

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA UREMIA NA RESPOSTA CELULAR E EXPRESSÃO DA
QUIMIOCINA CXCL12 EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

CURITIBA

2012

VANESSA RIBEIRO

**INFLUÊNCIA DA UREMIA NA RESPOSTA CELULAR E EXPRESSÃO DA
QUIMIOCINA CXCL12 EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção ao título de mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Andréa E. M. Stinghen

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Ribeiro, Vanessa

Influência da uremia na resposta celular e expressão da quimiocina CXCL12 em pacientes em hemodiálise. – Curitiba, 2012.
88 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Andréa Emília Marques Stinghen

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

1. Insuficiência renal crônica 2. Uremia 3. Hemodiálise 4. Quimiocina CXCL12 I. Título II. Stinghen, Andréa Emília Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica.

CDD (20. ed.) 616.635



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

"INFLUÊNCIA DA UREMIA NA RESPOSTA CELULAR E EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA CXCL12 EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE"

por

VANESSA RIBEIRO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:


Prof.ª. Dr.ª. Andréa Emília Marques Stinghen (presidente)


Adriana Frohlich Mercadante


Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza

Curitiba, 20 de março de 2012.

Ao amor da minha vida, Bruno Heidemann.

Aos meus pais Alcir e Fátima.

À minha irmã Talita.

Por todo apoio, incentivo, compreensão e principalmente amor a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pelo dom da vida e pela graça de acordar com saúde e forças para seguir adiante diariamente. Por Ele ser meu guia sempre, e por esse motivo eu concluir mais uma etapa em minha vida, comemorando com muita alegria.

Aos meus pais Alcir e Fátima e a minha irmã Talita, que sempre me incentivou durante os meus anos de educação a ir em busca de realizar meus sonhos, apoiando e incentivando toda decisão por mim tomada e ensinando que é nos momentos de fraqueza que os laços se fortalecem e com eles vem a vontade de seguir adiante.

Ao meu esposo, um agradecimento especial, pois em meio a tanta turbulência, sempre me proporcionou amor e carinho, me fazendo ver o lado bom de tudo que eu passava, fazendo com que não desistisse do objetivo final. Pelo incentivo constante e pela força dada, não me deixando cair nem desistir em momento algum.

A Prof. Dra. Andréa Stinghen pela confiança em todos esses anos. Pelos ensinamentos, que me fizeram crescer e amadurecer tanto pessoalmente como intelectualmente. Sendo sempre um modelo a ser seguido de garra e determinação. E principalmente pelo fato de tornar possível minha conquista profissional, alcançando o mérito de ser Mestre.

A Prof. Dra. Giseli Klassen pela oportunidade a mim dada e por abrir as portas da UFPR, principalmente seu laboratório, e a minha mente para a pesquisa.

Ao grupo "*Scientia Renal*", pelas diversas reuniões e discussões sobre doenças renais, que proporcionaram um maior entendimento e interesse na área pesquisada. Principalmente ao Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho por sempre incentivar a busca da evolução nos conhecimentos sobre a doença renal, apoiando de forma peculiar cada integrante do grupo.

Aos colegas de Laboratório, Liandra Kondrat, Bruna Bosquetti, Lisienny Rempel, Rayana Pereira Maciel, Geison Tibéra e Guilherme Fabri Pereira, por todo apoio, pelas horas e dias de dedicação em busca de respostas às diversas hipóteses da pesquisa.

Aos colegas dos laboratórios de Neurobiologia, Imunologia e Microbiologia, principalmente à Silvia Rodrigues, Alessandra Finco, Juliani Salvini Ramada, Carine Lima e Camila Zanata. Um agradecimento especial à Beatriz Borges, Márcia Appel, por todo auxílio no desenvolvimento da técnica de citometria de fluxo realizada no trabalho.

Aos colegas que já partiram para uma nova etapa de suas vidas, entretanto fizeram parte das etapas iniciais do meu mestrado, pela prestatividade e amizade: Camila Tainah da Silva, Janaína Peixoto e Juliana Burjak.

Aos profissionais do Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral que possibilitaram que o projeto se concretizasse fazendo deste uma pesquisa.

Às mães internadas no Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, que consentiram com as doações de seu cordão umbilical, fonte de material para nossa pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, que dedicaram suas horas ensinando e serviram de exemplos a serem seguidos.

Aos funcionários da Universidade Federal do Paraná, em especial à secretária da Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Luciana Marques, que estava sempre se mostrou muito atenciosa e prestativa, tanto pessoalmente quanto com auxílio burocrático e administrativo necessário.

Ao colega da PUC-PR Julio Francisco pelos empréstimos de materiais.

Finalmente aos pacientes com doença renal crônica que nos doaram seu sangue na esperança de que melhores perspectivas de tratamento surgissem para esta doença que tanto os aflige, e que afeta muitos brasileiros.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e a Fundação Araucária de Fomento a Pesquisa Paranaense por financiar este projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Agradeço

RESUMO

O acúmulo de toxinas urêmicas gerado pela diminuição da taxa de filtração glomerular no paciente com doença renal crônica (DRC) vem acompanhado por alterações metabólicas e vasculares no organismo que predispõem esses pacientes ao desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV). O *Stromal cell-derived factor 1* (SDF-1/CXCL12), é uma quimiocina de ação pleiotrópica, com expressão alterada em tecidos inflamados e lesionados, capaz de mobilizar células da medula óssea para o local da lesão, mediando o reparo e regeneração tecidual. No presente trabalho, através de uma combinação de estudos *in vivo* e *in vitro*, investigamos o efeito da uremia na expressão de CXCL12 e proliferação celular. Para isso, amostras provenientes de um estudo anterior com dados publicados por Stinghen et al. 2010 foram utilizadas. No presente estudo foram analisados marcadores de inflamação sistêmica como proteína C reativa (PCR) e interleucina-6 (IL-6), em níveis plasmáticos. Além da inflamação, foi feita a avaliação da disfunção endotelial pelos níveis plasmáticos de Interleucina-8 (IL-8) e verificada a sinalização de regeneração vascular pelos níveis plasmáticos e em sobrenadante celular de CXCL12. O modelo experimental foi realizado com células endoteliais humanas extraídas de veia de cordão umbilical (HUVECs). Tratamentos específicos utilizando meio de cultivo acrescido de plasma urêmico de pacientes em hemodiálise (*pool* de plasmas urêmicos) ou com plasma normal (*pool* de plasma de indivíduos saudáveis) foram feitos com cinética de 0 h, 6 h e 12 h. As concentrações plasmáticas médias de PCR, IL-6, IL-8 e CXCL12 foram respectivamente $4,9 \pm 4,8$ mg/mL, $6,76 \pm 8,1$ pg/mL, $128,2 \pm 206,2$ pg/mL e $2625,87 \pm 1288,58$ pg/mL. Foi observado uma correlação positiva entre PCR e a IL-6 ($p=0,57$, $P<0,005$) e CXCL12 com IL-8 ($p=0,4462$, $P<0,05$). A análise da expressão de CXCL12 em sobrenadante de cultura revelou que após 6 horas de tratamento as células em ambiente saudável expressam mais CXCL12 do que as tratadas com plasma urêmico ($54,5 \times 15,7\%$). As análises do ciclo celular revelaram que células endoteliais submetidas a tratamento com plasma saudável, apresentam um padrão de crescimento celular regular (cresce, duplica e com o passar do tempo, morre). Diferentemente das células submetidas ao tratamento com plasma urêmico que apresentam uma alta porcentagem de morte celular. Nossos dados demonstram que os níveis plasmáticos das quimiocinas CXCL12 e IL-8 estão correlacionados em pacientes em HD. Tal correlação ocorre em paralelo ao aumento dos marcadores de inflamação sistêmica. A literatura descreve que tanto IL-8 quanto CXCL12 atuam em conjunto na manutenção e reparo de lesões teciduais, e que a produção de CXCL12 pode estar relacionada a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e ligação a seus receptores (CXCR4 e CXCR7) na superfície celular. Assim, sugerimos que os níveis de CXCL12 e IL-8 encontrados nestes pacientes podem refletir um sistema de reparo ativado, e que a toxicidade urêmica esteja inibindo a produção de CXCL12, seja pela diminuição de NO ou pela saturação da ligação a seus receptores CXCR4 e CXCR7, entretanto estudos adicionais são necessários para comprovação de tais hipóteses.

Palavras-Chave: Doença renal crônica, toxinas urêmicas, lesão e regeneração tecidual e CXCL12.

ABSTRACT

The accumulation of uremic toxins generated by reduction of glomerular filtration in patients with chronic kidney disease (CKD) is accompanied by metabolic and vascular changes in the body that predispose these patients to the development of cardiovascular disease (CVD). The stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) is a pleiotropic chemokine action, with altered expression in injured and inflamed tissues, capable of mobilizing bone marrow cells to the site of injury, mediating tissue repair and regeneration. In this study, with a combination of in vivo and in vitro we investigated the effect of expression of CXCL12 uremia and cell proliferation. For this, samples from a previous study published by Stinghen et al. (2010) were used. In the present study, we analyzed markers of systemic inflammation such as C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) in plasma levels. In addition to inflammation, was made by assessing endothelial dysfunction plasma levels of Interleukin-8 (IL-8) and checked for signal regeneration vascular the plasma supernatant and cell CXCL12. The experimental model was carried out with human endothelial cells derived from umbilical vein (HUVECs). Specific treatments using culture medium supplemented plasma of uremic patients on hemodialysis (uremic plasma pooled) or with normal plasma (pooled plasma from healthy individuals) were made with kinetics 0 h, 6 h and 12 h. The mean plasma concentrations of CRP, IL-6, IL-8 and CXCL12 was respectively 4.9 ± 4.8 mg / ml, 6.76 ± 8.1 pg / ml at 128.2 ± 206.2 pg / mL and 2625.87 ± 1288.58 pg / mL. We observed a positive correlation between CRP and IL-6 ($p = 0.57$, $P < 0.005$) and CXCL12 with IL-8 ($p = 0.4462$, $P < 0.05$). Analysis of the expression of CXCL12 in culture supernatant showed that after six hours of treatment in healthy environment cells express more than CXCL12-treated plasma uremic ($54.5 \times 15.7\%$). Cell cycle analyzes showed that endothelial cells subjected to plasma treatment healthier, they have a regular pattern of cell growth (grows, and doubles over time, die). Unlike the cells subjected to treatment with uremic plasma that have a high percentage of cell death. Our data demonstrate that plasma levels of chemokines CXCL12 and IL-8 are correlated in HD patients. This correlation occurs in parallel with the increase in markers of systemic inflammation. The literature indicates that both IL-8 as CXCL12 act together to maintain and repair of tissue damage, and the production of CXCL12 that can be related to the bioavailability of nitric oxide (NO) and binding to its receptor (CXCR4 and CXCR7) on the surface cell. We therefore suggest that levels of CXCL12 and IL-8 found in these patients may reflect a repair system activated, and the uremic toxicity is inhibiting the production of CXCL12, or by reduction of NO, or by saturation binding to its receptors CXCR4 and CXCR7, however further studies are needed to prove such hypotheses.

Keywords: Chronic kidney disease, uremic toxins, injury and tissue regeneration and CXCL12.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1–	ANATOMIA RENAL.....	22
FIGURA 2–	ANATOMIA DE UM NÉFRON.....	23
FIGURA 3–	REGENERAÇÃO ENDOTELIAL.....	32
FIGURA 4-	FAMÍLIAS DAS QUIMIOCINAS.....	38
FIGURA 5–	CXCL12/SDF-1 E SEU POTENCIAL PAPEL NA ISQUEMIA MIOCÁRDICA.....	40
FIGURA 6-	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA.....	58
FIGURA 7-	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E REGENERAÇÃO TECIDUAL.....	59
FIGURA 8A -	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAS (HUVECs).....	60
FIGURA 8B -	FOTOMICROGRAFIA DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVECs) POR MICROSCOPIA ÓTICA COM AUMENTO DE 10X.....	60
FIGURA 9 -	ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DO MTT.....	61
FIGURA 10A -	EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE CXCL12 PELAS HUVECs APÓS CINÉTICA DE TRATAMENTO (0 H, 6 H e 12 H).....	62
FIGURA 10B -	EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE CXCL12 PELAS HUVECs APÓS 6 H DE TRATAMENTO.....	63
FIGURA 10C -	DELTA PERCENTUAL ($\Delta\%$) DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DE CXCL12.....	63
FIGURA 11A -	PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR - FASE G0/SUB-G1.....	64
FIGURA 11B -	PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR - FASE G1.....	64
FIGURA 11C -	PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR - FASE G2.....	65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 –	ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	24
QUADRO 2 –	EFEITOS DE TOXINAS URÊMICAS <i>IN VITRO</i> SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS MADURAS E PROGENITORAS.....	28
QUADRO 3 –	QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA -	Ácido araquidônico
ADMA -	Dimetilarginina assimétrica
AGES -	Produtos Finais de Glicação Avançada
AV -	Arteriovenosa
CDR-PR -	Clínica de Doenças Renais de Curitiba-PR
CEP/SD -	Comitê de Ética em Pesquisa
CGF -	Fórmula de <i>Cockcroft-gault</i>
CXCL12 -	Quimiocina (motivo C-X-C) ligante 12
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DCV -	Doença cardiovascular
DP -	Diálise peritoneal
DRC -	Doença renal crônica
ECGS -	Suplemento de Crescimento de Célula Endotelial
ELISA -	Ensaio Imunoenzimático
EPC -	Células Progenitoras Endoteliais
HCAECs -	Células endoteliais da artéria coronariana humana
Hcy -	Homocisteína
HD -	Hemodiálise
HDL -	Lipoproteína de Alta Densidade
hsPCR -	Proteína C Reativa de alta sensibilidade
HUVEC -	Células Endoteliais Humanas de Veia de Cordão Umbilical
IS -	Indoxil sulfato

IL-1 β -	Interleucina 1 β
IL-6 -	Interleucina 6
IL-8 -	Interleucina 8
IL-8RB -	Interleucina 8 receptor beta
IP-10 -	Proteína 10 induzível por Interferon
I-TAC -	T α -Quimioatraente Induzível por IFN- γ
kDa -	Quilodaltons
Kg -	Quilograma
LDL -	Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1 -	Proteína Quimiotática de Monócitos-1
MDRD -	Modificação da Dieta na Doença Renal
MEM -	Meio Essencial Mínimo
MIF -	Fator Inibitório de Migração de Macrófagos
MIG -	Monocina induzível por IFN- γ
Motivo ELR -	Motivo Glutamato, Leucina, Arginina
mRNA -	RNA mensageiro
MTT -	3-[4,5-dimetiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromide
NF-KB –	Fator Nuclear KB
NO -	Óxido Nítrico
PBS -	Tampão Fosfato Salino
PCR -	Proteína C reativa
PCS -	p - cresil sulfato
PMN -	Polimorfonucleares
RAEC -	Células Endoteliais da Aorta de Coelho

RAGEs -	Receptores de Produtos Finais de Glicação Avançada
ROS -	Espécie Reativa de Oxigênio
SBN -	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SDF-1 -	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>
SFB -	Soro fetal bovino
sICAM-1 -	Molécula de Adesão Intercelular Solúvel -1
SUS -	Sistema Único de Saúde
sVCAM-1 -	Molécula de Adesão Vascular Solúvel -1
TFG -	Taxa de Filtração Glomerular
TNF- α -	Fator de Necrose Tumoral- α
VEGF -	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	22
2.2 TOXINAS URÊMICAS.....	26
2.3 LESÃO CELULAR E DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	28
2.4 CITOCINAS E QUIMIOCINAS.....	35
2.5 SDF-1/CXCL12 E IL-8.....	38
2.6 CXCL12 E A DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	42
3. JUSTIFICATIVA	44
4. OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL.....	47
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
5. MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1 MATERIAL	49
5.1.1 PACIENTES E CONTROLES.....	49
5.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	49
5.1.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	50
5.1.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS.....	50
5.1.5 PREPARO DE POOLS.....	50
5.1.6 CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DE VEIA DE CORDÃO UMBILICAL (HUVECs).....	51
5.2 MÉTODOS	51
5.2.1 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	51
5.2.1.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA-C-REATIVA DE ALTA SENSIBILIDADE (hsPCR).....	51
5.2.1.2 DOSAGEM DE CXCL12, IL-6 E IL-8.....	51
5.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	52

5.3.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS HUVECS.....	52
5.3.2 CULTURA DE HUVECS COM SORO URÊMICO E NORMAL.....	52
5.3.3 DOSAGEM DE CXCL12.....	53
5.3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO AZUL DE TRYPAN.....	53
5.3.5 ENSAIO DE MTT (3-[4,5-DIMETIAZOL-2YL]-2,5-DIFENILTETRAZOLIUM BROMIDE).....	53
5.3.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	54
5.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
6. RESULTADOS.....	56
6.1 RESULTADOS <i>IN VIVO</i>.....	57
6.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	57
6.1.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS IL-6 E PCR EM AMOSTRAS DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE.....	58
6.1.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DAS QUIMIOCINAS IL-8 E CXCL12 EM AMOSTRAS DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE.....	59
6.2 RESULTADOS <i>IN VITRO</i>.....	59
6.2.1 CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	59
6.2.2 VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DO MTT.....	61
6.2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO AZUL DE TRYPAN.....	61
6.2.4 EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DA QUIMIOCINA CXCL12 EM CÉLULAS TRATADAS COM PLASMA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PACIENTES EM HEMODIÁLISE.....	62
6.2.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE HUVECS TRATADAS COM PLASMA SAUDÁVEL (PS) E PLASMA URÊMICO (HD).....	64
7. DISCUSSÃO.....	66
8. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS.....	86

ANEXO I.....	87
ANEXO II.....	88

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela diminuição lenta e progressiva da função renal, por um período igual ou superior a três meses, mensurada pela taxa de filtração glomerular (TFG) no sangue. Atualmente atinge mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo e no Brasil existem mais de 2 milhões de portadores de algum grau de disfunção renal, dos quais, segundo estimativas da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), 60% não sabem que têm o problema, pois a doença não apresenta sintomatologia específica a não ser em fases muito avançadas. Nos casos mais graves, a lesão nos rins pode exigir a substituição da função renal por diálise ou transplante e até mesmo a morte, sendo que apenas 33% dos pacientes com DRC recebem tratamento adequado para a doença no Brasil (Sesso Rde et al. 2010). O prognóstico da doença renal terminal sem tratamento é pobre. A maioria das pessoas com doença renal crônica, em estágios de substituição renal, eventualmente, morrem de complicações de doenças cardiovasculares, infecções ou, se a diálise não é fornecida, uremia progressiva (hipercalcemia, acidose, a desnutrição, o funcionamento mental alterado) (Abbasi et al. 2010).

Em pacientes com DRC um estado de inflamação crônica de baixo grau e persistente é frequentemente observado, desta forma é desencadeada uma tentativa pelo organismo, de mecanismos protetores a fim de minimizar os efeitos lesivos do acúmulo de toxinas urêmicas (representadas por uma série de compostos orgânicos e peptídeos), bem como iniciando o processo de cura tecidual. A inflamação crônica é caracterizada pelo efeito persistente de um estímulo causador, o que leva à destruição de células e tecidos e tem efeitos deletérios para o organismo. Na DRC, especialmente na doença renal terminal, as concentrações sistêmicas de citocinas pró e anti-inflamatórias são elevadas, como resultado do aumento da produção e diminuição da depuração renal (Vanholder et al. 2003; Carrero e Stenvinkel 2009). Em virtude da inflamação persistente, a disfunção endotelial é um evento comumente descrito em indivíduos em diferentes estágios de doenças renais, na tentativa de promover a regeneração vascular endotelial (Becher et al. 2010).

Alguns estudos sugerem que o mecanismo de reparo e regeneração do endotélio seja alterado devido a uremia, diminuindo a capacidade migratória de

células endoteliais progenitoras (EPC) (Jie et al. 2010) correlacionando-se negativamente com o número de micro partículas endoteliais presente na circulação sanguínea. Em busca do reparo causado pela uremia, o organismo inicia uma cascata de sinalização, ativando marcadores de inflamação de fase aguda tais como, Proteína-C-Reativa (PCR), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α); moléculas de adesão tais como, Molécula de Adesão Vascular Solúvel-1 (sVCAM-1), Molécula de Adesão Intercelular Solúvel-1 (sICAM-1); e quimiocinas tais como, Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (MCP-1), Interleucina-8 (IL-8) (Paulus et al. 2011) e a quimiocina SDF-1 α , atualmente conhecida como CXCL12 (Noh et al. 2011).

Quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular que atuam na sinalização de eventos intravasculares, tais como processos pró-inflamatórios, fazendo a quimioatração celular, ativação de células envolvidas na resposta imune, angiogênese, regeneração tecidual e desenvolvimento do câncer (Karin 2010). A quimiocina CXCL12 tem ação pleiotrópica, por isso age em diversos tecidos de formas peculiares, como por exemplo, estimulando a produção de linfócitos T/B e monócitos (Barbieri et al. 2007), desempenhando papéis importantes na patofisiologia de processos como inflamação, angiogênese, cicatrização e agregação plaquetária (Abi-Younes et al. 2000; Bonavia et al. 2003; Apostolakis et al. 2006; Karin 2010).

