior secreção de IL1 beta. Em macrófagos, o pré-tratamento com albumina-AGE potencializou a ação de calgranulinas e LPS, incrementando a produção de citocinas inflamatórias (Minanni et al, 2021; Okuda et al, 2012). Estes efeitos precisam ser mais detalhados em análises futuras, levando-se em consideração uma determinação específica da razão molar entre ácidos graxos e albumina-AGE e a análise da expressão de genes relacionados à sinalização dos AGE nas células HK-2.

A relação entre a hiperglicemia crônica e a formação de lesões tubulointersticiais envolve a modificação de células epiteliais, um passo essencial na fibrose renal. O eixo AGE-RAGE desempenha um papel importante nesse processo, induzindo a produção de TGF-beta e outras citocinas envolvidas na transdiferenciação das células epiteliais em miofibroblastos., o que foi bloqueado pela neutralização de imunológica de RAGE e TGF-beta. Além disso, esta transdiferenciação foi observada em túbulos proximais de ratos com DM e em biópsias renais de indivíduos com DM 1. O uso de um agente que quebra as ligações cruzadas entre os AGE reduziu a transformação celular, apontando para um novo alvo terapêutico no DM (Oldfield et al, 2001).

A associação entre HbA1c, glicação da hemoglobina e AGE com o comprometimento da função renal no DM2 foi avaliada me modelo de

camundongos geneticamente modificados. Um AGE amplamente identificado, a carboximetil-lisina, apresentou associação com lesões nos podócitos, sendo considerado como marcador prognóstico para a DRD. A administração de AGE resultou em transição epitelial, com redução do número de podócitos e prejuízo na função renal. Além disso, no mesmo estudo, observou-se que a inibição do RAGE preveniu as lesões podocitárias e melhorou a proteinúria (Nishad et al, 2021).

Em linhagens celulares do túbulo proximal, LLC-PK1 e HK2, observou-se que a captação dos AGE é promovida por macropinocitose, impactando positivamente na concentração de TGF-beta. Além disso, verificou-se efeito negativo na atividade da Na⁺K⁺ATPase sugerindo-se o envolvimento da macropinocitose com a transição epitelial do túbulo proximal e na fibrose associada à DRD (Gallicchio et al, 2013).

A desregulação do equilíbrio no retículo endoplasmático, desencadeada pelo acúmulo de proteínas modificadas e AGE, desempenha um papel crucial na fisiopatologia da nefropatia diabética. A ativação do RAGE estimula a produção de ROS mediada pela NADPH oxidase, resultando em estresse do ER, inflamação, hipertrofia glomerular, lesões podocitárias e fibrose renal (Pathomthongtaweetchai et al, 2020).

A ação das citocinas inflamatórias avaliadas no presente tem sido evidenciada no desenvolvimento da DRD e a compreensão de vias moleculares associadas auxilia na busca de alvos terapêuticos. A IL-6 desempenha funções cruciais na regulação da resposta de fase aguda, inflamação, resposta imunológica, hematopoiese, regeneração hepática e neuronal, além de influenciar o desenvolvimento embrionário e fertilidade. Ela atua pela sinalização desencadeada por seu receptor (IL6-R) que forma um complexo com a gp130, o que favorece a ativação de janus cinases (JAK) e a fosforilação da STAT3. As STAT3 fosforiladas migram para o núcleo celular, agindo como fatores de transcrição que regulam a resposta inflamatória. Além da via JAK/STAT, a sinalização de IL-6 pode ativar a via MAPK, envolvendo cinases como a ERK. (Heinrich et al, 2003). A IL-6 é produzida por diversas células, incluindo células mesangiais. Ela induz a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos e a produção de proteínas de fase aguda, contribuindo para a glomerulopatia proliferativa mesangial e lesão tubular. A concentração de IL-6 é

apontada como preditora para gênese e evolução da DRD (Sanchez-Alamo et al, 2022). Nesse contexto, um estudo liderado por Lee YJ, evidenciou que IL-6 eleva a atividade do cotransportador Na(+)/glicose (SGLT) ao induzir a geração de espécies reativas de oxigênio. Esse impacto nas células do túbulo proximal renal está conectado às vias de sinalização STAT3, PI3K/Akt, MAPK e NFkappaB, as quais desempenham um papel significativo na toxicidade e comprometimento renal (Lee YJ et al, 2007). Essa condição também foi identificada em uma pesquisa envolvendo um modelo animal, no qual a ausência do gene que codifica essa interleucina resultou na manifestação de albuminúria nos animais (Manhian, et al, 2007).