Na DRC Zaza et al. (2008) demonstraram que a CXCL12 pode estar aumentada. Neste estudo os genes *MIF* (Fator Inibitório de Migração de Macrófagos), *IL-8RB* (Interleucina 8 receptor beta) e *CXCL12* foram independentemente associados com inflamação, e os genes *CXCL12* e *IL-8RB* foram inversamente correlacionados à PCR. Ainda, estudos desenvolvidos por Jie et al. (2010), demonstraram um aumento desta quimiocina em amostras plasmáticas de pacientes com DRC em fase pré-dialítica, quando comparadas as amostras controle. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi demonstrar o efeito da toxicidade urêmica na expressão de CXCL12 através de uma combinação de modelos *in vivo* e *in vitro*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Os rins (FIGURA 1) são constituídos de unidades denominadas néfrons, que permitem a filtração do plasma sanguíneo removendo resíduos tóxicos do sangue sob a forma de urina. A urina formada passa pelos ureteres e é então conduzida para a bexiga onde é direcionada à uretra para ser expelida (Jupp et al. 2011). Cada néfron possui uma cápsula, denominada cápsula de *Bowman*, que se liga a arteríola eferente e se conecta a um emaranhado de vasos capilares denominados glomérulo de *Malpighi*. Para que o processo de filtração glomerular ocorra, o sangue é conduzido sob forte pressão ao interior dos capilares do glomérulo de *Malpighi*, onde um quinto de seu volume é extravasado para a cápsula de *Bowman*, sendo chamado posteriormente de filtrado (Brenner e Humes 1977).

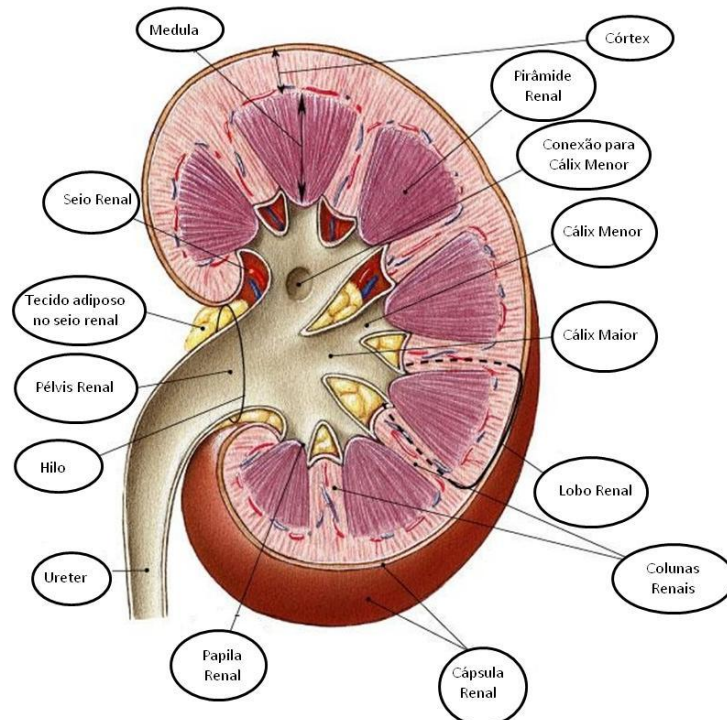


FIGURA 1 – ANATOMIA RENAL
FONTE: ADAPTADO DE *SCIENCE AND TECHNOLOGY*

Cerca de 120 mililitros de sangue são filtrados por minuto, correspondendo a 7 litros de filtrado por hora. O líquido filtrado penetra no espaço de *Bowman* e passa

pelo contornado proximal. Na primeira parte desse tubo é absorvida a maior parte do sódio, água, glicose e outras substâncias filtradas, as quais voltam a integrar o sangue. À medida que o líquido passa através da alça de *Henle*, o sódio e outros eletrólitos são bombeados para o interior do rim deixando o líquido inicial cada vez mais diluído. Este líquido passa através de um tubo denominado tubo contornado distal, onde se bombeia mais sódio para dentro, em troca de potássio, que passa para o interior do tubo. O líquido que sai de vários néfrons é conduzido a um tubo chamado coletor, que segue do rim sob a forma de urina diluída, ou ainda, a maior parte desta água pode ser absorvida e devolvida ao sangue, fazendo com que a urina seja mais concentrada. A concentração de urina é mantida de acordo com as necessidades de água do organismo, que é feita através da liberação de hormônios específicos tais como renina, angiotensina II, aldosterona, hormônio antidiurético, paratormônio (Brenner e Humes 1977).

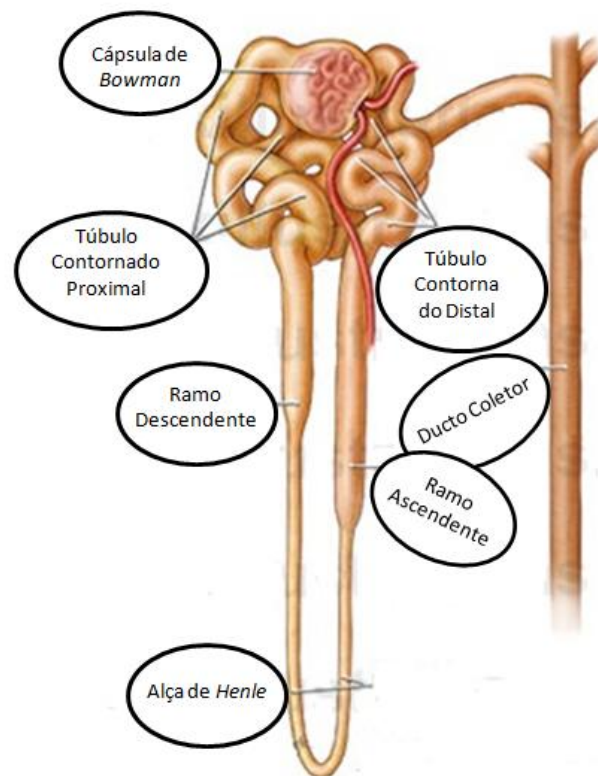


FIGURA 2 – ANATOMIA DE UM NÉFRON

FONTE: ADAPTADO DE MK ILLUSTRATIONS

Uma lesão nos rins gera uma doença renal identificada de acordo com características histológicas e laboratoriais. Uma lesão por tempo igual ou superior a três meses, inicialmente qualificada pela presença de albuminúria ou proteinúria, caracteriza a DRC. Para confirmação da cronicidade, uma estimativa da função

renal é feita através de vários testes em busca da avaliação da TFG, e então o paciente é direcionado ao tratamento de acordo com o estágio em que se encontra da doença (K/DOQI 2002; Montanes Bermudez et al. 2011). Os testes realizados para avaliação da TFG podem ser calculados pela fórmula de *Cockcroft-Gault* (CGF) com base nos níveis séricos de creatinina, idade e sexo, assim como pela fórmula da Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD) que é baseado nos níveis de nitrogênio uréico sérico, níveis séricos de creatinina e albumina, idade, raça, sexo, além dos métodos mais utilizados clinicamente, como albuminúria persistente e depuração da creatinina na excreção de urina de 24 horas (Bastos e Kirsztajn 2011). Com base nos cálculos da TFG e nos fatores de risco apresentados pelo paciente com lesão renal, a DRC pode ser classificada em estágios que variam de 1 a 5 conforme apresentado no QUADRO 1 (K/DOQI 2002).

Estágios da DRC	TFG (mL/min/1.73m ²)	Descrição
1	≥90	Lesão Renal
2	60-89	Lesão Renal
3	30-59	Diminuição Moderada TFG
4	15-29	Diminuição Severa TFG
5	<15 ou Diálise	Insuficiência Renal

QUADRO 1- ESTÁGIOS DE DOENÇA RENAL CRÔNICA
FONTE: ADAPTADO DE CHEN E HSU (2003)

A diminuição ou ausência da função renal, tem como consequência uma série de alterações tais como: a retenção de líquidos (sobrecarga de volume extracelular), anemia, distúrbios do metabolismo ósseo e mineral, dislipidemia e desnutrição protéico-energética. A retenção de líquidos em pessoas com DRC em estágio de substituição renal, contribui significativamente para a hipertensão, disfunção ventricular e excesso de eventos cardiovasculares observadas nesta população. Além disso, o paciente com doença renal crônica é acometido de quadros de anemia, que em geral é normocítica e normocrômica e é mais comumente atribuída à síntese de eritropoietina reduzida pelos rins afetados. Fatores adicionais que contribuem para a anemia por deficiência de ferro incluem a flebotomia frequente, a retenção de sangue no dialisador e da tubagem, sangramento gastrointestinal, hiperparatireoidismo secundário grave, condições inflamatórias agudas e crônicas (por exemplo, infecção) e tempo de vida diminuído de células vermelhas do sangue. Distúrbios do metabolismo ósseo e mineral, como o hiperparatireoidismo,

hiperfosfatemia e hipo ou hipercalcemia são comuns em pessoas com doença renal. Se não tratados estes distúrbios podem causar dor, anemia, prurido, perda óssea e risco de fratura aumentado, contribuindo com a hipertensão e DCV (Abbasi et al. 2010).

Dados do Censo Brasileiro de Diálise revelam que em 2010 havia 92.091 pacientes em diálise no Brasil, sendo que destes 57% eram homens e 85,8% do total apresentavam-se em tratamento dialítico com atendimento pelo sistema único de saúde (SUS). Estima-se ainda que dentre a população brasileira, 2,9 milhões de brasileiros, tenham um terço ou menos da TFG que indivíduos normais. Pacientes hipertensos, diabéticos ou com história familiar de DRC, têm maior risco em desenvolver a doença, sendo que a incidência da DRC em hipertensos está em torno de 156 casos por milhão em homens com idade entre 35 e 57 anos. Para os pacientes diabéticos mais especificamente, o risco de desenvolver a DRC é cerca de 30% maior para diabetes do tipo 1 e 20% para o tipo 2 (Sesso Rde et al. 2011). Levando-se em conta que a quantidade de pessoas que tiveram diabetes em 2007 foi de 246 milhões em todo o mundo, a perspectiva de aumento será para 333 milhões em 2025 (Mbanya et al. 2006; Yamagishi e Matsui 2011), o número de pacientes com DRC tende a aumentar e, conseqüentemente gerar um acréscimo aos gastos públicos para tratamento das doenças renais (Dor et al. 2007). Sendo assim, a DRC mostra-se uma patologia de interesse médico em termos financeiros aos órgãos públicos e privados, na busca pela evolução no diagnóstico, prognóstico e tratamento desta patologia.

Em Framingham, uma cidade no estado de Massachusetts, nos Estados Unidos, há mais de 60 anos foi realizado um estudo em que inicialmente 5.209 indivíduos, com idade entre 30 e 60 anos, foram recrutados para uma avaliação clínica e laboratorial extensiva. Daí em diante a cada 2-4 anos esta população e suas gerações descendentes, é avaliada observando-se os fatores de risco e (NHLBI 1948) conseqüente desenvolvimento de diversas doenças. Desde então os fatores de risco clássicos, também chamados de fatores de *Framingham*, podem ser aplicados ao surgimento de DRC, tais como idade, estilo de vida, hipertrofia ventricular esquerda (Stenvinkel et al. 2008), obesidade, hipertensão, dislipidemia, diabetes *mellitus* e tabagismo (Stenvinkel et al. 2008; Leinig et al. 2011).

No entanto alguns fatores não clássicos têm sido intensamente pesquisados, como: disfunção endotelial, super ativação simpática, perda da massa muscular,

calcificação vascular (Stenvinkel et al. 2008), inflamação crônica (Stenvinkel et al. 2007; Kovesdy e Kalantar-Zadeh 2009), estresse oxidativo e hiperhomocisteinemia (Stenvinkel et al. 2007).

Além dos fatores clássicos e não clássicos, existem ainda síndromes que estão relacionadas ao desenvolvimento da doença renal, como a síndrome metabólica (Suliman e Stenvinkel 2008; Ruan e Guan 2009) e fatores relacionados à diálise como o estresse causado por alterações hemodinâmicas intra e inter dialítico a bio-incompatibilidade do capilar, a impureza do dialisado e mudanças nas concentrações séricas de eletrólitos (Stenvinkel et al. 2003).

A presença e persistência de albuminúria e proteinúria identificam um grupo de pacientes com maior risco de progressão da DRC e maior risco de DCV (Montanes Bermudez et al. 2011). Essas alterações no sistema metabólico afetam a homeostasia, desde minerais até as células, causando assim uma alta taxa de mortalidade superando os dados de morte por indivíduos que apresentem tumores malignos metastáticos (Stenvinkel et al. 2007; Kovesdy e Kalantar-Zadeh 2009; Goldsmith et al. 2010). Isso porque, devido ao prognóstico da DRC, a terapia de substituição renal por transplante, hemodiálise (HD) ou diálise peritoneal (DP) é uma prática comum em indivíduos em estágio 5 da DRC (Chen e Hsu 2003). Durante a diálise a interação de células mononucleares do sangue periférico com a membrana dialítica provoca a ativação e aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias, intensificando o processo de cronicidade inflamatória, característica permanente em pacientes dialíticos (Zaoui e Hakim 1994; Abbasi et al. 2010).

2.2 TOXINAS URÊMICAS

Solutos de retenção urêmica ou toxinas urêmicas são compostos biologicamente ativos, que em indivíduos sob condições normais são excretados pelo rim saudável. Esses compostos são classificados em três grupos com base no comportamento do soluto durante a diálise: toxinas solúveis em água com baixo peso molecular, toxinas de tamanho médio e toxinas ligadas à proteína (Vanholder et al. 2003; Vanholder et al. 2008; Glorieux e Vanholder 2011).

Compostos solúveis em água são mais fáceis de serem eliminados, já que estas moléculas são removidas durante a diálise. Entretanto moléculas ligadas a proteínas são de difícil remoção, uma vez que estas exigem estratégias mais elaboradas para eliminação (Vanholder et al. 2008; Glorieux e Vanholder 2011). O acúmulo de toxinas urêmicas apresenta um número indefinido de modificações resultado da oxidação, glicação, eventos cisteínicos, bem como vários outros processos químicos que exercem um impacto fisiológico deletério, diferenciando as moléculas a partir do composto mãe, dificultando o mapeamento da retenção de solutos (Glorieux e Vanholder 2011).

Moléculas classificadas como médias e ligadas a proteínas foram identificadas como algumas das principais toxinas envolvidas na lesão vascular afetando células endoteliais, leucócitos, plaquetas e células do músculo liso na DRC (Glorieux e Vanholder 2011). Alguns exemplos de toxinas que se encaixam nesta classificação são: 2-Metoxiresorcinol, 3-Deoxiglucosona, Ácido Hipúrico, Ácido Quinólico, Ácido Quinurênico, Espermidina, Espermina, Fenol, Fructoselisina, Glioxal, Hidroquinona, Homocisteína (Hcy), Indol-3-Acetato, Indoxil sulfato (IS), Melatonina, Metilglioxal, N^ε-Carboximetilisina, para-Cresol, Pentosidina, Dimetilglicina, Adrenomedulina, Peptídeo natriurético atrial, β2-microglobulina, β-endorfina, β-lipotropina, Endotelina, Hormônio da paratireóide, Interleucina-1β (IL-1β), IL-6 e TNF-α (Vanholder et al. 2008).

Recentemente maior atenção tem sido dada para toxinas específicas como, por exemplo, a Homocisteína uma molécula considerada de difícil excreção, já que esta se encontra ligada a proteína no organismo e em pacientes com DRC está de 2 a 3 vezes mais aumentada que em indivíduos normais. O aumento pode induzir a disfunção endotelial associada a DCV, verificada pelo aumento de células endoteliais circulantes, indicando lesão endotelial. Essa toxina urêmica, Hcy, induz à formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), podendo alterar funções relacionadas à coagulação do vaso, resultando em aumento da trombogenicidade. A Hcy induz também o aumento de Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) e seus receptores (RAGEs). Outras duas toxinas urêmicas que tem despertado interesse dos estudiosos são as moléculas ligadas a proteínas IS e o p-cresilsulfato (PCS), derivado do para-Cresol. As conseqüências fisiológicas do acúmulo destas e outras toxinas no endotélio estão apresentados no QUADRO 2 (Glorieux e Vanholder 2011).

Efeitos no Endotélio	Toxina Urêmica Envolvida	Autor
Estresse Oxidativo	ADMA Homocisteína	(Scalera et al. 2004) (Ungvari et al. 2003; Tyag, et al. 2005) (Wautier et al. 2001) (Dou et al. 2007)
Comprometimento da Síntese/Biodisponibilidade de NO	AGES IS ADMA Homocisteína	(Vallance et al. 1992; Bogerr et al. 2000; Dayoub et al. 2003) (Ungvari et al. 2003; Lentz 2005; Tyagi et al. 2005)
Citocinas pró-Inflamatórias em Células Endoteliais	ADMA Homocisteína AGES IS	(Boger et al. 2000; Chan et al. 2000) (Wang et al. 1997; Poddar et al. 2001) (Wautier et al. 1996; Sengoelge et al. 1998) (Tumur et al. 2010)
Aumento da Liberação de Micropartículas Endoteliais Inibição da capacidade de reparo em células endoteliais maduras	p-cresil sulfato IS ADMA IS	(Meijers et al. 2009) (Faure et al. 2006) (Thum et al. 2005) (Dou et al. 2007)
Comprometimento da sobrevivência, função e diferenciação de células progenitoras endoteliais	AGES Ácidos Indol Acéticos Homocisteína	(Chen et al. 2009; Sun et al. 2009) (Jourde-Chiche et al. 2009) (Chen et al. 2004)

QUADRO 2 – EFEITOS DE TOXINAS URÊMICAS *IN VITRO* SOBRE CÉLULAS ENDOTELIAIS MADURAS E PROGENITORAS

FONTE: ADAPTADO DE JOURDE-CHICHE ET AL. (2011)

NOTA: ADMA- DIMETILARGININA ASSIMÉTRICA; AGES- PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA; IS- INDOXIL SULFATO;

Os efeitos das toxinas diferem devido à diferença da natureza da ligação à proteína, covalente para toxinas tais como a Hcy e AGES, e não covalente para IS e PCS. Além disso, a reversibilidade ou irreversibilidade da ligação a proteína pode ter um impacto sobre a eliminação destas toxinas, podendo indicar que a ligação com a albumina possa conferir toxicidade ao complexo albumina-soluto. Por este motivo a exposição do endotélio a algumas destas toxinas tem sido amplamente estudada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Jourde-Chiche et al. 2011).

2.3 LESÃO CELULAR E DOENÇA RENAL CRÔNICA

A inflamação consiste de uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares, leucócitos e matriz extracelular aos estímulos nocivos, tais como patógenos, células danificadas ou toxinas, sendo considerada uma tentativa de proteção do organismo em resposta aos estímulos lesivos, a fim de iniciar o processo de reparo ao tecido (Carrero e Stenvinkel 2009). Os vasos são sensibilizados aumentando o fluxo sanguíneo, e assim iniciam um processo de migração e ativação de células e diversas reações sistêmicas. As principais células envolvidas neste processo de proteção são neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e mastócitos. As reações vasculares e celulares da inflamação aguda e crônica são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas (Wesoly et al. 2010).

A histamina e a serotonina são os primeiros mediadores a serem liberados na inflamação aguda, sendo a histamina liberada pelos mastócitos, agindo na dilatação das arteríolas permitindo um aumento da permeabilidade vascular. A serotonina é liberada pelas plaquetas durante a agregação plaquetária e tem ação semelhante a histamina (van Hinsbergh e van Nieuw Amerongen 2002). Além da histamina e serotonina, existem também os mediadores provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (AA), e ainda outros como as citocinas, que participam ativamente na inflamação estimulando a produção de precursores na medula óssea, sinalizando para o aumento na produção de leucócitos e ativação endotelial, entre tantas outras funções (Johnston e Butcher 2002). Embora a liberação de citocinas pró-inflamatórias tenha efeitos benéficos a curto prazo, a longo prazo pode produzir efeitos deletérios (Carrero e Stenvinkel 2009), já que estas agem de forma a induzir ou inibir a expressão de diversas outras citocinas dose-dependente e pela interação com outras moléculas no ambiente em que se encontram (Kinnaird et al. 2004).

Vários marcadores inflamatórios tem sido amplamente estudados, entre eles a PCR, que tem sido, desde sua descoberta, utilizada como um marcador de inflamação de fase aguda (Ballou e Kushner 1992). A PCR é produzida pelo fígado, tem tempo de vida curto, entre 6 e 8 horas e é produzida em altos níveis (até 1000 vezes além do valor normal) (Pepys e Baltz 1983; Arici e Walls 2001), não sendo alterada por idade, funções hepáticas, renais ou fármacos (Jensen 2000). Na prática clínica a PCR foi determinada como o protótipo de marcador de inflamação,

resultado de sua confiabilidade, baixo custo e disponibilidade. No entanto, a PCR reflete inflamação sistêmica e prevê o risco cardiovascular, porém não promove doença vascular (Carrero e Stenvinkel 2009).

A IL-6, uma glicoproteína de 26-kDa, apresenta diversas funções em diferentes células e tecidos no organismo (Waiser et al. 1997), entre elas a regulação da diferenciação final de células B em células produtoras de anticorpos, indução de produção de proteína de fase aguda produzida pelo fígado (Kishimoto 1989) e produção de fibrinogênio (Zoccali et al. 2004). Além da PCR e IL-6, o TNF- α , um heterodímero biologicamente ativo em todas suas formas, é uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas atuando de forma regulatória na reação de fase aguda, além de ser um marcador de disfunção endotelial (Feng et al. 2011). Assim como outras citocinas, o TNF- α em altas concentrações deixa de ser um marcador de inflamação e disfunção endotelial, para ser um agente agressor ao tecido durante o processo inflamatório, causando morte celular por apoptose e proliferação celular desregulada (Hehlhans e Pfeffer 2005; Wallis 2008).

Muitos marcadores de inflamação e de risco cardiovascular estão constantemente aumentados na DRC. Por este fato, as pesquisas desses marcadores na DRC fizeram que muitos deles apresentem suas funções bem estabelecidas nesta patologia, como os clássicos: PCR, IL-6, TNF- α que recentemente têm sido correlacionados a moléculas de adesão tais como VCAM-1, ICAM-1 e citocinas como a MCP-1 e a IL-8 (Stenvinkel et al. 2000; Kusano et al. 2004; Suliman et al. 2006; Addabbo et al. 2007; Stinghen et al. 2009). Entretanto, o papel destas citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão na progressão da DRC associadas à inflamação vascular, não está bem elucidado, sendo que alguns fatores podem ser casualmente relacionados às reações adversas e outros que podem ser meros marcadores de subjacentes complexos fisiopatológicos (Kovesdy e Kalantar-Zadeh 2009; Manabe 2011).

Desta forma, a redução da função renal muito provavelmente, está associada ao aumento da resposta inflamatória (Kusano et al. 2004), gerada pelo aumento do estresse oxidativo (Wesoly et al. 2010), comum tanto em insuficiência renal leve (Shlipak et al. 2003), como em estados avançados de DRC na fase pré-dialítica (Pecoits-Filho et al. 2003). O paciente com DRC apresenta níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, indicando assim uma associação entre DRC e síndrome metabólica. A interação patofisiológica entre rim e coração leva a

síndrome cardiorenal e subsequente lesões vasculares, gerando assim danos cardíacos seguido de DCV (Stenvinkel et al. 2007; Martins 2010; Sheen e Sheu 2011), que é a principal causa de morte prematura em indivíduos com DRC (Martins 2010; Stinghen e Pecoits-Filho 2011). Sendo a DCV a principal causa de morte em pacientes com DRC, vários marcadores têm sido pesquisados, incluindo marcadores de disfunção endotelial (Checherita et al. 2011).

A disfunção endotelial é uma consequência comumente descrita em indivíduos em diferentes tipos e fases de doença renal, já que a inflamação, um evento proveniente da uremia, é catalisador na modulação de doenças vasculares, por converter o endotélio a uma superfície pró-inflamatória e pró-coagulante, tornando a vasculatura mais vulnerável aos efeitos de outros fatores de risco (Carrero e Stenvinkel 2009). A partir da lesão iniciada pelo acúmulo das toxinas urêmicas o organismo inicia uma cascata de sinalização, com o aumento de diversas citocinas buscando promover a regeneração vascular endotelial (Becher et al. 2010). Desta forma, tem aumentado a busca pelo entendimento da ação de certas citocinas e quimiocinas como marcadores de lesão e consequente regeneração vascular proveniente do principal “agente agressor” no indivíduo com DRC, o acúmulo de toxinas urêmicas (Serradell et al. 2003; Jie et al. 2010; Jourde-Chiche et al. 2011).

O endotélio é constituído por uma camada única de células, com populações heterogêneas determinadas pela origem embriogênica e fatores ambientais locais. Está localizado na camada íntima dos vasos sanguíneos, sendo o maior órgão do corpo humano pesando aproximadamente 1 kg, e tem sido foco de estudo há décadas (Cines et al. 1998; Malyszko 2010). Está envolvido na manutenção do tônus vascular e resposta à isquemia, função plaquetária, coagulação e fibrinólise, inflamação, resposta imune e na proliferação de células musculares lisas (Martin e Anderson 2009), se destacando pela capacidade contínua de reparo e regeneração celular (Werner e Nickenig 2006). As células endoteliais quando em estado quiescente têm um fenótipo vasodilatador, anticoagulante e antiaderente, enquanto que as células endoteliais ativadas expressam propriedades vasoconstritoras, pró-coagulante e pró-aderente. Sua função direcionada à vasodilatação é dependente de óxido nítrico (NO) ao menor grau de prostaciclina no endotélio, derivada de diferentes fatores hiperpolarizantes, como o peptídeo natriurético tipo C. Apesar de também produzir diversas substâncias vasoconstritoras incluindo tromboxano A₂,

endotelinas, angiotensina II e espécies reativas de oxigênio (ROS), além de moduladores da inflamação incluindo moléculas de adesão como tais como: ICAM-1, VCAM-1 e fator nuclear KB (NF-KB) (Malyszko 2010).

Na uremia a camada endotelial é a primeira a ser lesionada, por estar em contato direto com as toxinas urêmicas, causando disfunção endotelial e gerando aumento na permeabilidade endotelial (Nanayakkara e Gaillard 2010; Jourde-Chiche et al. 2011), tornando os tecidos adjacentes suscetíveis a lesões e formação de placas ateroscleróticas pela estimulação de mediadores de diferenciação osteoblásticas e ativa mineralização do músculo liso (Checherita et al. 2011). A uremia, apesar de gerar dano vascular (principalmente endotelial) estimula respostas como a produção de células endoteliais progenitoras (EPCs) na tentativa de regeneração do vaso (Feng, et al. 2011). Em contrapartida a este evento, fatores que induzem a aterogênese induzem a disfunção endotelial e morte (Becher et al. 2010), tornando este um ciclo vicioso.

A mobilização de células-tronco progenitoras é um processo de várias etapas organizadas, iniciado a partir da lesão ou inflamação tecidual que libera várias moléculas de sinalização como citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas no processo de defesa do hospedeiro e reparação de órgãos (Lapidot et al. 2005). A ação endotelial envolvida no reparo apresenta dois mecanismos ligados, a proliferação clássica de células endoteliais adjacentes e o descrito mais recentemente, o recrutamento de EPCs mobilizadas da medula óssea em resposta à citocinas, isquemia ou leucócitos circulantes (Urbich e Dimmeler 2004; Werner e Nickenig 2006), conforme apresentado na FIGURA 3.

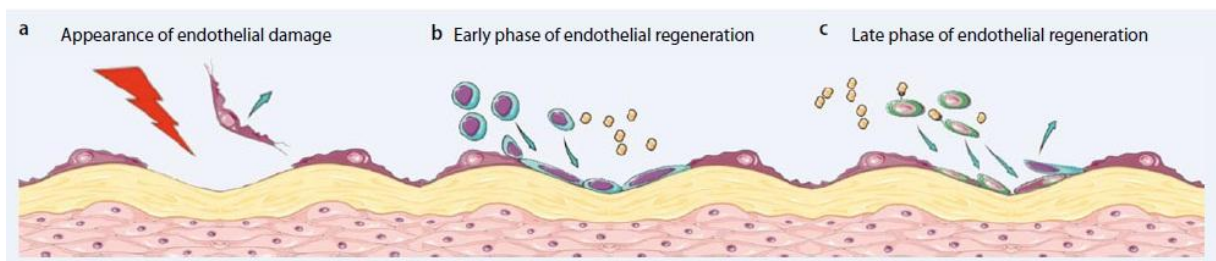


FIGURA 3- REGENERAÇÃO ENDOTELIAL

FONTE: BECHER ET AL. (2010)

NOTA: NA FASE INICIAL DA RECUPERAÇÃO ENDOTELIAL AS CÉLULAS ENDOTELIAIS ADEREM AOS LOCAIS DE LESÃO. DE FORMA PARÁCRINA ESSES MARCADORES PODEM AJUDAR NA PROLIFERAÇÃO E ADESÃO DE EPC DURANTE A FASE FINAL DE RECUPERAÇÃO, O QUE FINALMENTE LEVA A UMA RESTAURAÇÃO DO REVESTIMENTO ENDOTELIAL.

A disfunção endotelial provém da diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), que depende, em parte, da sua interação com ROS, principalmente o ânion superóxido (O_2^{\bullet}), bem como sua interação com outras moléculas capazes de interferir na sua produção (Kharait et al. 2011), gerando assim consequências no funcionamento da permeabilidade endotelial (Nanayakkara e Gaillard 2010). Essa biodisponibilidade pode ser alterada pelas próprias células endoteliais que geram radicais livres em sua membrana, inativando o NO (Cines et al. 1998). Mecanismos que medeiam este comprometimento são muito complexos, já que envolvem toda a via de sinalização para a ativação das enzimas que sintetizam o NO, a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a enzima óxido nítrico induzível (iNOS) (Nanayakkara e Gaillard 2010). Entretanto estudos mostram a veracidade da influência da biodisponibilidade do NO na regeneração vascular quando simulam a inibição e disponibilidade de NO neste evento, bem como as vias de sinalização (Kharait et al. 2011).

A presença da uremia no paciente proporciona um ambiente repleto de ativadores e inibidores (Faraci 2003; Vanholder et al. 2008) das vias de sinalização para ativação e/ou produção de NO, tanto vascular quanto no próprio rim. Isso porque o NO-mensageiro é sintetizado fisiologicamente nos rins, exercendo importantes funções de homeostase e excreção renal (Bachmann e Mundel 1994). O bloqueio na produção do NO-mensageiro leva a consequências fisiológicas tais como diminuição da irrigação renal e diminuição na excreção de sódio, influenciando a ativação do sistema renina-angiotensina, ativação inflamatória entre outros eventos desencadeados pela alteração da biodisponibilidade de NO (Feng et al. 2011). Ainda, na glomerulonefrite aguda ocorre uma produção exagerada de NO devido à indução da iNOS, expressa a partir de macrófagos nos glomérulos (Bachmann e Mundel 1994) com infiltração leucocitária e aumento da permeabilidade vascular com conseqüente proteinúria (Bachmann et al. 1995).

O NO, assim como diversas quimiocinas, age de forma pleiotrópica, exercendo diferentes funções em diferentes tecidos, podendo agir tanto de forma benéfica quanto deletéria ao organismo (Yamagishi e Matsui 2011). É um radical produzido pela eNOS dentro de células endoteliais, mantendo as funções fisiológicas vasculares normais (Suwannaprapha et al. 2005), regulando a migração de células endoteliais, a proliferação, germinação ou formação do vaso, bem como a apoptose (Kharait et al. 2011). É produzido também pela enzima iNOS, com ações

pró-inflamatórias e lesões teciduais (Colasanti e Suzuki 2000; Mariotto et al. 2004; Yamagishi e Matsui 2011). Conforme o local e intensidade de produção de NO, algumas respostas fisiológicas são acentuadas tais como, a diminuição da produção de biomarcadores inflamatórios tais como: IL-6, E-Selectina, ICAM-1, VCAM-1 e IL-8 (De Caterina et al. 1995) inibindo a reação inflamatória proliferativa em células da parede vascular, assim como exercendo propriedades anti-trombogênicas em células endoteliais, o que poderia potencialmente ser explorada como uma opção terapêutica para o tratamento de complicações vasculares em diversas patologias (Yamagishi e Matsui 2011).

A disfunção endotelial é um evento comumente descrito na falência renal, seja ela aguda ou crônica, assim como em estágio final de doença renal, principalmente em indivíduos submetidos a processo dialítico (Wesoly et al. 2010). Essa disfunção gera modificações no fenótipo celular, fazendo com que as células endoteliais respondam com o aumento na produção de moléculas pró-inflamatórias (Diaz-Buxo e Woods 2006; Segal et al. 2006; Jourde-Chiche et al. 2009; Stinghen et al. 2009). Pacientes portadores de DRC apresentam vasodilatação anormal do endotélio devido à diminuição na produção de NO, sendo esta uma das muitas consequências do estresse oxidativo (Jourde-Chiche et al.), evento este que ocorre por estes pacientes apresentarem um desbalanço entre a atividade oxidante e capacidade antioxidante (Kao et al. 2010). Além da alteração na produção de moléculas inflamatórias, a uremia também induz a apoptose (Jourde-Chiche et al. 2009).

Na DRC o mecanismo de reparo e regeneração do endotélio é alterado devido a uremia, condição decorrente do acúmulo de toxinas urêmicas circulantes, gerando uma diminuição na capacidade migratória de EPC, responsáveis pela regeneração do vaso (de Groot et al. 2004; Vanholder et al. 2008; Sabatier et al. 2009; Jie et al. 2010). Toxinas como o indoxil sulfato (IS) tem apresentado correlação com a inibição da proliferação de células endoteliais (Kharait et al. 2011), bem como para-Cresol (Dou et al. 2004) e PCS (Glorieux e Vanholder 2011).

A presença de disfunção endotelial pode ser comprovada pela quantidade de micropartículas endoteliais, provenientes de apoptose celular, células endoteliais que se desprendem do vaso ou mesmo de plaquetas, monócitos e eritrócitos, presente na circulação (Vanholder et al. 2008). Isto é claro, além das quimiocinas mais bem elucidadas com a finalidade de marcadores de lesão endotelial e

consequente auxílio na regeneração tecidual, a IL-8 e a CXCL12 (Ghadge et al. 2010; Gossl, Modder et al. 2010).

2.4 CITOCINAS E QUIMIOCINAS

As quimiocinas são proteínas de pequena massa molecular (8-14 kDa) com elevada homologia, que tem como função atuar de forma seletiva e específica na quimioatração, adesão e ativação de leucócitos, além de atuarem em respostas imunes, doenças infecciosas, desenvolvimento de novos sistemas e órgãos, entre outros. São produzidas principalmente por monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Para induzirem a ativação celular, utilizam ligações específicas entre ligantes e receptores através da proteína-G transmembrana nas células-alvo (Apostolakis). Os receptores são expressos em várias populações de leucócitos e outros tipos de células, tais como endoteliais, epiteliais, neurônios, astrócitos e cardiomiócitos, indicando funções além da atividade imunológica (Ghadge et al. 2010). Durante as reações de sinalizações, uma quimiocina pode se ligar a vários receptores e um receptor pode ter várias quimiocinas ligantes, isto ocorre entre ligante e receptores pertencentes à mesma família (Ben-Baruch et al. 1995). Ligantes distintos que interagem com um mesmo receptor apresentam características diferentes, como por exemplo, afinidade pelo receptor, capacidade de ligação a glicosaminoglicanos, habilidade de induzir a dessensibilização do receptor, meia-vida e distribuição espacial (quimiocinas expressas em diferentes tecidos) (Colobran et al. 2007).

As quimiocinas homeostáticas são constitutivamente expressas em determinados tipos de células e tecidos, e desencadeiam um papel vital no desenvolvimento e manutenção destas. Já as quimiocinas inflamatórias não são constitutivamente expressas, mas induzíveis por estímulos inflamatórios, conforme apresentado no QUADRO 3 (Laurence 2006). A diferenciação das quimiocinas é feita de acordo com sua estrutura, pois possuem, no meio da molécula, ligações dissulfeto, que fazem ponte entre dois pares de cisteínas. Ainda, a classificação é definida por subfamílias, levando-se em conta o número de aminoácidos existentes no 1º e no 2º resíduo de cisteína, Família α ou CXC, 1 aminoácido, Família β ou CC,

nenhum aminoácido, Família δ ou CX3C, 3 aminoácidos, Família γ ou XC, 2 aminoácidos (Allen et al. 2007; Karin 2010).

Nome Atual	Nome Original	Secreção	Receptor (es)	Célula Alvo
CXC	CXC	CXC	CXC	CXC
CXCL1	MGSA, gro-a	Induzível	CXCR2	Células endoteliais, Granulócitos
CXCL2	MIP-2a, gro-b	Induzível	CXCR2	Células endoteliais, Granulócitos
CXCL3	MIP-2b, gro-g	Induzível	CXCR2	Células endoteliais, Granulócitos
CXCL4	PF4	Induzível	CXCR2	Células endoteliais, Fibroblastos, Granulócitos (fracamente)
CXCL6	GCP-2	Induzível	CXCR1, CXCR2	Células endoteliais, Granulócitos
CXCL7	NAP-2	Induzível	CXCR2	Células endoteliais, Granulócitos
CXCL8	IL-8	Induzível	CXCR1, CXCR2	Células endoteliais, Granulócitos
CXCL9	Mig	Induzível	CXCR3	Células endoteliais
CXCL10	IP-10	Induzível	CXCR3	Células endoteliais
CXCL12	SDF-1	Constitutiva	CXCR4, CXCR7	Células endoteliais
CXCL16	CXCL16	Ligada à Membrana	CXCR6	Linfócitos T
CC	CC	CC	CC	CC
CCL1	I-309	Induzível	CCR8	Monócitos, Linfócitos T
CCL2	MCP-1	Induzível	CCR2	Células endoteliais, Monócitos, Linfócitos T
CCL3	MIP-1a	Induzível	CCR1, CCR5	Monócitos, Linfócitos T
CCL4	MIP-1b	Induzível	CCR1	Monócitos, Linfócitos T
CCL5	RANTES	Induzível	CCR1, CCR3, CCR5	Eosinófilos, Basófilos, Monócitos, Linfócitos T
CCL7	MCP-3	Induzível	CCR1	Monócitos
CCL8	MCP-2	Induzível	CCR2	Células endoteliais, Monócitos e Linfócitos T
CCL11	Eotaxina	Induzível	CCR3	Eosinófilos
CCL19	MIP-3b	Constitutiva	CCR7	Células dendríticas maduras, Linfócitos T
CCL21	SLC	Constitutiva	CCR7	Células dendríticas maduras, Linfócitos T
CCL25	TECK	Constitutiva	CCR9, CCR11	Linfócitos T

C	C	C	C	C
XCL1	Linfotactina	Induzível	XCR1	Linfócitos T
XCL2	SCM-1 β	Induzível	XCR1	Linfócitos T
CX3C	CX3C	CX3C	CX3C	CX3C
CX3CL1	Fractalcina	Ligada à Membrana	XCR2	Células epiteliais, células nervosas

QUADRO 3- QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES

FONTE: ADAPTADO DE LAURENCE (2006)

As CC quimiocinas formam a maior subfamília de quimiocinas, contendo vinte e cinco ligantes identificados e dez receptores. Como por exemplo, a MCP-1, molécula protótipo da classe CC que faz a quimioatração de monócitos e tem como receptor a CCR2. São expressos em células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas. Tem sido correlacionada com marcadores de inflamação, estudada e apresentada como um mediador aterogênico, fundamentando um potencial biomarcador para desenvolvimento de drogas (Apostolakis et al. 2006).

A subfamília CXC é a segunda maior, subdividida em dois grupos, de acordo com a presença ou ausência do motivo glutamato-leucina-arginina (ELR) entre a região N-terminal e o primeiro resíduo de cisteína, descrito como importante na interação entre ligante e receptor em neutrófilos (Ma et al. 1999; Apostolakis et al. 2006) (FIGURA 4). Algumas quimiocinas pertencentes à família CXC, como a IL-8, está relacionada à lesão endotelial e à aterogênese, que juntamente com seus receptores CXCR1 e CXCR2, tem sido demonstrada expressa em placa aterosclerótica, atuante na proliferação e migração de células de músculo liso. As quimiocinas Proteína 10 induzível por Interferon (IP-10), T α -Quimioatraente Induzível por IFN- γ (I-TAC ou CXCL11) e Monocina induzível por IFN- γ (MIG ou CXCL9), foram definidas como expressas em diferentes níveis na placa aterosclerótica, com função de recrutamento e ativação de linfócitos T; e a CXCL12 que está envolvida em diversas ações tais como agregação plaquetária envolvida em doenças trombo oclusivas e formação da camada neointima após lesão vascular (Apostolakis et al. 2006; Apostolakis et al. 2009).