A inflamação na DRC é, em grande parte, mediada pela ativação da IL-1beta pelo inflamassoma NLRP3 no rim (Hirano et al, 2017). A IL-1 beta é um marcador de evolução das doenças renais, atuando também como mediadora da fibrose túbulo-intersticial, e preditora de mortalidade cardiovascular. A utilização de antagonistas de IL-1 previne a fibrose túbulo-intersticial em modelo animal de DRC e reduz a aterogênese em indivíduos com DRC (Monika Buraczynska, et al, 2006; Ridker, P. et al, 2018). Nesta mesma perspectiva, o estudo de Vesey e colaboradores, observou que a IL-1 beta desempenha atividades significativas nas células do túbulo proximal, associadas à fibrose e à supressão da proliferação celular, dependendo do fator de crescimento transformador beta. Em resumo, esta citocina, no túbulo renal desempenha um papel chave na regulação do ambiente celular em situações de lesão, inflamação ou estresse. (Vesey et al, 2002).

Os achados da presente investigação permitiram evidenciar um efeito dose-dependente do ácido palmítico sobre a secreção de IL-1beta por células HK-2, tanto quando complexado com albumina controle como AGE. A concentração de ácido palmítico também determinou maior sensibilização ao efeito inflamatório do LPS. As ações sobre a IL-6 foram mais contraditórias e precisam ser melhor exploradas. Ambas as citocinas inflamatórias cursam com diferentes mecanismos de controle de expressão gênica e regulação. Em relação ao ácido oleico, diferentemente do esperado, observou-se uma ação inflamatória tanto para IL-6 como IL-1beta em baixa concentração, com potencialização do efeito do LPS.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a relação estabelecida entre hiperglicemia, dislipidemia e o desenvolvimento da DRD, os resultados obtidos neste estudo apontam para papel dos ácidos graxos palmítico e oleico na sensibilização inflamatória das células tubulares renais humanas (HK-2), tanto no estado basal, como após desafio com LPS. Além disso, os resultados ressaltam a complexidade das interações entre albumina modificada por AGE e ácidos graxos, destacando a necessidade de mais estudos para auxiliar na compreensão dos mecanismos que contribuem para a gênese e evolução da DRD, bem como para busca de alvos terapêuticos para mitigar a progressão da doença.

REFERÊNCIAS

- (1) (Federação Internacional de Diabetes [IDF], 2019). Acesso em: 09 mar de 2023.
- (2) Brasil. Ministério da Saúde. Diabetes. Biblioteca Virtual em Saúde, junho de 2022. Disponível em: 26/6 – Dia Nacional do Diabetes | Biblioteca Virtual em Saúde MS (saude.gov.br). Acesso em: 09 mar de 2023.
- (3) American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37: Supplement 1.
- (4) Solis-Herrera C, Triplitt C, Cersosimo E, DeFronzo RA. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. 2021 Sep 27. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, Levi M. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J Biol Chem*. 2002;277(21):18919-27.
- (5) Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. São Paulo: AC Farmacêutica, 2020. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2019-2020.pdf>. Acesso em: 09 de março de 2023.
- (6) Malerbi F, Andrade R, Morales P, Travassos S, Rodacki M, Bertoluci M. Manejo da retinopatia diabética. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes* (2022).
- (7) Jung CY, Yoo TH. Pathophysiologic Mechanisms and Potential Biomarkers in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes Metab J*. 2022; 46(2):181-197.
- (8) Hicks CW, Selvin E. Epidemiology of Peripheral Neuropathy and Lower Extremity Disease in Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019; 19(10):86
- (9) Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW; American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research Clinical Cardiology Epidemiology Prevention Circulation. 2003; 108:2154-2169.
- (10) Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, Pavkov ME. The Global Epidemiology of Diabetes and Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2018; 25:121-132.
- (11) PORTER, Kathryn S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). National Center for Health Statistics (U.S.). Division of Health and Nutrition Examination Surveys. In: National Conference on Health Statistics, 2015, Washington, D.C. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/51798>. Acesso em: [data de acesso, 13 de abril de 2023.]