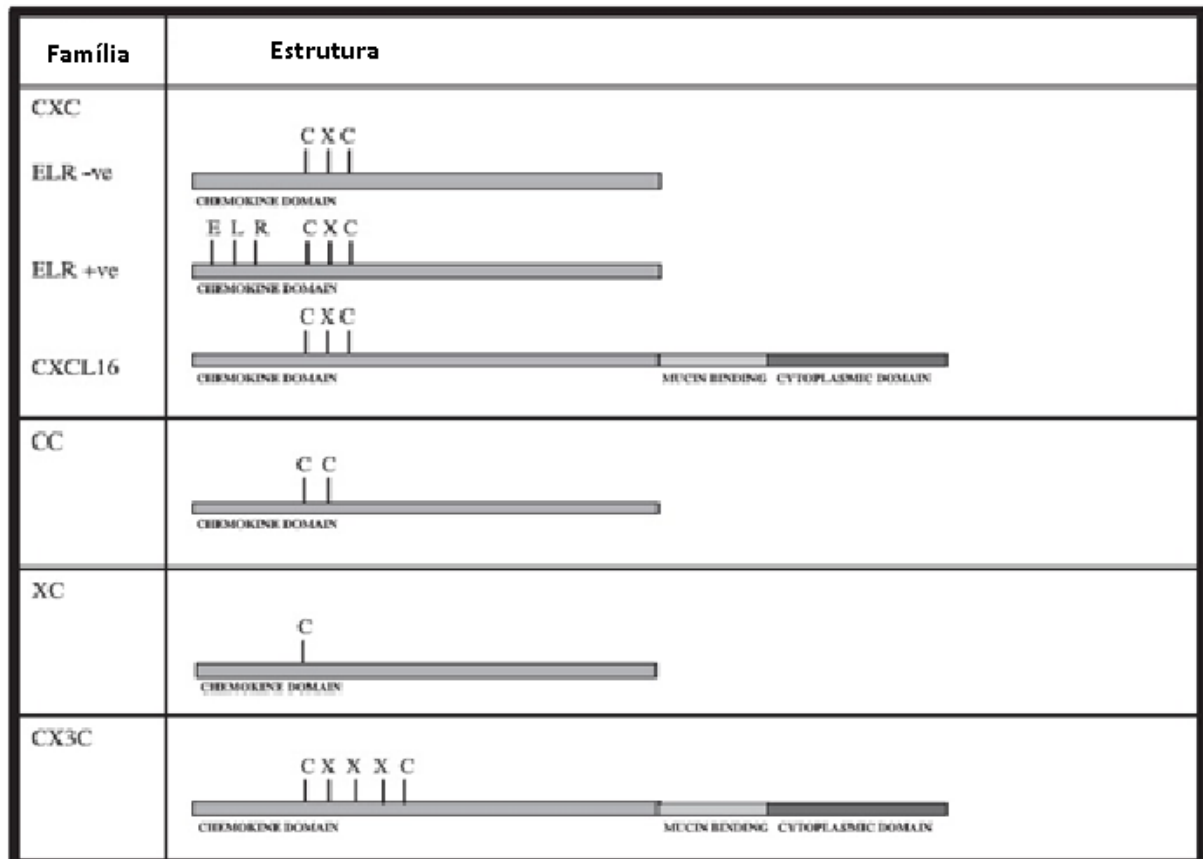


FIGURA 4- FAMÍLIAS DAS QUIMIOCINAS
FONTE: ADAPTADO DE LAURENCE (2006)

2.5 SDF-1/CXCL12 E IL-8

A SDF-1, conhecida como CXCL12, é uma quimiocina codificada pelo gene *CXCL12*, presente na região 10q11, localizado no braço longo do cromossomo 10, na posição q11.1 (Karin 2010; Unigene 2011) que foi isolada pela primeira vez a partir de células da medula óssea de murinos (Nagasawa et al. 1996). O resultado do *splicing* alternativo gerou diversas isoformas SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , e SDF-1 $\zeta\phi$ (Gleichmann et al. 2000; Yu et al. 2006). As SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , e SDF-1 $\zeta\phi$ foram identificadas em 2006 por Yu e colaboradores onde estes demonstraram a expressão destas isoformas em diversos tecido. As isoformas α , β , γ , δ e ϵ compartilham os três primeiros éxons, diferenciando uma da outra apenas no quarto éxon (Yu et al. 2006). Sendo que a isoforma α contém 3 éxons codificando uma proteína de 89 aminoácidos, a β apresenta 4 éxons, diferindo por 4

aminoácidos na região C-terminal, codificando assim uma proteína de 93 aminoácidos (De La Luz Sierra et al. 2004; Ghadge et al. 2010).

Trata-se de uma quimiocina com sequência altamente conservada entre várias espécies (Shirozu et al. 1995), ligando-se a seus receptores, CXCR4 e CXCR7 na superfície celular (Rueda et al. 2008; Decaillot et al. 2011). Foi inicialmente isolada a partir de células estromais da medula óssea de camundongos (Nagasawa et al. 1996; Takabatake et al. 2009). Na família CXC, a CXCL12 faz parte do grupo motivo- ELR negativo entre a região N-terminal e o primeiro resíduo de cisteína, recrutando linfócito e monócito (Ghadge et al. 2010).

O gene *CXCL12* é expresso em vários tecidos como rins, pele, cérebro e musculatura esquelética, mas sua expressão é marcadamente acentuada especialmente em linfonodos, pulmões, fígado, medula óssea (Ghadge et al.) e plaquetas (Apostolakis et al. 2006). Originalmente a CXCL12 foi caracterizada por estimular linfócitos T, linfócitos B e monócitos (Barbieri et al. 2007). Entretanto descobriu-se que sua ação não está restrita somente a células envolvidas na resposta imune e hematopoiéticas, mas também em células do sistema nervoso central e células endoteliais, desenvolvendo papéis importantes na patofisiologia de processos como inflamação, angiogênese, cicatrização e agregação plaquetária (Abi-Younes et al. 2000; Bonavia et al. 2003; Apostolakis et al. 2006; Karin 2010).

Diversos estudos têm sido realizados verificando a ação da CXCL12 sobre a regeneração tecidual (Apostolakis, et al. 2006; Ghadge et al. 2010; Gossel et al. 2010). Dados de Ghadge e colaboradores, em um estudo sobre infarto do miocárdio, indicam que o aumento nos níveis de CXCL12 em órgãos inflamados ou lesados, estimula o recrutamento de células para o local da lesão, que proporcionam ao tecido reparo e regeneração (FIGURA 5) e tem positivos efeitos parácrinos na sobrevivência dos cardiomiócitos e função cardíaca. Além disso a utilização de CXCL12 como tratamento resulta em diminuição do tamanho da área de infarto e aumento na resistência ao dano hipóxico e morte celular por apoptose. Estes resultados indicam que a estabilização da proteína CXCL12 em locais de tecido lesado pode representar uma nova estratégia terapêutica para promover a reparação do miocárdio (Ghadge et al. 2010).

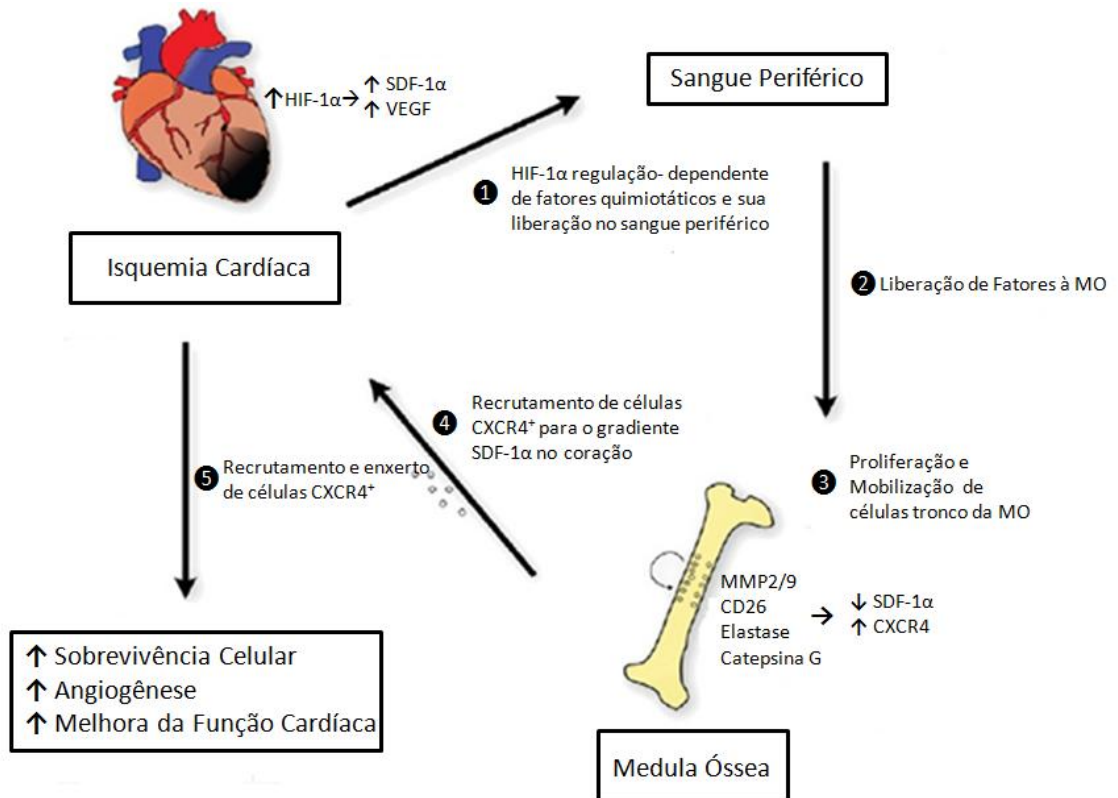


FIGURA 5 - CXCL12/SDF-1 E SEU POTENCIAL PAPEL NA ISQUEMIA MIOCÁRDICA

FONTE: ADAPTADO DE GHADGE ET AL. (2010)

NOTA: 1) O INFARTO DO MIOCÁRDIO INICIA A ALTA REGULAÇÃO DO SINAL DE HIF-1 α POR HIPÓXIA, QUE INDUZ AO SINAL PARA MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO, COMO SDF-1 α E VEGF E SUA LIBERAÇÃO NO SANGUE PERIFÉRICO; 2) ESSES SINAIS ATINGEM A MEDULA ÓSSEA (MO); 3) ISTO LEVA A ALTERAÇÕES NO MICROAMBIENTE DA MO (POR EXEMPLO, INDUÇÃO DE MMP2 / 9, CD26, ELASTASE E CATEPSINA G, RESULTANDO EM PROLIFERAÇÃO E AUMENTO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR CXCR4⁺ EM CÉLULAS-TRONCO PROGENITORAS BEM COMO A DEGRADAÇÃO DE CXCL12/SDF-1; 4) AS MUDANÇAS NA CONCENTRAÇÃO DE SDF-1 NA MO À TRANSLOCAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PROGENITORAS DO SANGUE PERIFÉRICO PARA O LOCAL DO GRADIENTE DE SDF-1 INICIADO NO MIOCÁRDIO; 5) CÉLULAS TRONCO DA MEDULA ÓSSEA E CÉLULAS PROGENITORAS SÃO SELETIVAMENTE DIRECIONADAS AO MIOCÁRDIO ISQUÊMICO, ONDE ELAS SE ENVOLVEM NO REPARO DO MIOCÁRDIO ATRAVÉS DA FUNÇÃO CARDIOPROTETORA E INDUÇÃO DE ANGIOGÊNESE.

Li e colaboradores (Li et al. 2010) observaram que o Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) oxidado causa um aumento na expressão tempo dependente de mRNA da proteína CXCL12 em células endoteliais, demonstrando seu papel na vascularização do trato gastrointestinal (Ara et al. 2005) e na ação em células endoteliais para a vascularização renal (Takabatake et al. 2009). Também foi demonstrado anteriormente um papel crucial da CXCL12 no crescimento e sobrevivência humana em fase embrionária (Garcia-Andres e Torres 2010) e para o crescimento, sobrevivência e disseminação metastática de vários tipos de tumores (Rueda et al. 2008). Em tumores de mama a CXCL12 é responsável pelo tráfico de

células tumorais que super expressam CXCR4, muito estudada uma vez que medeia a proliferação induzida por estrogênio, crescimento do tumor (Luker et al. 2009) e controle de metástase (Muller et al. 2001; Kishimoto et al. 2005).

A IL-8, conhecida como CXCL8, em sua forma plenamente ativa apresenta 72 aminoácidos. A transcrição do gene IL-8 codifica para uma proteína de 99 aminoácidos que é clivada proteoliticamente a um peptídeo biologicamente ativo de 77 aminoácidos em células não imunes ou 72 aminoácidos em monócitos e macrófagos. Os efeitos biológicos da IL-8 são mediados através da ligação de IL-8 aos receptores CXCR1 e CXCR2. A atividade biológica da IL-8 entre outras CXC quimiocinas é, em parte, dependente do motivo ELR positivo, já que a presença destes três aminoácidos específicos é crucial para a ligação de IL-8 ao seu receptor (Apostolakis et al. 2009).

A quimiocina IL-8 é secretada por macrófagos, leucócitos, fibroblastos e células tumorais de diversos tecidos (Matsuo et al. 2009). Suas funções estão associadas à resposta imune, inflamação e indução da angiogênese, pela capacidade de atrair neutrófilos para locais de inflamação (Matsuo et al. 2009; Ghadge et al. 2010), além de desempenhar um papel na proliferação das células endoteliais, concentração-dependente, tem sido apontada também como um fator de sobrevivência para as células endoteliais, já que em ensaios *in vitro* aumentou o tempo de sobrevivência de HUVECs em meio de cultivo desprovido de fator de crescimento (Li et al. 2003). Tem sido demonstrado também sua expressão em placa aterosclerótica, atuante na proliferação e migração de células do músculo liso, induzindo a firme adesão no rolamento de monócitos na camada endotelial, além de se mostrar um preditor útil na clínica de doença cardíaca (Gerszten et al. 1999).

Algumas características bioquímicas da IL-8 a torna ainda mais interessante. Ela é resistente a temperatura e a proteólise, é altamente sensível a oxidantes, além de ser relativamente resistente a ambientes ácidos, tornando-a uma molécula ideal para tecidos inflamados, já que é resistente a condições duras e hostis. Outra característica funcional da IL-8 é sua longevidade nos locais de inflamação, por serem produzidas no início da resposta inflamatória e permanecer ativa por um longo período de tempo, de dias à semanas, tornando-a diferente das demais citocinas inflamatórias que são tipicamente sintetizadas e degradadas em questões de horas (Apostolakis et al. 2009, Arici Mustafa 2001).

2.6 CXCL12 E A DOENÇA RENAL CRÔNICA

Diversos estudos têm sido realizados em busca de um maior entendimento da função de CXCL12 na DRC. Jie et al. (2010), demonstraram um aumento de CXCL12, em amostras de plasma de pacientes com DRC na fase pré-dialítica, quando comparado ao controle, concluindo que com a progressão da doença renal crônica e disfunção endotelial, os importantes estímulos de SDF-1 α e Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) aumentaram gradualmente, enquanto os níveis de EPC permaneceram baixos, verificando assim a ação da uremia bloqueando o procedimento de regeneração endotelial (Jie et al. 2010). Zaza et al. (2008) demonstraram em células Polimorfonucleares (PMN) periféricas de pacientes com doença renal crônica, através de estudos genômicos envolvendo mais de 15.000 genes candidatos, que os genes *MIF*, *IL8RB* e *CXCL12* estavam independentemente associados com inflamação, sendo que os genes *CXCL12* e *IL8RB* estavam inversamente correlacionado à PCR e altamente expressos em pacientes em diálise peritoneal e DRC respectivamente. No entanto *MIF*, apesar de estar aumentado, correlacionava positivamente com PCR em pacientes em hemodiálise (Zaza et al. 2008).

A angiogênese é um processo complexo que envolve várias etapas como a remodelação da matriz extracelular, migração e proliferação de células endoteliais e formação do tubo capilar (Bussolino et al. 1997). É comum o acesso venoso através da fístula arteriovenosa (AV) em pacientes em hemodiálise, entretanto ao redor deste acesso vascular ocorre a hiperplasia íntima venosa, predispondo esses indivíduos a formação de trombos, além da propensão à formação de placa aterosclerótica. Devido a essa complicação estrutural e conseqüentemente biológica, diversas pesquisas tem investigado o significado patobiológico da neoangiogênese que muitas vezes acompanha a hiperplasia da camada íntima na vasculatura dos doentes renais, por representar uma alteração projetada para manter a oxigenação e fornecimento de nutrientes para o espessamento da parede do vaso. Pesquisadores demonstraram que a quimiocina MCP-1 é expressa na área da fístula e que VEGF e CXCL12 agem em conjunto para induzir a formação de novos vasos (Caplice et al. 2007). Além de estudos sobre o papel da CXCL12 em fístulas, há também trabalhos que focam no comportamento desta quimiocina em

pacientes em hemodiálise e posterior transplante. Em pacientes adultos e pediátricos, foi demonstrado que tanto os níveis de CXCL12 quanto os de EPC, aumentam após o transplante (Herbrig et al. 2006; Metsuyanin et al. 2009).

A alteração na função endotelial tem sido demonstrada em pacientes em hemodiálise e em pacientes após transplante renal, indicando que pacientes em hemodiálise, que sofrem mais eventos cardiovasculares, desenvolvem disfunção endotelial mais acentuada que indivíduos em pré-diálise ou transplantados (Recio-Mayoral et al. 2011), entretanto a hemodiálise é benéfica, a curto prazo, para esta lesão (Cross et al. 2001). A disponibilidade de NO, está prejudicada em indivíduos com DRC, levando a disfunção endotelial, talvez este seja o motivo da consequente diminuição da sinalização para o estímulo de regeneração tecidual na atração de células endoteliais progenitoras e no aumento de células progenitoras do músculo liso, contribuindo para a formação da lesão neoíntima (Jie et al. 2010). Por isso, um enfoque maior têm sido dado ao estudo de moléculas como a CXCL12 e IL-8 sobre a regeneração tecidual em DCV, como doença arterial coronariana precoce (Gossl et al. 2010), infarto do miocárdio (Elmadbouh et al. 2007), em virtude da associação entre eventos cardiovasculares, doença renal crônica e morte prematura nessa população, conforme dito anteriormente (Martins 2010; Stinghen e Pecoits-Filho 2011).

3. JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Neste panorama, a doença renal crônica e o ambiente urêmico por ela proporcionado, representa um modelo interessante de estudo, pois, como já demonstrado anteriormente por Stinghen et al. 2009, a uremia altera a expressão *in vitro* e *in vivo* de marcadores de lesão endotelial, regeneração tecidual bem como marcadores inflamatórios, sugerindo uma ligação entre lesão e ativação vascular, inflamação sistêmica e toxicidade urêmica. Esclarecer os eventos envolvidos no processo de lesão e regeneração endotelial em estágios precoces da DRC poderia levar ao desenvolvimento de novos mecanismos efetores no prognóstico da doença cardiovascular contribuindo para novas intervenções terapêuticas neste grupo de pacientes.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência do ambiente urêmico na expressão da quimiocina CXCL12

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações da quimiocina CXCL12 em plasma de pacientes em hemodiálise;
- Determinar as concentrações de marcadores genéricos de inflamação sistêmica (proteína C-reativa e IL-6) em pacientes em hemodiálise;
- Avaliar a disfunção endotelial de pacientes em hemodiálise através dos níveis plasmáticos de IL-8;
- Determinar os níveis da quimiocina CXCL12 produzidas pelas células endoteliais em sobrenadante de cultura após exposição ao ambiente urêmico;
- Avaliar o papel do ambiente urêmico na proliferação e morte celular de células endoteliais submetidas à ambiente que simulam indivíduos saudáveis e urêmicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, com registro no CEP/SD, sob número 954.079.10.07 (ANEXO I).

5.1.1 PACIENTES E CONTROLES

Neste estudo foram analisadas amostras séricas e plasmáticas de pacientes com DRC, em tratamento por hemodiálise na Clínica de Doenças Renais de Curitiba (CDR-PR) e Instituto do Rim do Paraná. Estas amostras são provenientes de um estudo prévio o qual os resultados foram publicados recentemente por Stingham et al. (2010). Estas amostras foram congeladas a -20°C , permitindo assim a posterior análise, como no presente trabalho. A coleta das amostras foi feita sempre antes da primeira sessão de hemodiálise da semana e os pacientes foram selecionados obedecendo a critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo.

5.1.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram aqueles estabelecidos pelo trabalho de Stingham et al. (2010), sendo eles: assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, estar em tratamento dialítico por um período superior ou igual há três meses antes da data de inclusão no estudo, idade superior ou igual há 18 anos.

5.1.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão também foram estabelecidos pelo trabalho de Stingham *et al.* (2010), sendo eles: sinais clínicos de inflamação aguda ou doença infecciosa, histórico de malignidade, doença hepática atualmente ativa, doenças auto-imunes, uso de medicamentos imunossupressores ou antiinflamatórios no prazo de 3 meses antes da data de inclusão no estudo, histórico de abuso de álcool ou drogas ilícitas, pacientes que apresentavam eventos cardiovasculares tais como infarto do miocárdio, angina instável, revascularização do miocárdio, acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório, dentro de 3 meses antes da data da inclusão no estudo e insuficiência cardíaca congestiva moderada a grave.

5.1.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Durante o recrutamento dos pacientes no trabalho realizado e publicado por Stingham *et al.* (2010), foram coletados os dados através da entrevista clínica e exame físico realizados no dia da avaliação inicial e análise dos registros do prontuário médico prévio. Os seguintes dados foram analisados: idade, sexo, etnia, peso, altura, índice de massa corpórea, circunferência abdominal, frequência cardíaca, pressão arterial, presença de edema clinicamente detectável, causas da insuficiência renal, tabagismo, dislipidemia, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, doença cardiovascular (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório e doença vascular periférica) e medicações prévias e concomitantes.

5.1.5 PREPARO DE POOLS

Foram preparados dois *pools*, um contendo plasma de 13 indivíduos saudáveis e outro contendo plasma de 26 indivíduos em hemodiálise.

5.1.6 CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DE VEIA DE CORDÃO UMBILICAL (HUVECs)

Foram utilizadas células endoteliais humanas extraídas de veia de cordão umbilical (HUVEC) Jaffe et al. (1973) adaptado por Stinghen et al. (2009), caracterizando cultivo primário. Para a extração das HUVECs, os cordões umbilicais foram colhidos de bebês após cesáreas, realizadas no Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, para tal as mães assinaram um termo de consentimento informado, previamente ao parto e subsequentemente coleta (ANEXO II).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 ENSAIOS *IN VIVO*

5.2.1.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA-C-REATIVA DE ALTA SENSIBILIDADE (*hsPCR*)

A dosagem plasmática de *hsPCR* foi realizada por ensaio imunoturbidimétrico automatizado (ADVIA Sistema de Química 1200, Siemens HealthCare, Deerfield, Illinois, EUA). O limite variou de 0.5 – 15 mg/L.