- (12) Kramer HJ, Nguyen QD, Curhan G, Hsu CY, Port FK. Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus. *Jama*. 2003; 289: 3273-3277.
- (13) Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, Heagerty PJ, Tuttle K, Weiss NS, Boer IH. Clinical manifestations of kidney disease among US adults with diabetes, 1988-2014. *Jama*. 2016; 316:602-610.
- (14) Sociedade Brasileira de Nefrologia. Dia mundial do rim. Doença Renal Crônica (DRC) no Brasil; 2013. Disponível em: <https://www.sbn.org.br/publico/drc-no-brasil>. Acesso em: 09 mar 2023.
- (15) Sá J, Canani L, Rangel E, Bauer A, Escott G, Zelmanovitz T, Silveiro S, Bertoluci M. Doença renal do diabetes. Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes. 2022.
- (16) American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2021 abridged for primary care providers. *Clinical Diabetes*. 2021; 39:7-37.
- (17) Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017; 12:2032-2045.
- (18) Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care*. 2014; 37(10):2864-2883.
- (19) American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44 (Suppl 1):15-33.
- (20) National Kidney Foundation. KDOQI. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2007; 49:112-154.
- (21) Tonneijck, L., Muskiet, M. H. A., Smits, M. M., van Bommel, E. J. M., Heerspink, H. J. L., & van Raalte, D. H. Glomerular hyperfiltration in diabetes: mechanisms, clinical significance, and treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28(4): 1023-1039.
- (22) Lin YI-CHIH, Chang Yu-Hisung, Yang Shao-Yu, Wu Kwan-Dun, Chu Tzong-Shinn. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *Jour Form Med Assoc*. 2018; 117: 662-675.
- (23) Yamazaki T, Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. Treatment of Diabetic Kidney Disease: Current and future. *Diabetes Metab J*. 2021; 45:11-26.
- (24) Jenkins AJ, Lyons TJ, Zheng D, Otvos JD, Lackland DT, McGee D, Garvey WT, Klein RL; DCCT/EDIC Research Group. Lipoproteins in the DCCT/EDIC cohort: associations with diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2003; 64(3):817-28.

- (25) Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Passarelli M, Machado UF, Lin CJ, Corrêa-Giannella ML. Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment. *Clin Chim Acta*. 2016; 462:158-161.
- (26) Morton J, Zoungas S, Li Q, Patel AA, Chalmers J, Woodward M, Celermajer DS, Beulens JW, Stolk RP, Glasziou P, Ng MK; ADVANCE Collaborative Group. Low HDL cholesterol and the risk of diabetic nephropathy and retinopathy: results of the ADVANCE study. *Diabetes Care*. 2012; 35:2201-6.
- (27) Niewczas MA, Gohda T, Skupien J, Smiles AM, Walker WH, Rosetti F, Cullere X, Eckfeldt JH, Doria A, Mayadas TN, Warram JH, Krolewski AS. Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2012; (3):507-15.
- (28) Scott R, Best J, Forder P, Taskinen MR, Simes J, Barter P, Keech A; FIELD Study Investigators. Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study: baseline characteristics and short-term effects of fenofibrate [ISRCTN64783481]. *Cardiovasc Diabetol*. 2005; 4:13.
- (29) Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): results of feasibility study. The DCCT Research Group. *Diabetes Care*. 1987;10(1):1-19.
- (30) Mäkinen VP, Soininen P, Kangas AJ, Forsblom C, Tolonen N, Thorn LM, Viikari J, Raitakari OT, Savolainen M, Groop PH, Ala-Korpela M; Finnish Diabetic Nephropathy Study Group. Triglyceride-cholesterol imbalance across lipoprotein subclasses predicts diabetic kidney disease and mortality in type 1 diabetes: the FinnDiane Study. *J Intern Med*. 2013; 273:383-95.
- (31) Weldegiorgis M, Woodward M. Elevated triglycerides and reduced high-density lipoprotein cholesterol are independently associated with the onset of advanced chronic kidney disease: a cohort study of 911,360 individuals from the United Kingdom. *BMC Nephrol*. 2022 Sep 15;23(1):312. doi: 10.1186/s12882-022-02932-2. Erratum in: *BMC Nephrol*. 2022; 23(1):318.
- (32) Vieira SM, Monteiro MB, Marques T, Luna AM, Fortes MA, Nery M, Queiroz M, Dib SA, Vendramini MF, Azevedo MJ, Canani LH, Parisi MC, Pavin EJ, Giannella-Neto D, Corrêa-Giannella ML. Association of genetic variants in the promoter region of genes encoding p22phox (CYBA) and glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) and renal disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet*. 2011; 12:129.
- (33) Pelaes TS. Análise longitudinal de uma coorte de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 para caracterização da taxa de declínio da função renal. São Paulo: Faculdade de Medicina 2021.
- (34)) Anderson CM, Stahl A. SLC. Fatty acid transport proteins. *Mol Aspects Med*. 2013; 34(2-3):516-28.
- (35) Listenberger, L. L., Han, X., Lewis, S. E., Cases, S., Farese Jr, R. V., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2003). Triglyceride accumulation protects against fatty

acid-induced lipotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3077-3082.

(36) Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, Park AS, Tao J, Sharma K, Pullman J et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat. Med.* 2015; 21:37–46.

(37) 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: 561–572.

(38) Proctor G, Jiang T, Iwahashi M, Wang Z, Li J, Levi M. Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006; 55: 2502–2509.

(39) Noels H, Lehrke M, Vanholder R, Jankowski J. Lipoproteins and fatty acids in chronic kidney disease: molecular and metabolic alterations. *Nat Rev Nephrol.* 2021; 7:528-542.

(40) Sieber J, Lindenmeyer MT, Kampe K, Campbell KN, Cohen CD, Hopfer H, Mundel P, Jehle AW. Regulation of podocyte survival and endoplasmic reticulum stress by fatty acids. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299:821-829.

(41) Lennon R, Pons D, Sabin MA, Wei C, Shield JP, Coward RJ, Tavaré JM, Mathieson PW, Saleem MA, Welsh GI. Saturated fatty acids induce insulin resistance in human podocytes: implications for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24:3288-96.

(42) Ueno T, Kaname S, Takaichi K, Nagase M, Tojo A, Onozato ML, Fujita T. LOX-1, an oxidized low-density lipoprotein receptor, was upregulated in the kidneys of chronic renal failure rats. *Hypertens Res.* 2003; (1):117-22.

(43) Sun J, Hulthenby K, Axelsson J, Nordström J, He B, Wernerson A, Lindström K. Proximal Tubular Expression Patterns of Megalin and Cubilin in Proteinuric Nephropathies. *Kidney Int Rep.* 2017; 2(4):721-732.

(44) Wang Z, Jiang T, Li J, Proctor G, McManaman JL, Lucia S, Chua S, Levi M. Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVBdb/db mice with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54(8):2328-35.

(45) Khan S, Cabral PD, Schilling WP, Schmidt ZW, Uddin NA, Gingras A, Madhavan SM, Garvin JL, Schelling JR. Kidney proximal tubule lipoapoptosis is regulated by Fatty Acid Transporter-2 (FATP2). *J. Am. Soc. Nephrol.* 2018; 29: 81–91.

(46) Khan S, Gaivin RJ, Abramovich C, Boylan M, Calles J, Schelling JR. Fatty acid transport protein-2 (FATP2) regulates glycemic control and diabetic kidney disease progression. *JCI insight.* 2020; 5:1-14.

- (47) Chen Y, Yan Q, Lv M, Song K, Dai Y, Huang Y, Zhang L, Zhang C, Gao H. Involvement of FATP2-mediated tubular lipid metabolic reprogramming in renal fibrogenesis. *Cell Death Dis.* 2020; 11(11):994.
- (48) Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest.* 2008; 118:1657–1668.
- (49) Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological Reviews.* 2010; 90:367-417.
- (50) Abo El-Asrar M, Ismail EAR, Elnhrawy AM, Thabet RA. Fatty acid binding protein 1 (FABP1) and fatty acid binding protein 2 (FABP2) as a link between diabetic nephropathy and subclinical atherosclerosis in children and adolescents with type 1 diabetes. *J Diabetes Complications.* 2023; 37:1-10.
- (51) Wang A, Zhang S, Li Y, Zhu F, Xie B. Study on the relationship between lipoprotein (a) and diabetic kidney disease. *J Diabetes Complications.* 2023; 37:108-378.
- (52) Susztak K, Ciccone E, McCue P, Sharma K, Bottinger EP. Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy. *PLoS Med.* 2005; 2:45.
- (53) Wilson PC, Wu H, Kirita Y, Uchimura K, Ledru N, Rennke HG, Welling PA, Waikar SS, Humphreys BD. The single-cell transcriptomic landscape of early human diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019; 116:19619–19625.
- (54) Baines R, Brunskill N. Tubular toxicity of proteinuria. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7: 177-180.
- (55) Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int.* 2016; 89: 58-67.
- (56) Cobbs A, Ballou K, Chen X, George J, Zhao X. Saturated fatty acids bound to albumin enhance osteopontin expression and cleavage in renal proximal tubular cells. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* 2018; 10(1):29-38.
- (57) Chen Q, Su Y, Ju Y, Ma K, Li W, Li W. Astragalosides IV protected the renal tubular epithelial cells from free fatty acids-induced injury by reducing oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2018 Dec;108:679-686.
- (58) Ma X, Wang Q. Short-Chain Fatty Acids Attenuate Renal Fibrosis and Enhance Autophagy of Renal Tubular Cells in Diabetic Mice Through the HDAC2/ULK1 Axis. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2022; 37(3):432-443.
- (59) Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014; 18:1-14.