5.2.1.2 DOSAGEM DE CXCL12, IL-6 E IL-8

As dosagens de CXCL12 e IL-6 em amostras plasmáticas foram realizadas através do método de ELISA *sandwich* com kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, USA). O limite de detecção mínima e máximo para CXCL12 e IL-6 são, respectivamente, 1.0 pg/mL - 47 pg/mL (Costa et al. 2010) e menos de 0.7 pg/mL (Kato et al. 2007). As dosagens de IL-8 foram realizadas através do método de

ELISA *in house* (anticorpos R&D Systems). Com limite de detecção máximo e mínimo de 31.25 e 2.000 pg/mL respectivamente.

5.3 ENSAIOS *IN VITRO*

5.3.1 CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS HUVECS

As HUVECs foram extraídas pelo método de Jaffe et al. (1973) adaptado por Stinghen et al. (2009). Após a coleta, os cordões foram imersos em tampão salino fosfato (PBS) e transportados até o laboratório em caixa térmica para posterior extração. As células endoteliais foram obtidas da veia do cordão umbilical pela quebra das ligações intercelulares e da matriz celular, com o uso da enzima colagenase tipo II (Sigma) a 0,3%. Após a extração as HUVECs foram transferidas para frascos de cultivo (25 cm²) preparados com uma fina camada de gelatina a 1%. Posteriormente foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo-199 (MEM-199 - Gibco), suplementado com glutamina 1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 50 mg/ml, 20% de soro fetal bovino (SFB), heparina 5000 UI/mL, Suplemento de Crescimento de Célula Endotelial (ECGS) 25 µg/mL, hidrocortisona 0,5 mg/mL em atmosfera úmida de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

Após extração e cultivo das HUVECs, entre a 3^o e 4^o passagem sua origem endotelial foi comprovada por citometria de fluxo (FAC-Scalibur® - BD Biosciences), através da marcação com anticorpo monoclonal anti-CD31 humano (FITC).

5.3.2 CULTURA DE HUVECS COM SORO URÊMICO E NORMAL

O tempo de exposição celular ao plasma urêmico e saudável foi padronizado a partir de experimentos prévios (Stinghen et al. 2009; Habauzit et al. 2010; Li et al. 2010). Entre a terceira e quarta passagem as HUVECs foram suprimidas com MEM-199 e 3% de Soro fetal bovino (SFB), permanecendo por 12 horas neste ambiente.

Posteriormente foram tratadas com MEM-199 + 10% *pool* plasma urêmico e/ou MEM-199 + 10% *pool* plasma saudável. Os tratamentos foram feitos em uma cinética de 0 h, 6 h e 12 h (Habauzit et al. 2010; Li et al. 2010). Ao término de cada tratamento, os sobrenadantes foram coletados para realização de ensaio imunoenzimático (ELISA).

5.3.3 DOSAGEM DE CXCL12

As dosagens de CXCL12 em sobrenadante celular foram realizadas através do método de ELISA *sandwich* com kit comercial (R&D Systems, Minneapolis, USA). O limite de detecção mínima e máximo de: 1.0 pg/mL e 47 pg/mL respectivamente (Matsuo et al. 2009; Habauzit et al. 2010).

5.3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO AZUL DE TRYPAN

A análise da viabilidade celular após tratamento com plasma saudável ou urêmico foi realizada pela técnica de exclusão celular pelo azul de *Trypan* a 0,4% Palama et al. (2011), na qual células inviáveis apresentam-se coradas por apresentarem membrana lesionada.

5.3.5 ENSAIO DE MTT (3-[4,5-DIMETIAZOL-2YL]-2,5-DIFENILTETRAZOLIUM BROMIDE)

O ensaio de MTT foi usado para avaliar a proliferação celular e potencial efeito citotóxico do plasma urêmico sobre as células. Em placa de 96 poços foram plaqueadas 1×10^4 células por poço. Após confluência de 80%, foi realizada depleção por 12 horas (MEM-199 + 3% SFB), e cinética de 0 h, 6 h e 12 h, onde foi utilizado MEM-199 + 10% de *pool* de plasma saudável como controle e MEM-199 + 10% de

pool de plasma urêmico (Habauzit et al. 2010; Li et al. 2010). Após cada período as células foram lavadas com PBS 1x e em seguida expostas por 4 horas com 100µL de MTT por poço. A seguir foi adicionado 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 570nm (Mosmann 1983).

5.3.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para cada tratamento celular foram utilizados frascos de cultura de 75 cm² com aproximadamente 80% de confluência. Posteriormente as HUVECs foram suprimidas por 12 h em MEM 199 + 3% SFB e a seguir submetidas a uma cinética de 0 h, 6 h e 12 h (Habauzit et al. 2010; Li et al. 2010) em meio sem nenhum tratamento, com 10% de plasma saudável e com 10% de plasma urêmico, simulando as condições que ocorrem em indivíduos saudáveis e em indivíduos em hemodiálise, além de células sem tratamento. Ao término do tratamento as células foram tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,25% e centrifugadas durante 5 minutos a 705 x g.

Os sobrenadantes foram descartados e cada *pellet* ressuspendido em 500µL de PBS 1x filtrado, seguido de homogeneização para que não ficassem grumos celulares. Para fixação celular, 4,5 mL de etanol 70% a 4°C foi adicionado às amostras ressuspendidas, que foram deixadas então por 2 h no gelo e a seguir estocadas a -20°C. Posteriormente, para serem analisadas, as amostras foram novamente centrifugadas durante 5 minutos a 705 x g para retirar o etanol e então ressuspendidas em 1 mL da solução hipotônica fluorescente (iodeto de propídeo) (Nicoletti et al. 1991). Em seguida 50.000 eventos (correspondente a 100% de células) foram analisados por citometria de fluxo no equipamento FAC-Scalibur® (BD Biosciences) e os dados analisados pelo software FlowJo versão 7.6.3.

5.3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando os pacotes estatísticos para Windows JMP versão 7.0 (SAS Institut Inc, USA) e SigmaStat versão 3.5 (Systat software, Inc., Germany). Os dados foram apresentados como médias \pm EPM. Um $P \leq 0.05$ foi considerado como significativo. Foi utilizada mediana para dados clínicos e laboratoriais. Os resultados foram analisados através do teste t para dados paramétricos e teste de Mann-Whitney para não pareados. Análises pelo método de *one-way* ANOVA, e comparações múltiplas entre o controle e os grupos foram realizadas através do *post test* de Dunnett. As análises de correlações foram efetuadas pelo teste de Spearman (ρ).

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS *IN VIVO*

6.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

As principais características clínicas e laboratoriais dos pacientes selecionados para o estudo a partir dos critérios de inclusão e exclusão estão descritas nas TABELAS 1 e 2. Os resultados foram apresentados como mediana ou porcentagem, com valores de mínimos e máximos encontrados.

TABELA 1 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

PARÂMETROS ANALISADOS	MEDIANA
Colesterol Total (mg/dL)	175 (108-248)
Colesterol LDL (mg/dL)	101 (42-176)
HDL Colesterol (mg/dL)	43 (21-80)
Triglicérides (mg/dL)	151 (73-240)
Albumina (mg/dL)	3,9 (3,3-4,7)
Cálcio (mg/dL)	8,9 (7,6-10,3)
Fósforo (mg/dL)	6,4 (4,1-9,6)
Hormônio Paratireoídiano (mg/dL)	285 (11-1666)
Fosfatase Alcalina (U/L)	114 (65-602)
Hemoglobina (g/dL)	11,5 (10,8-12,0)
Albumina (mg/dL)	3,9 (3,3-4,7)
Proteína C Reativa (mg/dL)	4,9 (0,5-15,2)
Interleucina-6 (pg/dL)	6,76 (1,33-36,17)
Interleucina-8 (pg/dL)	128,2 (4,68-972,22)
CXCL12 (pg/dL)	2625,87 (21,70-4436,12)

FONTE: ADAPTADO DE STINGHEN ET AL. 2010

NOTA: HDL= LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE, LDL = LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

TABELA 2 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

PARÂMETROS ANALISADOS	MEDIANA
Número de Pacientes	26
Idade	52±2
Sexo (% Masculino)	38
Etnia (% Caucasiano)	81
Tempo em Hemodiálise (meses)	12±4
Comorbidades (%)	
Diabetes	11
Hipertensão	96
Doença Renal Primária (%)	
Glomerulonefrite Crônica	50
Nefroesclerose	30
Nefropatia diabética	15
Outras	5
Estatina (% uso)	45
Vitamina D (% uso)	30

FONTE: STINGHEN ET AL. 2010

6.1.2 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS IL-6 E PCR EM AMOSTRAS DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE

Os níveis plasmáticos de PCR e IL-6 foram apresentados na TABELA 1 do item 6.1.1. Na FIGURA 6 está ilustrada a análise de correlação (*Spearman*) entre estes dois marcadores de inflamação.

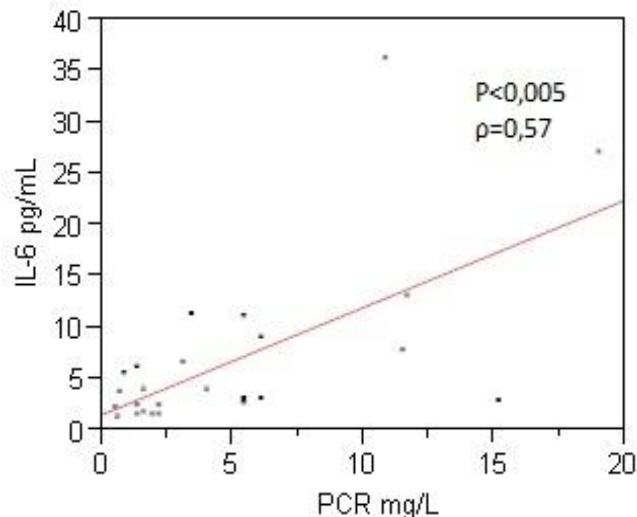


FIGURA 6- CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA

FONTE: O AUTOR (2011)

6.1.3 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DAS QUIMIOCINAS IL-8 E CXCL12 EM AMOSTRAS DE PACIENTES EM HEMODIÁLISE

Os níveis plasmáticos de IL-8 e CXCL12 foram apresentados na TABELA 1 do item 6.1.1. Na FIGURA 7 está ilustrada a análise de correlação (*Spearman*) entre estas duas quimiocinas que apresenta uma correlação positiva entre ambas quimiocinas.

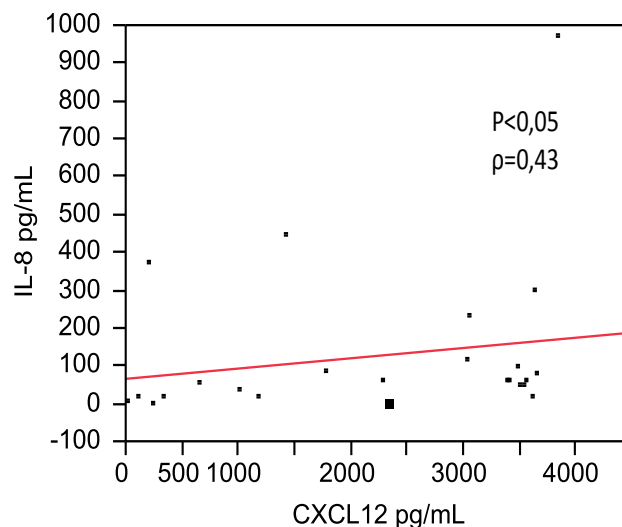


FIGURA 7– CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MARCADORES DE LESÃO ENDOTELIAL E REGENERAÇÃO TECIDUAL
FONTE: O AUTOR (2011)

6.2 RESULTADOS *IN VITRO*

6.2.1 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

No modelo experimental utilizado foram extraídas células de cordão umbilical, conforme metodologia apresentada no item 5.3.1. Após o cultivo, as HUVECs foram caracterizadas através de citometria de fluxo (FAC-Scalibur®), conforme descrito em 5.3.1. O resultado apresentado na FIGURA 8A indica que 87,46% (retângulo vermelho) de 10.000 células foram consideradas como endoteliais. O pico em verde no gráfico indica a população de HUVECs marcadas com anti-CD31.

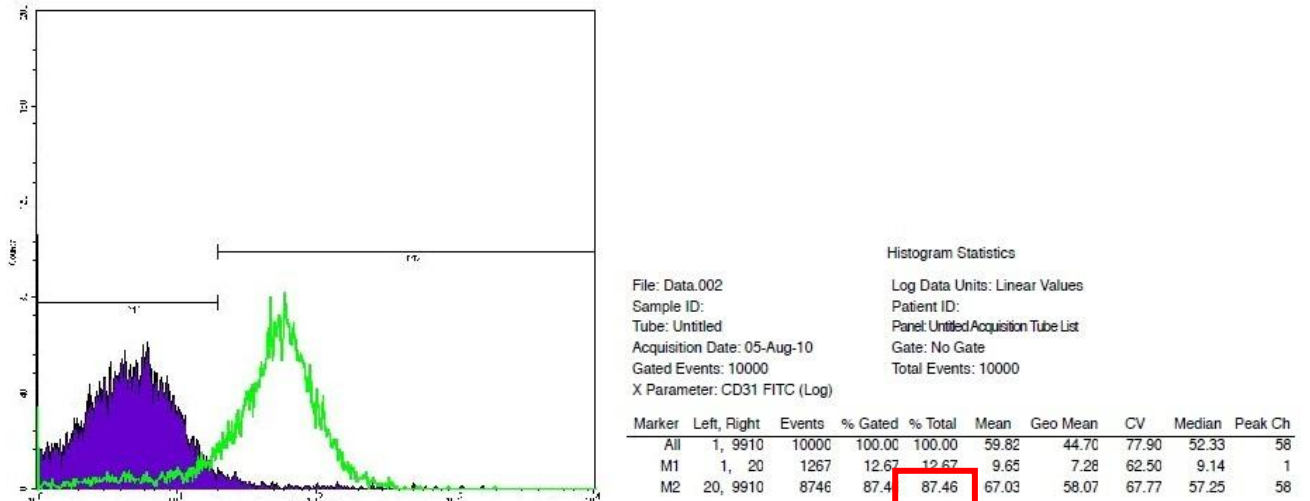


FIGURA 8A- CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ENDOTELIAS (HUVECs)

FONTE: O AUTOR (2010)

NOTA: ENSAIO REALIZADO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO ONDE O GRÁFICO EM VERDE INDICA A QUANTIDADE DE CÉLULAS ENDOTELIAIS E O RETÂNGULO VERMELHO APRESENTA A PORCENTAGEM TOTAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Através de microscopia ótica, foi realizada a caracterização das HUVECs. A morfologia poligonal, o núcleo ovalado e o crescimento em monocamada também confirmaram a sua origem endotelial (FIGURA 8B).

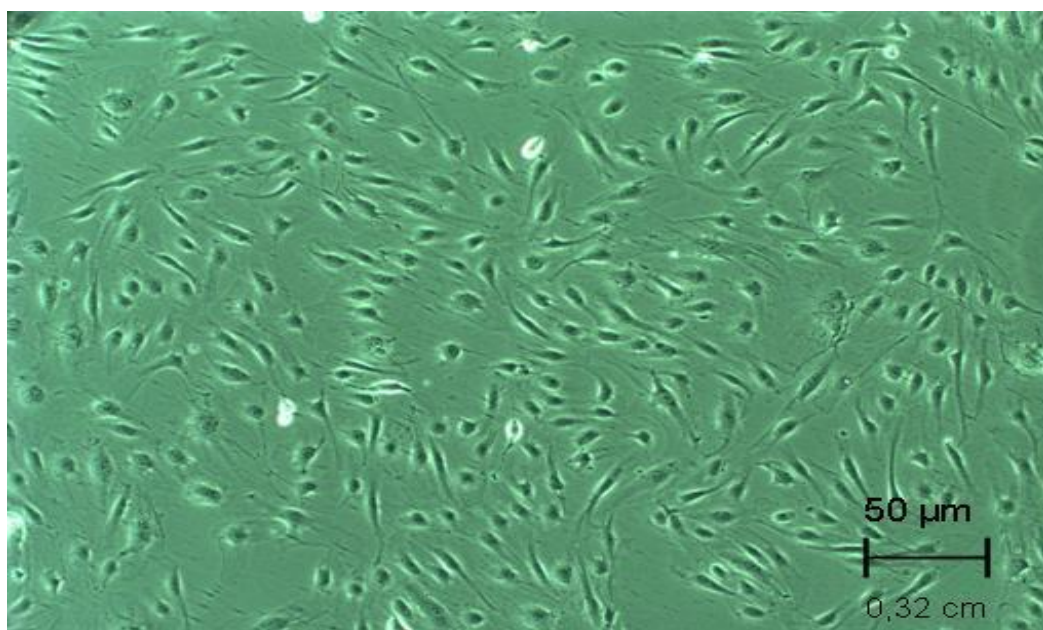


FIGURA 8B- FOTOMICROGRAFIA DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVECs) POR MICROSCOPIA ÓTICA COM AUMENTO DE 10X

FONTE: O AUTOR (2010)

6.2.2 VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DO MTT

A FIGURA 9 indica a avaliação da viabilidade através do método do MTT após tratamento das HUVECs com plasma saudável (PS) ou plasma urêmico (HD), com cinética de 0 h, 6 h e 12 h. Essa avaliação foi realizada em triplicatas e não houve diferença significativa ($P=NS$) para nenhum dos tempos testados (teste t para amostras paramétricas e *Mann-Whitney* para dados não paramétricos) (FIGURA 9).

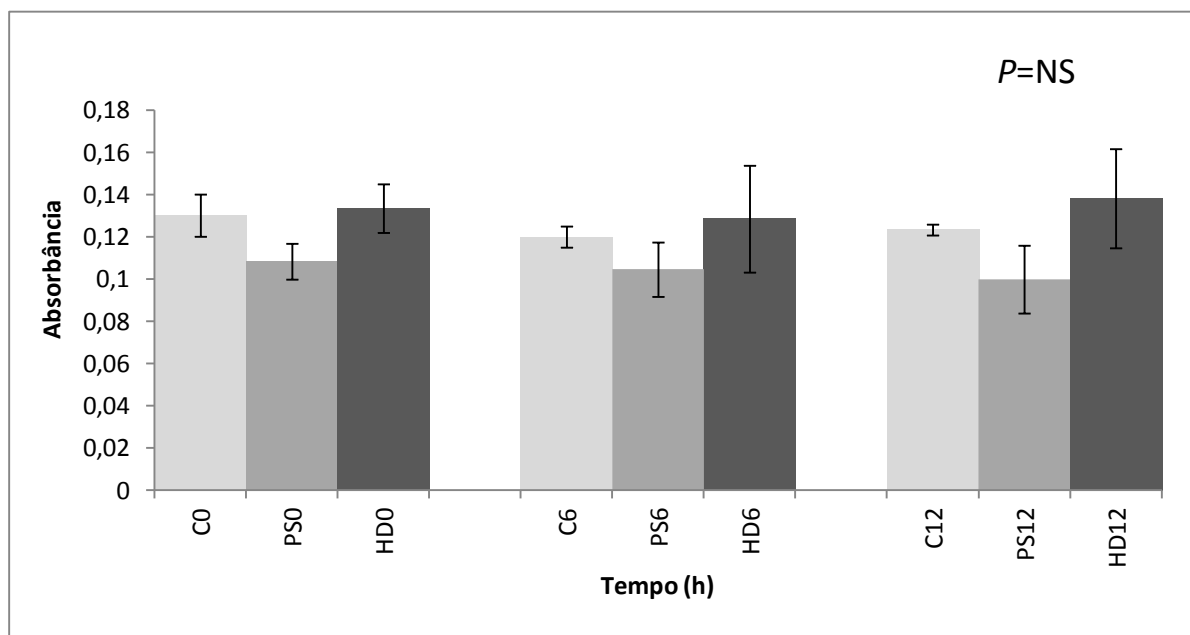


FIGURA 9- ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DO MTT

FONTE: O AUTOR (2011)

NOTA: PS: PLASMA SAUDÁVEL, HD: PLASMA URÊMICO, h: HORAS e NS: NÃO SIGNIFICATIVO

6.2.3 ENSAIO DE VIABILIDADE PELO AZUL DE TRYPAN

A viabilidade celular também foi avaliada através da exclusão pelo ensaio de Azul de Trypan conforme indicado no item 5.3.4. Os valores demonstrados indicam as médias para cada tratamento, onde 95,7% de HUVECs sem tratamento (controle) foram consideradas viáveis. Nas células tratadas com PS observou-se viabilidade de 89,9% e nas células tratadas com HD foi observado viabilidade de 83,23%. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

6.2.4 EXPRESSÃO *IN VITRO* DA QUIMIOCINA CXCL12 EM CÉLULAS TRATADAS COM PLASMA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS E PACIENTES EM HEMODIÁLISE

Os níveis de CXCL12 expressos em sobrenadante de células endoteliais após tratamento com PS ou HD por 0 h, 6 h e 12 h são apresentados na FIGURA 10A. As células expostas ao PS após um período de 6 h e 12 h expressam uma quantidade significativa ($P < 0,05$) de CXCL12 quando comparadas ao tempo 0 de tratamento. Para os demais tempos não houve diferença significativa antes e após o tratamento nos níveis de CXCL12 produzidos pelas HUVECs.