(60) Barbosa JH, Oliveira SL, Seara LT The role of advanced glycation end-products (AGEs) in the development of vascular diabetic complications. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; 52(6):940-50.

(61) Santana MFM, Lira ALA, Pinto RS, Minanni CA, Silva ARM, Sawada MIBAC, Nakandakare ER, Correa-Giannella MLC, Queiroz MS, Ronsein GE, Passarelli M. Enrichment of apolipoprotein A-IV and apolipoprotein D in the HDL proteome is associated with HDL functions in diabetic kidney disease without dialysis. *Lipids Health Dis.* 2020; 19(1):205.

(62) Thieme K, Da Silva KS, Fabre NT, Catanozi S, Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Costa-Pessoa JM, Oliveira-Souza M, Machado UF, Passarelli M, Correa-Giannella ML. N-Acetyl Cysteine Attenuated the Deleterious Effects of Advanced Glycation End-Products on the Kidney of Non-Diabetic Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016; 40:608-620.

(63) Brennan E, Kantharidis P, Cooper ME, Godson C. Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function. *Nat Rev Nephrol.* 2021; 17(11):725-739.

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

(65) Ahmed N, Thornalley PJ, Dawczynski J. et al. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43: 3856–3864.

(66) Vistoli G, Maddis DD, Cipak A, Zarkovic NC, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research.* 2013; 47: 3–27.

(67) Wu T, Ding L, Andoh V, Zhang J, Chen L. The Mechanism of Hyperglycemia-Induced Renal Cell Injury in Diabetic Nephropathy Disease: An Update. *Life (Basel).* 2023; 13(2):539.

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

(69) Minanni CA, Machado-Lima A, Iborra RT, Okuda LS, de Souza Pinto R, Santana MFM, Lira ALA, Nakandakare ER, Correa-Giannella MLC, Passarelli M. Persistent Effect of Advanced Glycated Albumin Driving Inflammation and Disturbances in Cholesterol Efflux in Macrophages. *Nutrients.* 2021 Oct 17;13(10):3633.

(70) Feng H, Hu H, Zheng P, Xun T, Wu S, Yang X, Mo L. AGE receptor 1 silencing enhances advanced oxidative protein product-induced epithelial-to-

mesenchymal transition of human kidney proximal tubular epithelial cells via RAGE activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 529:1201-1208.

(71) Eleftheriadis T, Pissas G, Tsogka K, Nikolaou E, Liakopoulos V, Stefanidis I. A unifying model of glucotoxicity in human renal proximal tubular epithelial cells and the effect of the SGLT2 inhibitor dapagliflozin. *Int Urol Nephrol.* 2020; 52:1179-1189.

(72) Pinto-Junior DC, Silva KS, Michalani ML, Yonamine CY, Esteves JV, Fabre NT, Thieme K, Catanozi S, Okamoto MM, Seraphim PM, Corrêa-Giannella ML, Passarelli M, Machado UF. Advanced glycation end products-induced insulin resistance involves repression of skeletal muscle GLUT4 expression. *Sci Rep.* 2018; 8(1):8109.