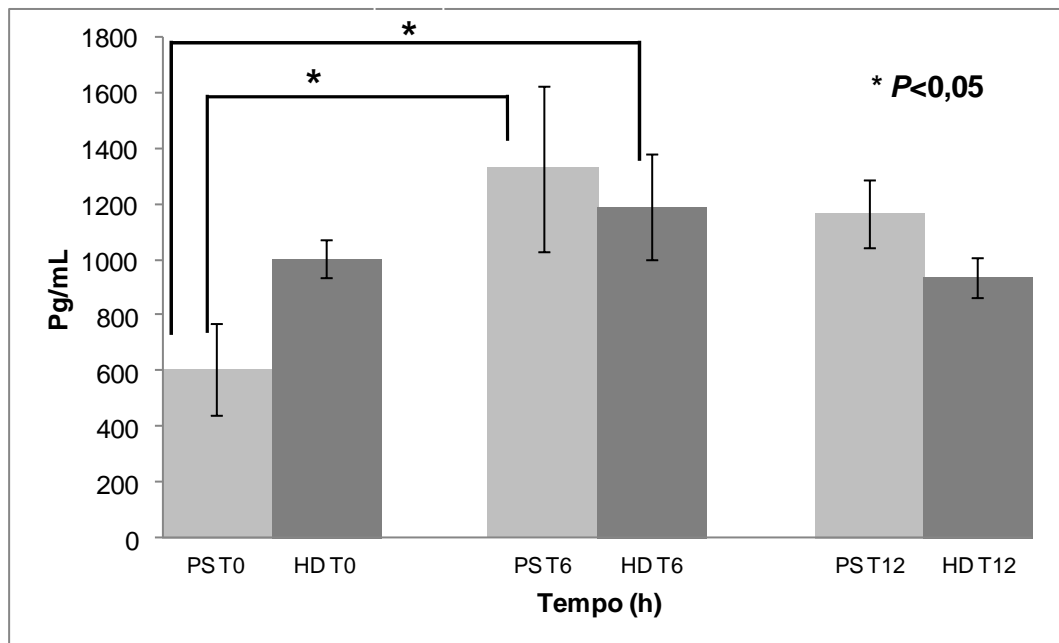


FIGURA 10A– EXPRESSÃO *IN VITRO* DE CXCL12 PELAS HUVECs APÓS CINÉTICA DE TRATAMENTO (0 H, 6 H e 12 H)
FONTE: O AUTOR (2011)

A FIGURA 10B apresenta a expressão de CXCL12 em sobrenadante de HUVECs após 6 h de tratamento com PS ou HD. A FIGURA 10C apresenta a diferença através do Δ % da expressão de CXCL12 entre o tempo 6 e 0 h para as células tratadas com PS ou HD, sendo Δ % : PS = PS tempo 6 – PS tempo 0 e Δ % HD = HD tempo 6 – HD tempo 0.

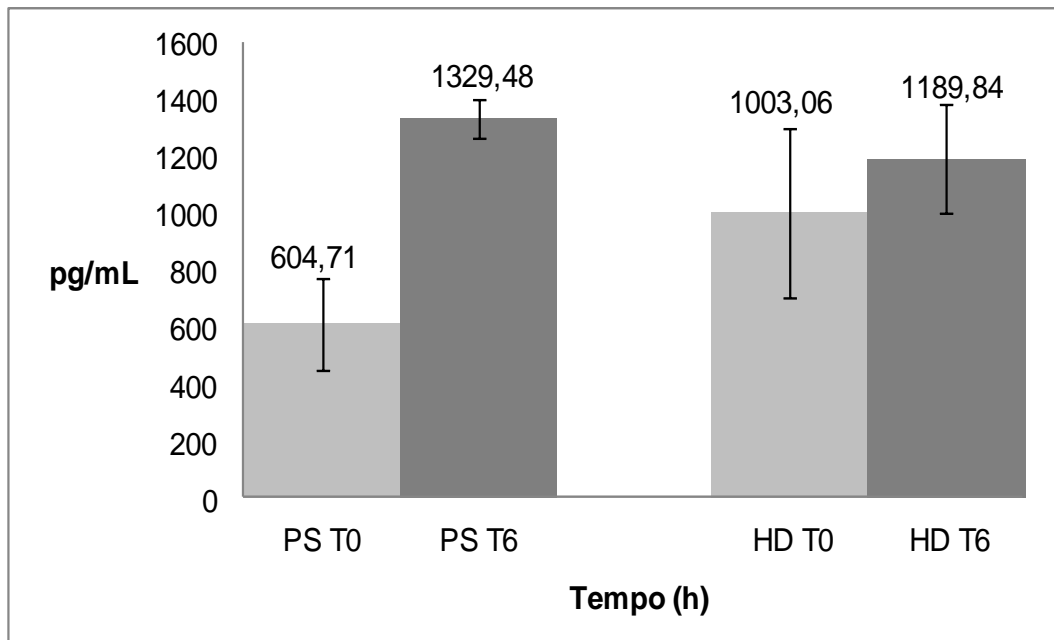


FIGURA 10B- EXPRESSÃO *IN VITRO* DE CXCL12 PELAS HUVECs APÓS 6 H DE TRATAMENTO
FONTE: O AUTOR (2011)

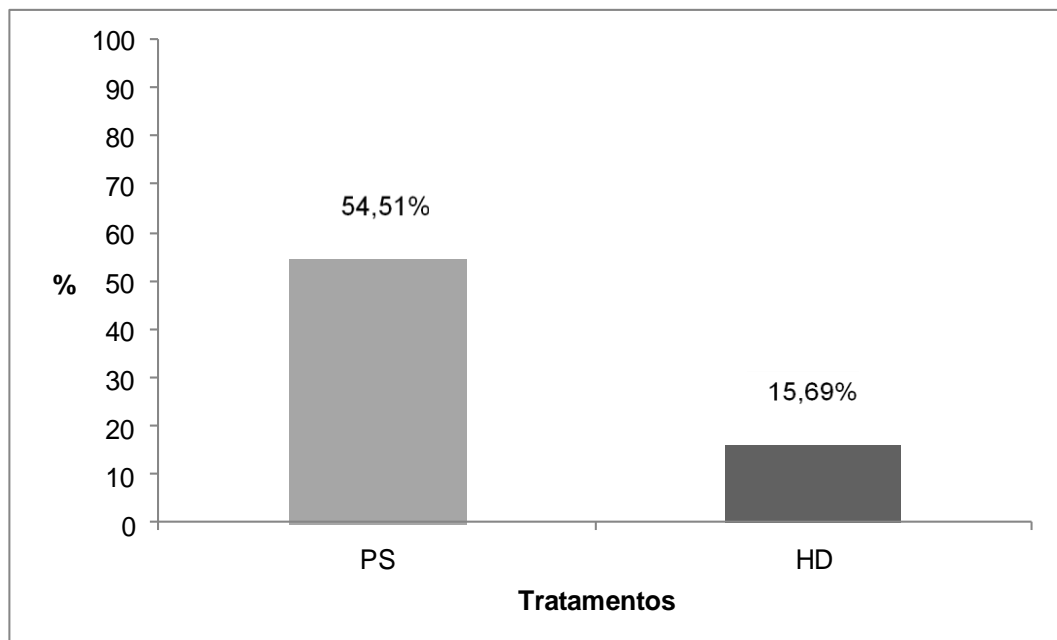


FIGURA 10C- DELTA PERCENTUAL ($\Delta\%$) DA DIFERENÇA DE EXPRESSÃO DE CXCL12
FONTE: O AUTOR (2011)

6.2.5 ANÁLISE DO CICLO CELULAR DE HUVECS TRATADAS COM PLASMA SAUDÁVEL (PS) E PLASMA URÊMICO (HD)

A porcentagem de células endoteliais sem tratamento e de células tratadas com PS e HD, nas fases Sub-G1, G1 e G2 e seus respectivos tempos estão apresentados nas FIGURAS 11A, B e C.

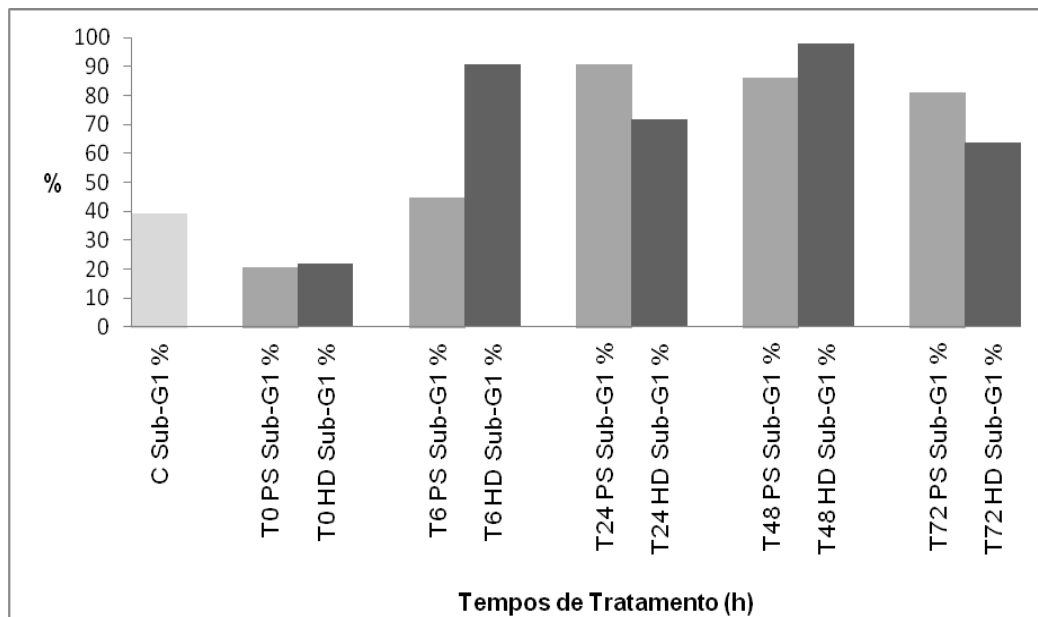


FIGURA 11A - PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR - FASE G0/SUB-G1

FONTE: O AUTOR (2011)

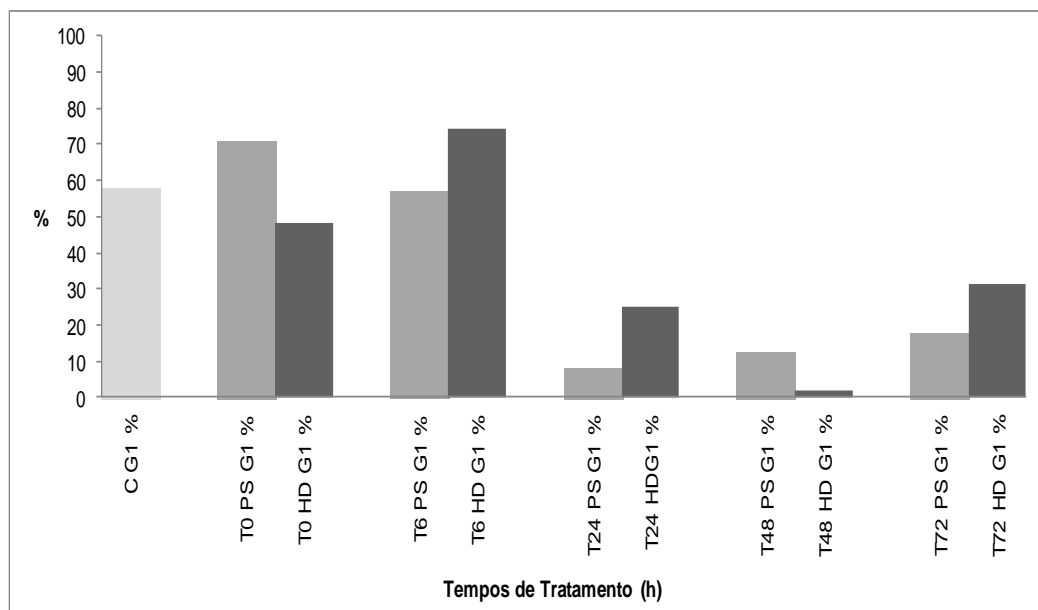
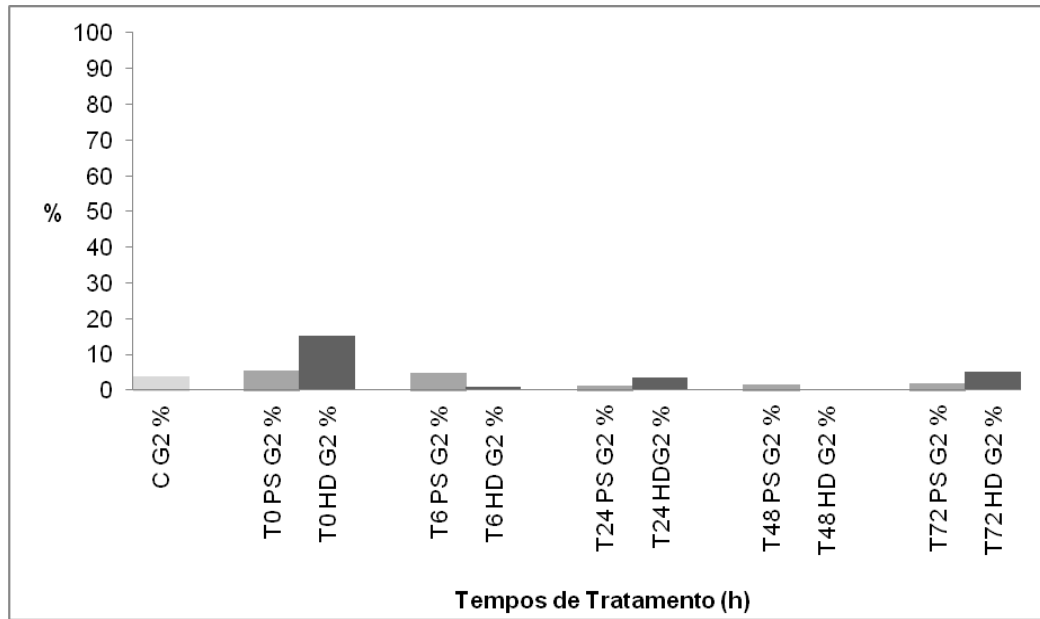


FIGURA 11B- PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR - FASE G1

FONTE: O AUTOR (2011)



**FIGURA 11C- PORCENTAGEM (%) DE CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR
- FASE G2
FONTE: O AUTOR (2011)**

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O tempo de vida de indivíduos com DRC é reduzido em virtude da progressão da doença e de várias alterações metabólicas deletérias como: sobrecarga de volume extracelular, anemia, distúrbios do metabolismo ósseo e mineral, dislipidemia e desnutrição protéico-energética (Abbasi et al. 2010), além de comorbidades que acometem os pacientes tais como diabetes, hipertensão e histórico de DCV (Montanes Bermudez et al. 2011). Várias evidências demonstram que o acúmulo de toxinas urêmicas incluindo produtos oxidativos, que não são eliminados durante a filtração sanguínea em forma de urina, desempenha um papel crucial na resposta vascular gerando sérias conseqüências, entre elas o desenvolvimento da DCV, principal causa de morte nestes pacientes (Pawlak et al. 2007; Yamamoto e Kon 2009; Stingham e Pecoits-Filho 2011).

O aumento nos níveis séricos de marcadores inflamatórios comprova que, indivíduos com doença renal, apresentam um processo inflamatório constante (Carrero e Stenvinkel 2009). A constância da inflamação, gerada inicialmente pelo estresse oxidativo (Wesoly et al. 2010), causa a lesão e conseqüentemente a disfunção endotelial, evento comum na doença renal aguda, crônica e em várias doenças cardiovasculares (Becher et al. 2010). No presente estudo utilizando amostras plasmáticas de pacientes em hemodiálise, verificamos comorbidades tipicamente encontradas nesta população tais como diabetes, hipertensão e histórico de DCV, além de doenças renais primárias tais como: glomerulonefrite crônica, nefrosclerose, nefropatia diabética entre outras foram encontradas (TABELA 2). Essas características clínicas, também foram encontradas em diversos outros estudos, corroborando assim com nossos dados (Serradell et al. 2003; Rhee et al. 2010; Recio-Mayoral et al. 2011).

Da mesma forma com relação aos níveis circulantes de proteínas de fase aguda PCR e IL-6 (TABELA 1), estes pacientes apresentaram semelhanças com outros estudos, confirmando que a inflamação sistêmica é um evento comum em pacientes em hemodiálise, (Bucharles et al. 2011; Recio-Mayoral et al. 2011). PCR e IL-6 apresentaram correlação positiva, concordando também aos dados da literatura (Oberg et al. 2004; Bucharles et al. 2011). Não houve correlação significativa entre

estes marcadores de inflamação sistêmica e marcadores de lesão endotelial (de la Sierra e Larrousse 2010).

Sabe-se que algumas toxinas urêmicas atuam estimulando a expressão e liberação de MCP-1 e IL-8, tal estímulo leva a alterações nas funções das células endoteliais, promovendo assim a aterogênese (Poddar et al. 2001). Em nosso estudo verificamos também um aumento de IL-8, em resposta a uremia nestes pacientes (TABELA 1). O aumento de IL-8 e CXCL12 estão correlacionados em indivíduos com doença renal crônica, indicando, muito provavelmente, que a uremia está envolvida na lesão endotelial e que o aumento de ambas citocinas indica que o organismo está em busca de uma regeneração tecidual. Ambas quimiocinas, são consideradas marcadores de lesão endotelial e regeneração endotelial, respectivamente, em várias patologias cardiovasculares (Ghadge et al. 2010; Gossl et al. 2010), além de apresentarem-se aumentadas em pacientes urêmicos, confirmando achados previamente descritos por outros autores em indivíduos com DRC (Stinghen et al. 2009; Jie et al. 2010).

Dados da literatura demonstram que a CXCL12 é expressa em vários tecidos e órgãos tais como: medula óssea, coração, fígado, timo, baço, músculo liso e esquelético, células endoteliais, macrófagos e rins, atuando de forma pleiotrópica (Braunersreuther et al. 2007; Ghadge et al. 2010; Karin 2010). Observamos que a expressão de CXCL12 é diminuída em células endoteliais após exposição ao plasma urêmico quando comparado as células expostas ao plasma normal, sugerindo hipoteticamente que a uremia atue de certa forma induzindo a morte celular ou inviabilizando as células e conseqüentemente diminuindo a expressão desta quimiocina pelo endotélio.

Está descrito na literatura que a uremia gera danos a várias células como, por exemplo, células tronco mesenquimais, onde Noh et al. (2011), verificaram a interferência da uremia na transcrição de CXCL12, inibindo a síntese de RNA mensageiro (mRNA) e conseqüentemente diminuindo a produção da proteína (Noh et al. 2011), bem como a inibição de células endoteliais, verificada por Wang e colaboradores (Wang et al. 1997). Martens e Edwards (2011) também apresentaram a uremia como causa de lesão e conseqüente disfunção endotelial (Martens e Edwards 2011), sugerindo que a uremia deve influenciar na diminuição da expressão de CXCL12.

Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a ação da uremia sobre a expressão da quimiocina CXCL12 por células endoteliais. Os resultados encontrados apontaram para uma diminuição na expressão desta quimiocina em células tratadas com plasma urêmico por 6 horas (FIGURAS 10A, 10B E 10C) quando comparadas as células endoteliais tratadas com plasma de indivíduos saudáveis. Essa diminuição da expressão é indicativo de que a uremia esteja inibindo ou bloqueando a expressão de CXCL12 pelo endotélio. De fato, alguns trabalhos descrevem que algumas toxinas urêmicas atuam alterando a síntese de diversas citocinas e quimiocinas (Tumur et al. 2010; Noh et al. 2011).

Outra hipótese para a diminuição da expressão de CXCL12 pelas HUVECs expostas ao plasma urêmico, quando comparada as HUVECs expostas ao plasma saudável é que a uremia esteja influenciando na produção de NO por estas células (Cines et al. 1998; Nanayakkara e Gaillard 2010). Alguns estudos com toxinas específicas, como por exemplo, os AGES (Vasdev et al. 2007), indicam a participação ativa destes produtos e seus receptores na diminuição da produção de NO, por reduzir a biodisponibilidade de O₂ molecular que promove a conversão de L-arginina em L-citrulina, gerando o NO (Vasdev et al. 2007; Linden et al. 2008; Granata et al. 2009). Com base nessas informações futuras análises utilizando células endoteliais submetidas ao tratamento com plasma saudável, plasma urêmico e com inibidor de NO, serão realizadas em busca de respostas quanto ao mecanismo envolvido na produção de CXCL12 e o real papel do NO nesta produção.

Além de ensaios utilizando plasma e sobrenadante celular, analisamos a quantidade de células presente em cada fase do ciclo celular pela quantidade de DNA marcado. Com isso, pudemos perceber que células endoteliais tratadas com plasma saudável permanecem em seu ritmo de crescimento praticamente normal, aumentando o número de morte celular conforme aumenta o tempo. Entretanto as células são tratadas com plasma urêmico apresentam uma alta porcentagem celular na fase Sub-G1/G0 do ciclo celular (FIGURA 11A), indicando assim que a uremia está influenciando no crescimento celular, levando a morte por apoptose. Nossos dados vão de encontro aos de Feng et al. (2011) que avaliaram a ação do soro urêmico em células endoteliais da aorta de coelho (RAEC), concluindo que o soro urêmico (dose-dependente) promove tanto a proliferação de células endoteliais, como a morte por apoptose. Cardinal et al. (2007) avaliaram em células endoteliais

da artéria coronariana humana (HCAECs) o efeito da uremia e verificaram o aumento da morte celular por apoptose causada pelo meio urêmico, em comparação ao plasma normal, durante 48h.

Uma vez que a toxicidade urêmica induz a lesão vascular (Matsuo et al. 2009; Wesoly et al. 2010), as células respondem sintetizando moléculas indicativas de dano vascular, como a IL-8 (Gossl et al. 2010). Concomitantemente o endotélio inicia o processo de sinalização para regeneração tecidual pela expressão de CXCL12, em uma tentativa autócrina de reparar o dano gerado pela toxicidade urêmica (Li et al. 2003; Ghadge et al. 2010) com a quimioatração de EPCs (Gossl et al. 2010). Estes dados foram comprovados em nossos experimentos, pois observamos níveis plasmáticos aumentados em IL-8 e CXCL12. Nos ensaios *in vitro* percebemos uma diminuição com diferença significativa na quantidade de CXCL12 em sobrenadante de células tratadas com plasma urêmico em relação aquelas tratadas com plasma saudável (FIGURAS 10B e 10C). Isso porque, o modelo experimental utilizado, fazia uso de plasma urêmico, com altas concentrações de diversas toxinas e sabe-se que algumas toxinas urêmicas atuam inibindo a proliferação de células endoteliais (Wang et al. 1997).

Uma explicação para este fato é que quando a CXCL12 tem sua produção aumentada, ocorre sinalização por citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas no processo de defesa do hospedeiro e reparação dos órgãos, que aumenta a produção de seus receptores CXCR4 e CXCR7, resultando em migração e ativação de leucócitos. Esta produção aumentada de CXCL12 tem por objetivo regular vários efeitos biológicos relacionados com a motilidade celular, respostas quimiotáticas, adesão celular e transcrição do gene, até que o estímulo seja cessado (Kucia et al. 2004; Wong e Korz 2008; Ghadge et al. 2010; Decaillot et al. 2011).

Com base nessas informações hipoteticamente podemos sugerir que ocorra saturação dos receptores quando as células são submetidas ao ambiente urêmico, já que em nosso modelo experimental utilizamos *pools* de plasmas urêmicos (altamente concentrados em diversas toxinas).

Em estudos equivalentes ao presente trabalho Martens e Edwards (2011), apresentam a uremia como causa de lesão e consequente disfunção endotelial, demonstrando que a uremia influencia na diminuição da produção de CXCL12 e consequentemente regeneração vascular, além de diminuir o efeito mitogênico em células endoteliais (Noh et al. 2011). Na análise do ciclo celular, nossos dados

mostram uma alta quantidade de células endoteliais mortas após tratamento com plasma urêmico, quando comparadas às células tratadas com plasma saudável, comprovando que a uremia gera injúria ao vaso e consequente disfunção endotelial, caracterizada pela morte celular e inibição da produção de moléculas capazes de sinalizar para a regeneração tecidual (FIGURAS 11A, 11B e 11C).

Os níveis circulantes de proteínas de fase aguda PCR e IL-6 estão aumentados em pacientes em hemodiálise confirmando que a inflamação sistêmica é um evento persistente nesses pacientes. Além disso, há uma correlação positiva significativa entre os níveis plasmáticos de IL-8, marcador de dano endotelial com os níveis de CXCL12, marcador de regeneração tecidual. Indicativo de geração de dano endotelial causado pela uremia e consequente sinalização de reparo. Os níveis de CXCL12 em sobrenadante de células tratadas com plasma urêmico são diminuídos quando comparados aos níveis de CXCL12 em sobrenadante de células tratadas com plasma saudável. O que vêm confirmar o dano gerado pela uremia. Estes achados podem ser explicados possivelmente por saturação dos receptores CXCR4 e CXCR7, específicos da CXCL12 ou por deficiência na produção de NO, uma importante molécula reguladora da produção de quimiocinas. Corroborando a estes resultados temos as análises do ciclo celular que demonstram que a uremia gera graves conseqüências às células, levando à morte por apoptose.

Com base nesses resultados sugerimos que a ação da uremia em pacientes em hemodiálise, gera danos vasculares intensos. Entretanto, estudos adicionais são necessários para avaliar se a diminuição nos níveis *in vitro* de CXCL12 se deve a diminuição nos níveis de NO ou saturação de seus receptores e se o aumento nos níveis plasmáticos de CXCL12 reflete a sinalização ao reparo celular induzida pela toxicidade urêmica.

8.CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- Os níveis plasmáticos das quimiocinas IL-8 e CXCL12, marcadores de disfunção endotelial e regeneração celular, mostraram-se positivamente correlacionados nos pacientes em hemodiálise, e esta correlação ocorre em paralelo ao aumento dos marcadores de inflamação sistêmica (PCR e IL-6);
- Os níveis de CXCL12 estão diminuídos em sobrenadante de HUVECs após exposição ao plasma urêmico, sugerindo que a uremia interfere na resposta do endotélio à produção desta quimiocina;
- A avaliação do ambiente urêmico na proliferação e morte celular indica que a uremia causa lesão ao endotélio, gerando morte. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar seu real papel na toxicidade urêmica e inibição de sinalização e regeneração vascular.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- ABBASI, M., CHERTOW, G., HALL, Y. End-stage Renal Disease. **American Family Physician** v. 82 n.12 p. 1512, 2010.
- ABI-YOUNES, S., SAUTY, A., MACH, F., SUKHOVA, G. K., LIBBY, P., LUSTER, A. D. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. **Circulation Research**, v. 86 n. 2 p. 131-8., 2000.
- ADDABBO, F., MALLAMACI, F., LEONARDIS, D., TRIPEPI, R., TRIPEPI, G., GOLIGORSKY, M. S., ZOCCALI, C. Searching for biomarker patterns characterizing carotid atherosclerotic burden in patients with reduced renal function. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 22 n. 12 p. 3521-6, 2007.
- ALLEN, S. J., CROWN, S. E., HANDEL, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. **Annual Review of Immunology** v. 25: p. 787-820, 2007.
- APOSTOLAKIS, S., PAPADAKIS, E. G., KRAMBOVITIS, E., SPANDIDOS, D. A. Chemokines in vascular pathology (review). **International Journal of Molecular Medicine** v. 17 n. 5 p. 691-701, 2006.
- APOSTOLAKIS, S., VOGIATZI, K., AMANATIDOU, V., SPANDIDOS, D. A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research** v. 84 n. 3 p. 353-60, 2009.
- ARA, T., TOKOYODA, K., OKAMOTO, R., KONI, P. A., NAGASAWA, T. The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. **Blood** v. 105 n. 8 p. 3155-61, 2005.
- ARICI, M. E WALLS, J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? **Kidney International** v. 59 n.2 p. 407-14, 2001.
- BACHMANN, S., BOSSE, H. M., MUNDEL, P. Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. **American Journal of Physiology** v. 268 n. 5 Pt 2 p. 885-98, 1995.
- BACHMANN, S. E MUNDEL, P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization, and function. **American Journal of Kidney Disease** v. 24 n. 1 p. 112-29, 1994.
- BALLOU, S. P. E KUSHNER, I. C-reactive protein and the acute phase response. **Advances in Internal Medicine** v. 37 p. 313-36, 1992.
- BARBIERI, F., BAJETTO, A., PORCILE, C., PATTAROZZI, A., SCETTINI, G., FLORIO, T. Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. **Journal of Molecular Endocrinology** v. 38 n. 3 p. 383-9, 2007.
- BASTOS, M. G. E KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** v. 33 n. 1 p. 93-108, 2011.
- BECHER, M. U., NICKENIG, G., WERNER, N. Regeneration of the vascular compartment. **Herz** v. 35 n. 5 p. 342-51, 2010.
- BEN-BARUCH, A., XU, L., YOUNG, P. R., BENGALI, K., OPPENHEIM, J. J., WANG, J. M. Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors. C-C CKR1, a receptor for macrophage inflammatory protein-1 alpha/Rantes, is also a functional receptor for MCP3. **The Journal of Biological Chemistry** v. 270 n. 38 p. 22123-8, 1995.

- BOGER, R. H., BODE-BOGER, S. M., TSAO, P. S., LIN, P. S., CHAN, J. R., COOKE, J. P. An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase regulates endothelial adhesiveness for monocytes. **Journal of the American College of Cardiology** v. 36 n. 7 p. 2287-95, 2000.
- BONAVIA, R., BAJETTO, A., BARBERO, S., PIRANI, P., FLORIO, T., SCHETTINI, G. Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. **Toxicology Letters** v. 139 n. 2-3 p. 181-9, 2003.
- BRAUNERSREUTHER, V., MACH, F., STEFFENS, S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 97 n. 5 p. 714-21, 2007.
- BRENNER, B. M. E HUMES, H. D. Mechanics of glomerular ultrafiltration. **The New England Journal of Medicine** v. 297 n. 3 p. 148-54, 1977.
- BUCHARLES, S., BARBERATO, S. H., STINGHEN, A. E., GRUBER, B., MEISTER, H., MEHL, A., PIEKALA, L., DAMBISKI, A. C., SOUZA, A., OLANDOSKI, M., PECOITS-FILHO, R. Hypovitaminosis D is associated with systemic inflammation and concentric myocardial geometric pattern in hemodialysis patients with low iPTH levels. **Nephron Clinical Practice** v. 118 n. 4 p. 384-91, 2011.
- BUSSOLINO, F., MANTOVANI, A., PERSICO, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. **Trends in Biochemical Sciences** v. 22 n. 7 p. 251-6, 1997.
- CAPLICE, N. M., WANG, S., TRACZ, M., CROATT, A. J., GRANDE, J. P., KATUSIC, Z. S., NATH, K. A. Neoangiogenesis and the presence of progenitor cells in the venous limb of an arteriovenous fistula in the rat. **American Journal of Physiology - Renal Physiology** v. 293 n. 2 p. 470-5, 2007.
- CARDINAL, H., RAYMOND, M. A., HEBERT, M. J., MADORE, F. Uraemic plasma decreases the expression of ABCA1, ABCG1 and cell-cycle genes in human coronary arterial endothelial cells. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 22 n. 2 p. 409-16, 2007.
- CARRERO, J. J. E STENVINKEL, P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 4 Suppl 1 p. 49-55, 2009.
- CHAN, J. R., BOGER, R. H., BODE-BOGER, S. M., TANGPHAO, O., TSAO, P. S., BLASCHKE, T. F., COOKE, J. P. Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 20 n. 4 p. 1040-6, 2000.
- CHECHERITA, I. A., DAVID, C., STOICA, L., POPESCU, P., CIOCALTEU, A., LASCAR, I. New mediators of vascular damage in dialysed patients. **Romanian Journal of Morphology and Embryology** v. 52 n. 2 p. 533-6, 2011.
- CHEN, J. Z., ZHU, J. H., WANG, X. X., XIE, X. D., SUN, J., SHANG, Y. P., GUO, X. G., DAI, H. M., HU, S. J. Effects of homocysteine on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 36 n. 2 p. 233-9, 2004.
- CHEN, M. L. E HSU, C. Y. Should the K/DOQI definition of chronic kidney disease be changed? **American Journal of Kidney Disease** v. 42 n. 4 p. 623-5, 2003.
- CHEN, Q., DONG, L., WANG, L., KANG, L., XU, B. Advanced glycation end products impair function of late endothelial progenitor cells through effects on protein kinase Akt and cyclooxygenase-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 381 n. 2 p. 192-7, 2009.
- CINES, D. B., POLLAK, E. S., BUCK, C. A., LOSCALZO, J., ZIMMERMAN, G. A., MCEVER, R. P., POBER, J. S., WICK, T. M., KONKLE, B. A., SCHWARTZ, B. S., BARNATHAN, E. S., MCCRAE, K. R., HUG, B. A., SCHMIDT, A. M., STERN, D. M. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. **Blood** 91(10): 3527-61, 1998.
- COLASANTI, M. E SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 21 n. 7 p. 249-52, 2000.

- COLOBRAN, R., PUJOL-BORRELL, R., ARMENGOL, M. P., JUAN, M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. **Clinical & Experimental Immunology** v. 150 n. 1 p.1-12, 2007.
- COSTA, V., SOMMESE, L., CASAMASSIMI, A., COLICCHIO, R., ANGELINI, C., MARCHESANO, V., MILONE, L., FARZATI, B., GIOVANE, A., FIORITO, C., RIENZO, M., PICARDI, M., AVALLONE, B., MARCO CORSI, M., SARUBBI, B., CALABRO, R., SALVATORE, P., CICCODICOLA, A., NAPOLI, C. Impairment of circulating endothelial progenitors in Down syndrome. **BMC Medical Genomics** v. 3 p. 40, 2010.
- CROSS, J. M., DONALD, A., VALLANCE, P. J., DEANFIELD, J. E., WOOLFSON, R. G., MACALLISTER, R. J. Dialysis improves endothelial function in humans. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 16 n. 9 p. 1823-9, 2001.
- DAYOUB, H., ACHAN, V., ADIMOOLAM, S., JACOBI, J., STUEHLINGER, M. C., WANG, B. Y., TSAO, P. S., KIMOTO, M., VALLANCE, P., PATTERSON, A. J., COOKE, J. P. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. **Circulation** v. 108 n. 24 p. 3042-7, 2003.
- DE CATERINA, R., LIBBY, P., PENG, H. B., THANNICKAL, V. J., RAJAVASHISTH, T. B., GIMBRONE, M. A., JR., SHIN, W. S., LIAO, J. K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. **The Journal of Clinical Investigation** v. 96 n. 1 p. 60-8, 1995.
- DE GROOT, K., BAHLMANN, F. H., SOWA, J., KOENIG, J., MENNE, J., HALLER, H., FLISER, D. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. **Kidney International** v. 66 n. 2 p. 641-6, 2004.
- DE LA LUZ SIERRA, M., YANG, F., NARAZAKI, M., SALVUCCI, O., DAVIS, D., YARCHOAN, R., ZHANG, H. H., FALES, H., TOSATO, G. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. **Blood** v. 103 n. 7 p. 2452-9, 2004.
- DE LA SIERRA, A. E LARROUSSE, M. Endothelial dysfunction is associated with increased levels of biomarkers in essential hypertension. **Journal of Human Hypertension** v. 24 n. 6 p. 373-9, 2010.
- DECAILLOT, F. M., KAZMI, M. A., LIN, Y., RAY-SAHA, S., SAKMAR, T. P., SACHDEV, P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. **The Journal of Biological Chemistry** v. 286 n. 37 p. 32188-97, 2011.
- DIAZ-BUXO, J. A. E WOODS, H. F. Protecting the endothelium: a new focus for management of chronic kidney disease. **Hemodialysis International** v. 10 n. 1 p. 42-8, 2006.
- DOR, A., PAULY, M. V., EICHLEAY, M. A., HELD, P. J. End-stage renal disease and economic incentives: the International Study of Health Care Organization and Financing (ISHCOF). **International Journal of Health Care Finance and Economics** v. 7 n. 2-3 p. 73-111, 2007.
- DOU, L., BERTRAND, E., CERINI, C., FAURE, V., SAMPOL, J., VANHOLDER, R., BERLAND, Y., BRUNET, P. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. **Kidney International** v. 65 n. 2 p. 442-51, 2004.
- DOU, L., JOURDE-CHICHE, N., FAURE, V., CERINI, C., BERLAND, Y., DIGNAT-GEORGE, F., BRUNET, P. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 5 n. 6 p. 1302-8, 2007.
- ELMADBOUH, I., HAIDER, HKH, JIANG, S., IDRIS, N. M., LU, G., ASHRAF, M. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1alpha promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 42 n. 4 p. 792-803, 2007.
- FARACI, F. M. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 23 n. 3 p. 371-3, 2003.

FAURE, V., DOU, L., SABATIER, F., CERINI, C., SAMPOL, J., BERLAND, Y., BRUNET, P., DIGNAT-GEORGE, F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 4 n. 3 p. 566-73, 2006.

FENG, B., ZHANG, Y. Q., MU, J., YUAN, F. H., YE, Z. L., QI, W., GUO, Y. H., ZENG, W., LUO, Z. F. Uraemic serum induces dysfunction of vascular endothelial cells: role of ubiquitin-proteasome pathway. **Experimental Physiology** v. 96 n. 8 p. 801-15, 2011.

GARCIA-ANDRES, C. E TORRES, M. Comparative expression pattern analysis of the highly conserved chemokines SDF1 and CXCL14 during amniote embryonic development. **Developmental Dynamics** v. 239 n. 10 p. 2769-77, 2010.

GERSZTEN, R. E., GARCIA-ZEPEDA, E. A., LIM, Y. C., YOSHIDA, M., DING, H. A., GIMBRONE, M. A., JR., LUSTER, A. D., LUSCINSKAS, F. W., ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature** v. 398 n. 6729 p. 718-23, 1999.

GHADGE, S. K., MUHLSTEDT, S., OZCELIK, C., BADER, M. SDF-1alpha as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. **Pharmacology & Therapeutics** v. 129 n.1 p. 97-108, 2010.

GLEICHMANN, M., GILLEN, C., CZARDYBON, M., BOSSE, F., GREINER-PETTER, R., AUER, J., MULLER, H. W. Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. **European Journal of Neuroscience** v. 12 n. 6 p. 1857-66, 2000.

GLORIEUX, G., VANHOLDER, R. New uremic toxins - which solutes should be removed? **Contributions to Nephrology** v. 168 p. 117-28, 2011.

GOLDSMITH, D. J., COVIC, A., FOUQUE, D., LOCATELLI, F., OLGAARD, K., RODRIGUEZ, M., SPASOVSKI, G., URENA, P., ZOCCALI, C., LONDON, G. M., VANHOLDER, R. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guidelines: a European Renal Best Practice (ERBP) commentary statement. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 25 n. 12 p. 3823-31, 2010.

GOSSL, M., MODDER, U. I., GULATI, R., RIHAL, C. S., PRASAD, A., LOEFFLER, D., LERMAN, L. O., KHOSLA, S., LERMAN, A. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with coronary retention of osteogenic endothelial progenitor cells. **European Heart Journal** v. 31 n. 23 p. 2909-14, 2010.

GRANATA, S., ZAZA, G., SIMONE, S., VILLANI, G., LATORRE, D., PONTRELLI, P., CARELLA, M., SCHENA, F. P., GRANDALIANO, G., PERTOSA, G. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. **BMC Medical Genomics** v. 10 p. 388, 2009.

HABAUZIT, D., BOUDOT, A., KERDVEL, G., FLOURIOT, G., PAKDEL, F. Development and validation of a test for environmental estrogens: Checking xeno-estrogen activity by CXCL12 secretion in BREAST CANCER CELL LINES (CXCL-test). **Environmental Toxicology and Pharmacology** v. 25 n. 5 p. 495-503, 2010.

HEHLGANS, T. E PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology** v. 115 n. 1 p. 1-20, 2005.

HERBRIG, K., GEBLER, K., OELSCHLAEGEL, U., PISTROSCH, F., FOERSTER, S., WAGNER, A., GROSS, P., PASSAUER, J. Kidney transplantation substantially improves endothelial progenitor cell dysfunction in patients with end-stage renal disease. **American Journal of Transplantation** v. 6 n. 12 p. 2922-8, 2006.

MK ILLUSTRATIONS Disponível em: <www.mkillustrations.com> Acesso em: 01/04/2012.

JAFFE, E. A., NACHMAN, R. L., BECKER, C. G., MINICK, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. **The Journal of Clinical Investigation** v. 52 n. 11 p. 2745-56, 1973.

JENSEN, H. S. C-reactive protein. **Ugeskrift for Læger** v. 162 n. 17 p. 2453-6, 2000.

JIE, K. E., ZAIKOVA, M. A., BERGEVOET, M. W., WESTERWEEL, P. E., RASTMANESH, M., BLANKESTIJN, P. J., BOER, W. H., BRAAM, B., VERHAAR, M. C. Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 25 n. 6 p. 1875-82, 2010.

JOHNSTON, B. E BUTCHER, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. **Seminars in Immunology** v. 14 n. 2 p. 83-92, 2002.

JOURDE-CHICHE, N., DOU, L., CERINI, C., DIGNAT-GEORGE, F., BRUNET, P. Vascular incompetence in dialysis patients--protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. **Seminars in Dialysis** v. 24 n. 3 p. 327-37, 2011.

JOURDE-CHICHE, N., DOU, L., SABATIER, F., CALAF, R., CERINI, C., ROBERT, S., CAMOIN-JAU, L., CHARPIOT, P., ARGILES, A., DIGNAT-GEORGE, F., BRUNET, P. Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 7 n. 9 p. 1576-84, 2009.

JUPP, S., KLEIN, J., SCHANSTRA, J., STEVENS, R. Developing a kidney and urinary pathway knowledge base. **Journal of Biomedical Semantics** v. 2 Suppl 2 p. S7, 2011.