(73) da Silva KS, Pinto PR, Fabre NT, Gomes DJ, Thieme K, Okuda LS, Iborra RT, Freitas VG, Shimizu MHM, Teodoro WR, Marie SKN, Woods T, Brimble MA, Pickford R, Rye KA, Okamoto M, Catanozi S, Correa-Giannella ML, Machado UF, Passarelli M. N-acetylcysteine Counteracts Adipose Tissue Macrophage Infiltration and Insulin Resistance Elicited by Advanced Glycated Albumin in Healthy Rats. *Front Physiol.* 2017; 8:723.

(74) Thieme K, Pereira BMV, da Silva KS, Fabre NT, Catanozi S, Passarelli M, Correa-Giannella ML. Chronic advanced-glycation end products treatment induces TXNIP expression and epigenetic changes in glomerular podocytes in vivo and in vitro. *Life Sci.* 2021; 270:1-10.

(75) Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis.* 2018; 9(2):119.

(76) Kay AM, Simpson CL, Stewart JA Jr. The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification. *J Diabetes Res.* 2016;2016:6809703.

(77) Muntner P, Coresh J, Smith JC, Eckfeldt J, Klag MJ. Plasma lipids and risk of developing renal dysfunction: the atherosclerosis risk in communities study. *Kidney Int.* 2000; 58:293-301.

(78) Tong L, Adler SG. Diabetic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(2):335-338.

(79) Tozawa M, Iseki K, Iseki C, Oshiro S, Ikemiya Y, Takishita S. Triglyceride, but not total cholesterol or low-density lipoprotein cholesterol levels, predict development of proteinuria. *Kidney Int.* 2002; 62:1743-1749.

(80) Khan S, Abu Jawdeh BG, Goel M, Schilling WP, Parker MD, Puchowicz MA, Yadav SP, Harris RC, El-Meanawy A, Hoshi M, Shinlapawittayatorn K, Deschênes I, Ficker E, Schelling JR. Lipotoxic disruption of NHE1 interaction with PI(4,5)P2 expedites proximal tubule apoptosis. *J Clin Invest.* 2014; 124(3):1057-68.

- (81) Cobbs A, Chen X, Zhang Y, George J, Huang MB, Bond V, Thompson W, Zhao X. Saturated fatty acid stimulates production of extracellular vesicles by renal tubular epithelial cells. *Mol Cell Biochem.* 2019; 458(1-2):113-124.
- (82) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- (83) Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 1994; 45(1):48-57.
- (84) Kamijo A, Kimura K, Sugaya T, Yamanouchi M, Hase H, Kaneko T, Hirata Y, Goto A, Fujita T, Omata M. Urinary free fatty acids bound to albumin aggravate tubulointerstitial damage. *Kidney Int.* 2002; 62(5):1628-37.
- (85) Su, X. et al. Effect of statins on kidney disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.* 2016; 67: 881–892.
- (86) Nakatsuji M, Urakami-Takebayashi Y, Miyadokoro S, Ikeda T, Takehara I, Sun H, Motohashi H, Ohno Y, Nagai J. Fatty acids bound to albumin induce prostaglandin E2 production in human renal proximal tubular epithelial cell line HK-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 530(1):273-277.
- (87) Kees-Folts D, Sadow JL, Schreiner GF. Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid. *Kidney Internat* 1994; 45: 1697-1709.
- (88) Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielsen SU, Pedersen AO. Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur J Biochem.* 1990; 189(2):343-9.
- (89) Cistola DP, Small DM. Fatty acid distribution in systems modeling the normal and diabetic human circulation. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest.* 1991; 87(4):1431-41.
- (90) Petitpas I, Grüne T, Bhattacharya AA, Curry S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J Mol Biol.* 2001; 314(5):955-60.
- (91) Van der Vusse GJ. Albumin as Fatty Acid Transporter. *Drug Metab.Pharmacokinet.* 2009; 24(4):300–307.
- (92) Mitrofanova, A., Merscher, S. & Fornoni, A. Kidney lipid dysmetabolism and lipid droplet accumulation in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2023; 19: 629–645.
- (93) Yu Q, Chen Y, Zhao Y, Huang S, Xin X, Jiang L, Wang H, Wu W, Qu L, Xiang C, Wang S, Liu G, Yang L. Nephropathy Is Aggravated by Fatty Acids in

Diabetic Kidney Disease through Tubular Epithelial Cell Necroptosis and Is Alleviated by an RIPK-1 Inhibitor. *Kidney Dis (Basel)*. 2023; 9(5):408-423.

(94) Chen H, Chen L, Liu D, Chen DQ, Vaziri ND, Yu XY, Zhang L, Su W, Bai X, Zhao YY. Combined Clinical Phenotype and Lipidomic Analysis Reveals the Impact of Chronic Kidney Disease on Lipid Metabolism. *J Proteome Res*. 2017; 16(4):1566-1578.

(95) Baek J, He C, Afshinnia F, Michailidis G, Pennathur S. Lipidomic approaches to dissect dysregulated lipid metabolism in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2022; 18(1):38-55.

(96) Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(6):3077-82.

(97) Belinskaia DA, Voronina PA, Shmurak VI, Jenkins RO, Goncharov NV. Serum Albumin in Health and Disease: Esterase, Antioxidant, Transporting and Signaling Properties. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(19):10318.

(98) Rabbani G, Ahn SN. Structure, enzymatic activities, glycation and therapeutic potential of human serum albumin: A natural cargo. *Int J Biol Macromol*. 2019; 123:979-990.

(99) A Anguizola, J.; Matsuda, R.; Barnaby, O. S.; Hoy, K. S.; Wa, C.; Debolt, E.; Koke, M.; Hage, D. S: Glycation of human sérum albumin. *Clin. Chim. Acta* 2013, 425, 64–76

(100) Pavićević ID, Jovanović VB, Takić MM, Penezić AZ, Aćimović JM, Mandić LM. Fatty acids binding to human serum albumin: Changes of reactivity and glycation level of Cysteine-34 free thiol group with methylglyoxal. *Chem Biol Interact*. 2014; 224:42-50.

(101) Pinto RS, Minanni CA, de Araújo Lira AL, Passarelli M. Advanced Glycation End Products: A Sweet Flavor That Embitters Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(5):2404.

(102) Henning C, Stübner C, Arabi SH, Reichenwallner J, Hinderberger D, Fiedler R, Girndt M, Di Sanzo S, Ori A, Glomb MA. Glycation Alters the Fatty Acid Binding Capacity of Human Serum Albumin. *J Agric Food Chem*. 2022; 70(9):3033-3046.

(103) Oldfield, M. D., Bach, L. A., Forbes, J. M., Nikolic-Paterson, D., McRobert, A., Thallas, V., Atkins, R. C., Osicka, T., Jerums, G., & Cooper, M. E. (2001).

(104) Nishad R, Tahaseen V, Kavvuri R, Motrapu M, Singh AK, Peddi K, Pasupulati AK. Advanced-Glycation End-Products Induce Podocyte Injury and Contribute to Proteinuria. *Front Med (Lausanne)*. 2021; 8:685447.

- (105) Gallicchio MA, Bach LA. Uptake of advanced glycation end products by proximal tubule epithelial cells via macropinocytosis, *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2013; 1833: 2922-2932.
- (106) Pathomthongtaweekchai N, Chutipongtanate S. AGE/RAGE signaling-mediated endoplasmic reticulum stress and future prospects in non-coding RNA therapeutics for diabetic nephropathy. *Biomed Pharmacother.* 2020; 131:110655.
- (107) Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003; 374(Pt 1):1-20.
- (108) Sanchez-Alamo B, Shabaka A, Cachofeiro V, Cases-Corona C, Fernandez-Juarez G; PRONEDI study investigators. Serum interleukin-6 levels predict kidney disease progression in diabetic nephropathy. *Clin Nephrol.* 2022; 97(1):1-9.
- (109) Lee YJ, Heo JS, Suh HN, Lee MY, Han HJ. Interleukin-6 stimulates alpha-MG uptake in renal proximal tubule cells: involvement of STAT3, PI3K/Akt, MAPKs, and NF-kappaB. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293(4):F1036-46.
- (110) Manhiani MM, Quigley JE, Socha MJ, Motamed K, Imig JD. IL6 suppression provides renal protection independent of blood pressure in a murine model of salt-sensitive hypertension. *Kidney Blood Press Res.* 2007;30(4):195-202.
- (111) Buraczynska M, Ksiazek P, Kubit P, Zaluska W. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism affects the progression of chronic renal failure. *Cytokine.* 2006; 36(3-4):167-72.
- (112) Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, Koenig W, Libby P, Everett BM, Lefkowitz M, Thuren T, Cornel JH. Inhibition of Interleukin-1 β by Canakinumab and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2018; 71(21):2405-2414.
- (113) Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobé G, Johnson DW. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int.* 2002; 62(1):31-40.