K/DOQI., Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **American Journal of Kidney Diseases** v. 39 n. 2 Suppl 1 p. S1-266, 2002.

KAO, M. P., ANG, D. S., PALL, A., STRUTHERS, A. D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension** v. 24 n. 1 p. 1-8, 2010.

KARIN, N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. **Journal of Leukocyte Biology** v. 88 n. 3 p. 463-73, 2010.

KATO, S., LINDHOLM, B., AXELSSON, J., QURESHI, R. A., BARANY, P., HEIMBURGER, O., GUSTAFSSON, J. A., STENVINKEL, P., NORDFORS, L. Association between oestrogen receptor alpha gene polymorphism and mortality in female end-stage renal disease patients. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 22 n. 9 p. 2571-7, 2007.

KHARAIT, S., HADDAD, D. J., SPRINGER, M. L. Nitric oxide counters the inhibitory effects of uremic toxin indoxyl sulfate on endothelial cells by governing ERK MAP kinase and myosin light chain activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 409 n. 4 p. 758-63, 2011.

KINNAIRD, T., STABILE, E., BURNETT, M. S., LEE, C. W., BARR, S., FUCHS, S., EPSTEIN, S. E. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. **Circulation Research** v. 94 n. 5 p. 678-85, 2004.

KISHIMOTO, H., WANG, Z., BHAT-NAKSHATRI, P., CHANG, D., CLARKE, R., NAKSHATRI, H. The p160 family coactivators regulate breast cancer cell proliferation and invasion through autocrine/paracrine activity of SDF-1alpha/CXCL12. **Carcinogenesis** 26(10): 1706-15, 2005.

KISHIMOTO, T. The biology of interleukin-6. **Blood** v. 74 n. 1 p. 1-10, 1989.

KOVESDY, C. P. E KALANTAR-ZADEH, K. Review article: Biomarkers of clinical outcomes in advanced chronic kidney disease. **Nephrology (Carlton)** v. 14 n. 4 p. 408-15, 2009.

- KUCIA, M., JANKOWSKI, K., RECA, R., WYSOCZYNSKI, M., BANDURA, L., ALLENDORF, D. J., ZHANG, J., RATAJCZAK, J., RATAJCZAK, M. Z. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. **Journal of Molecular Histology** v. 35 n. 3 p. 233-45, 2004.
- KUSANO, K. F., NAKAMURA, K., KUSANO, H., NISHII, N., BANBA, K., IKEDA, T., HASHIMOTO, K., YAMAMOTO, M., FUJIO, H., MIURA, A., OHTA, K., MORITA, H., SAITO, H., EMORI, T., NAKAMURA, Y., KUSANO, I., OHE, T. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. **Circulation Journal** v. 68 n. 7 p. 671-6, 2004.
- LAPIDOT, T., DAR, A., KOLLET, O. How do stem cells find their way home? **Blood** v. 106 n. 6 p. 1901-10, 2005.
- LAURENCE, A. D. Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy. **British Journal of Haematology** v. 132 n. 3 p. 255-67, 2006.
- LEINIG, C. E., MORAES, T., RIBEIRO, S., RIELLA, M. C., OLANDOSKI, M., MARTINS, C., PECOITS-FILHO, R. Predictive value of malnutrition markers for mortality in peritoneal dialysis patients. **Journal of Renal Nutrition** v. 21 n. 2 p. 176-83, 2011.
- LENTZ, S. R. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis** v. 3 n. 8 p. 1646-54, 2005.
- LI, A., DUBEY, S., VARNEY, M. L., DAVE, B. J., SINGH, R. K. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. **The Journal of Immunology** v. 170 n. 6 p. 3369-76, 2003.
- LI, M., YU, J., LI, Y., LI, D., YAN, D., QU, Z., RUAN, Q. CXCR4 positive bone mesenchymal stem cells migrate to human endothelial cell stimulated by ox-LDL via SDF-1 α /CXCR4 signaling axis. **Experimental and Molecular Pathology** v. 88 n. 2 p. 250-5, 2010.
- LINDEN, E., CAI, W., HE, J. C., XUE, C., LI, Z., WINSTON, J., VLASSARA, H., URIBARRI, J. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 3 n. 3 p. 691-8, 2008.
- LUKER, K., GUPTA, M., LUKER, G. Bioluminescent CXCL12 fusion protein for cellular studies of CXCR4 and CXCR7. **Biotechniques** v. 47 n. 1 p. 625-32, 2009.
- MA, Q., JONES, D., SPRINGER, T. A. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. **Immunity** v. 10 n. 4 p. 463-71, 1999.
- MALYSZKO, J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta** v. 411 n. 19-20 p. 1412-20, 2010.
- MANABE, I. Chronic Inflammation Links Cardiovascular, Metabolic and Renal Diseases. **Circulation Journal**, 2011.
- MARIOTTO, S., MENEGAZZI, M., SUZUKI, H. Biochemical aspects of nitric oxide. **Current Pharmaceutical Design** v. 10 n. 14 p. 1627-45, 2004.
- MARTENS, C. R. E EDWARDS, D. G. Peripheral vascular dysfunction in chronic kidney disease. **Cardiology Research and Practice** v. 2011 p. 9, 2011.
- MARTIN, B. J. E ANDERSON, T. J. Risk prediction in cardiovascular disease: the prognostic significance of endothelial dysfunction. **The Canadian Journal of Cardiology** v. 25 Suppl A p. 15A-20A, 2009.
- MARTINS, S. Renal dysfunction in acute coronary syndrome--an epidemic for the 21st century? **Revista Portuguesa de Cardiologia** v. 29 n. 9 p. 1355-62, 2010.

- MATSUO, Y., OCHI, N., SAWAI, H., YASUDA, A., TAKAHASHI, H., FUNAHASHI, H., TAKEYAMA, H., TONG, Z., GUHA, S. CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer. **International Journal of Cancer** v. 124 n. 4 p. 853-61, 2009.
- MBANYA, JEAN-CLAUDE., GAN, D., ALLGOT, B., BAKKER, K., BROWN, J. B., RAMACHANDRAN, A., ROGLIC, G., SHAW, J., SILINK, M., SIMINERIO, L., SOLTÉSZ, G., WILLIAMS, R., ZIMMET, P. **Diabetes Atlas**. D. Gan. Brussels - Belgium p. 387, 2006.
- MEIJERS, B. K., VAN KERCKHOVEN, S., VERBEKE, K., DEHAEN, W., VANRENTERGHEM, Y., HOYLAERTS, M. F., EVENEPOEL, P. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. **American Journal of Kidney Diseases** v. 54 n. 5 p. 891-901, 2009.
- METSUYANIM, S., LEVY, R., DAVIDOVITS, M., DEKEL, B. Molecular evaluation of circulating endothelial progenitor cells in children undergoing hemodialysis and after kidney transplantation. **Pediatric Research** v. 65 n. 2 p. 221-5, 2009.
- MONTANES BERMUDEZ, R., GRACIA GARCIA, S., PEREZ SURRIBAS, D., MARTINEZ CASTELAO, A., BOVER SANJUAN, J. Consensus document. Recommendations on assessing proteinuria during the diagnosis and follow-up of chronic kidney disease. **Nefrologia** v. 31 n. 3 p. 331-45, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** v. 65 n. 1-2 p. 55-63, 1983.
- MULLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MCCLANAHAN, T., MURPHY, E., YUAN, W., WAGNER, S. N., BARRERA, J. L., MOHAR, A., VERASTEGUI, E., ZLOTNIK, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature** v. 410 n. 6824 p. 50-6, 2001.
- NAGASAWA, T., HIROTA, S., TACHIBANA, K., TAKAKURA, N., NISHIKAWA, S., KITAMURA, Y., YOSHIDA, N., KIKUTANI, H., KISHIMOTO, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature** v. 382 n. 6592 p. 635-8, 1996.
- NANAYAKKARA, P. W. E GAILLARD, C. A Vascular disease and chronic renal failure: new insights. **The Netherlands Journal of Medicine** v. 68 n. 1 p. 5-14, 2010.
- NHLBI. National Heart, Lung, and Blood Institute - The Framingham Heart Study. (1948). Disponível em: <<http://www.framingham.com/heart/index.html>>. Acesso em 12/11/11.
- NICOLETTI, I., MIGLIORATI, G., PAGLIACCI, M. C., GRIGNANI, F., RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods** v. 139 n. 2 p. 271-9, 1991.
- NOH, H., YU, M. R., KIM, H. J., JEON, J. S., KWON, S. H., JIN, S. Y., LEE, J., JANG, J., PARK, J. O., ZIYADEH, F., HAN, D. C., LEE, H. B. Uremia induces functional incompetence of bone marrow-derived stromal cells. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 2011 n. 0 p. 1-8, 2011.
- OBBERG, B. P., MCMENAMIN, E., LUCAS, F. L., MCMONAGLE, E., MORROW, J., IKIZLER, T. A., HIMMELFARB, J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. **Kidney International** v. 65 n. 3 p. 1009-16, 2004.
- PALAMA, I. E., MUSARO, M., COLUCCIA, A. M., D'AMONE, S., GIGLI, G. Cell Uptake and Validation of Novel PECs for Biomedical Applications. **Journal of Drug Delivery** v. 2011 p. 7 2011.
- PAULUS, P., JENNEWEIN, C., ZACHAROWSKI, K. Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? **Biomarkers** v. 16 Suppl 1 p. S11-2, 2011.
- PAWLAK, K., PAWLAK, D., MYSLIWIEC, M. Impaired renal function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease. **Clinical Biochemistry** v. 40 n. 1-2 p. 81-5, 2007.

PECOITS-FILHO, R. LINDHOLM, B., STENVINKEL, P. End-stage renal disease: a state of chronic inflammation and hyperleptinemia. **European Journal of Clinical Investigation** v. 33 n. 6 p. 527-8, 2003.

PEPYS, M. B. E BALTZ, M. L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. **Advances in Immunology** v. 34 p. 141-212, 1983.

PODDAR, R., SIVASUBRAMANIAN, N., DIBELLO, P. M., ROBINSON, K., JACOBSEN, D. W. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. **Circulation** v. 103 n. 22 p. 2717-23, 2001.

RECIO-MAYORAL, A., BANERJEE, D., STREATHER, C., KASKI, J. C. Endothelial dysfunction, inflammation and atherosclerosis in chronic kidney disease--a cross-sectional study of predialysis, dialysis and kidney-transplantation patients. **Atherosclerosis** v. 216 n. 2 p. 446-51, 2011.

RHEE, E. P., SOUZA, A., FARRELL, L., POLLAK, M. R., LEWIS, G. D., STEELE, D. J., THADHANI, R., CLISH, C. B., GREKA, A., GERSZTEN, R. E. Metabolite profiling identifies markers of uremia. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 21 n. 6 p. 1041-1051, 2010.

RUAN, X. AND Y. GUAN Metabolic syndrome and chronic kidney disease. **Journal of Diabetes** v. 1 n. 4 p. 236-45, 2009.

RUEDA, P., BALABANIAN, K., LAGANE, B., STAROPOLI, I., CHOW, K., LEVOYE, A., LAGURI, C., SADIR, R., DELAUNAY, T., IZQUIERDO, E., PABLOS, J. L., LENDINEZ, E., CARUZ, A., FRANCO, D., BALEUX, F., LORTAT-JACOB, H., ARENZANA-SEISDEDOS, F. The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. **PLoS One** v. 3 n. 7 p. e2543, 2008.

SABATIER, F., CAMOIN-JAU, L., ANFOSSO, F., SAMPOL, J., DIGNAT-GEORGE, F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** v. 13 n. 3 p. 454-71, 2009.

SCALERA, F., BORLAK, J., BECKMANN, B., MARTENS-LOBENHOFFER, J., THUM, T., TAGER, M., BODE-BOGER, S. M. Endogenous nitric oxide synthesis inhibitor asymmetric dimethyl L-arginine accelerates endothelial cell senescence. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 24 n. 10 p. 1816-22, 2004.

SCIENCE AND TECHNOLOGY. Disponível em: <http://technologysifi.blogspot.com.br/2010/03/excretory-systemthe-kidney.htm> Acesso em: 01/04/2012.

SEGAL, M. S., BAYLIS, C., JOHNSON, R. J. Endothelial health and diversity in the kidney. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 17 n. 2 p. 323-4, 2006.

SENGOELGE, G., FODINGER, M., SKOUPY, S., FERRARA, I., ZANGERLE, C., ROGY, M., HORL, W. H., SUNDER-PLASSMANN, G., MENZEL, J. Endothelial cell adhesion molecule and PMNL response to inflammatory stimuli and AGE-modified fibronectin. **Kidney International** v. 54 n. 5 p. 1637-51, 1998.

SERRADELL, M., DIAZ-RICART, M., CASES, A., PETRIZ, J., ORDINAS, A., ESCOLAR, G. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 18 n. 6 p. 1079-85, 2003.

SESSO RDE, C., LOPES, A. A., THOME, F. S., LUGON, J. R., BURDMANN EDE, A. Brazilian dialysis census, 2009. **Jornal Brasileiro de Nefrologia** v. 32 n. 4 p. 374-8, 2010.

SESSO RDE, C., LOPES, A. A., THOME, F. S., LUGON, J. R., BURDMANN EDE, A. Brazilian dialysis census, 2010. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2011.

SHEEN, Y. J. E SHEU, W. H. Metabolic syndrome and renal injury. **Cardiology Research and Practice** v. 2011 p. 6, 2011.

SHIROZU, M., NAKANO, T., INAZAWA, J., TASHIRO, K., TADA, H., SHINOHARA, T., HONJO, T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. **Genomics** v. 28 n. 3 p. 495-500, 1995.

SHLIPAK, M. G., FRIED, L. F., CRUMP, C., BLEYER, A. J., MANOLIO, T. A., TRACY, R. P., FURBERG, C. D., PSATY, B. M. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. **Circulation** v. 107 n. 1 p. 87-92, 2003.

STENVINKEL, P., CARRERO, J. J., AXELSSON, J., LINDHOLM, B., HEIMBURGER, O., MASSY, Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 3 n. 2 p. 505-21, 2008.

STENVINKEL, P., KARIMI, M., JOHANSSON, S., AXELSSON, J., SULIMAN, M., LINDHOLM, B., HEIMBURGER, O., BARANY, P., ALVESTRAND, A., NORDFORS, L., QURESHI, A. R., EKSTROM, T. J., SCHALLING, M. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? **Journal of Internal Medicine** v. 261 n. 5 p. 488-99, 2007.

STENVINKEL, P., LINDHOLM, B., HEIMBURGER, M., HEIMBURGER, O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 15 n. 10 p. 1624-30, 2000.

STENVINKEL, P., PECOITS-FILHO, R., LINDHOLM, B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 14 n. 7 p. 1927-39, 2003.

STINGHEN, A. E., GONCALVES, S. M., BUCHARLES, S., BRANCO, F. S., GRUBER, B., HAUSER, A. B., PECOITS-FILHO, R. Sevelamer decreases systemic inflammation in parallel to a reduction in endotoxemia. **Blood Purification** v. 29 n. 4 p. 352-6, 2010.

STINGHEN, A. E., GONCALVES, S. M., MARTINES, E. G., NAKAO, L. S., RIELLA, M. C., AITA, C. A., PECOITS-FILHO, R. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron Clinical Practice** v. 111 n. 2 p. c117-26, 2009.

STINGHEN, A. E. E PECOITS-FILHO, R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. **International Journal of Hypertension** v. 2011 p. 7, 2011.

SULIMAN, M. E., QURESHI, A. R., HEIMBURGER, O., LINDHOLM, B., STENVINKEL, P. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: a predictor of outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 21 n. 6 p. 1603-10, 2006.

SULIMAN, M. E. E STENVINKEL, P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation** v. 19 n. 3 p. 329-45, 2008.

SUN, C., LIANG, C., REN, Y., ZHEN, Y., HE, Z., WANG, H., TAN, H., PAN, X., WU, Z. Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways. **Basic Research in Cardiology** v. 104 n. 1 p. 42-9, 2009.

SUWANNAPRAPHA, P., CHAISRI, U., RIYONG, D., MANEERAT, Y. Improvement of function and morphology of tumor necrosis factor-alpha treated endothelial cells with 17-beta estradiol: a preliminary study for a feasible simple model for atherosclerosis. **Circulation Journal** v. 69 n. 6 p. 730-8, 2005.

TAKABATAKE, Y., SUGIYAMA, T., KOHARA, H., MATSUSAKA, T., KURIHARA, H., KONI, P. A., NAGASAWA, Y., HAMANO, T., MATSUI, I., KAWADA, N., IMAI, E., NAGASAWA, T., RAKUGI, H., ISAKA, Y. The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis is essential for the development of renal vasculature." **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 20 n. 8 p. 1714-23, 2009.

THUM, T., TSIKAS, D., STEIN, S., SCHULTHEISS, M., EIGENTHALER, M., ANKER, S. D., POOLE-WILSON, P. A., ERTL, G., BAUERSACHS, J. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. **Journal of the American College of Cardiology** v. 46 n. 9 p. 1693-701, 2005.

TUMUR, Z., SHIMIZU, H., ENOMOTO, A., MIYAZAKI, H., NIWA, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **American Journal of Kidney Diseases** v. 31 n. 5 p. 435-41, 2010.

TYAGI, N., SEDORIS, K. C., STEED, M., OVECHKIN, A. V., MOSHAL, K. S., TYAGI, S. C. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress." **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology** v. 289 n. 6 p. H2649-56, 2005.

UNGVARI, Z., CSISZAR, A., EDWARDS, J. G., KAMINSKI, P. M., WOLIN, M. S., KALEY, G., KOLLER, A. Increased superoxide production in coronary arteries in hyperhomocysteinemia: role of tumor necrosis factor-alpha, NAD(P)H oxidase, and inducible nitric oxide synthase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 23 n. 3 p. 418-24, 2003.

UNIGENE. CXCL12 chemokine (C-X-C motif) ligand 12 [Homo sapiens] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6387> Acesso em 16/11/2011,

URBICH, C. E DIMMELER, S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circulation Research** v. 95 n. 4 p. 343-53, 2004.

VALLANCE, P., LEONE, A., CALVER, A., COLLIER, J., MONCADA, S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. **Lancet** v. 339 n. 8793 p. 572-5, 1992.

VAN HINSBERGH, V. W. E VAN NIEUW AMERONGEN, G. P. Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. **Journal of Anatomy** v. 200 n. 6 p. 549-60, 2002.

VANHOLDER, R., BAURMEISTER, U., BRUNET, P., COHEN, G., GLORIEUX, G., JANKOWSKI, J. A bench to bedside view of uremic toxins. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 19 n. 5 p. 863-70, 2008.

VANHOLDER, R., DE SMET, R., GLORIEUX, G., ARGILES, A., BAURMEISTER, U., BRUNET, P., CLARK, W., COHEN, G., DE DEYN, P. P., DEPPISCH, R., DESCAMPS-LATSCHA, B., HENLE, T., JORRES, A., LEMKE, H. D., MASSY, Z. A., PASSLICK-DEETJEN, J., RODRIGUEZ, M., STEGMAYR, B., STENVINKEL, P., TETTA, C., WANNER, C., ZIDEK, W. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International** v. 63 n. 5 p. 1934-43, 2003.

VANHOLDER, R., VAN LAECKE, S., GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology** v. 23 n. 8 p. 1211-21, 2008.

VASDEV, S., GILL, V., SINGAL, P. Role of advanced glycation end products in hypertension and atherosclerosis: therapeutic implications. **Cell Biochemistry and Biophysics** v. 49 n. 1 p. 48-63, 2007.

WASER, J., BUDDE, K., KATALINIC, A., KUERZDORFER, M., RIESS, R., NEUMAYER, H. H. Interleukin-6 expression after renal transplantation. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 12 n. 4 p. 753-9, 1997.

WALLIS, R. S. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. **The Lancet Infectious Diseases** v. 8 n. 10 p. 601-11, 2008.

- WANG, H., YOSHIZUMI, M., LAI, K., TSAI, J. C., PERRELLA, M. A., HABER, E., LEE, M. E. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. **The Journal of Biological Chemistry** v. 272 n. 40 p. 25380-5, 1997.
- WAUTIER, J. L., ZOUKOURIAN, C., CHAPPEY, O., WAUTIER, M. P., GUILLAUSSEAU, P. J., CAO, R., HORI, O., STERN, D., SCHMIDT, A. M. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats." **The Journal of Clinical Investigation** v. 97 n. 1 p. 238-43, 1996.
- WAUTIER, M. P., CHAPPEY, O., CORDA, S., STERN, D. M., SCHMIDT, A. M., WAUTIER, J. L. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism** v. 280 n. 5 p. E685-94, 2001.
- WERNER, N. E NICKENIG, G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** v. 26 n. 2 p. 257-66, 2006.
- WESOLY, J., SIKORSKI, K., LEE, C. K., BLUYSSSEN, H. A. Suppressor of cytokine signaling and accelerated atherosclerosis in kidney disease. **Acta Biochimica Polonica** v. 57 n. 3 p. 251-60, 2010.
- WONG, D. E KORZ, W. Translating an Antagonist of Chemokine Receptor CXCR4: from bench to bedside. **Clinical Cancer Research** v. 14 n. 24 p. 7975-80, 2008.
- YAMAGISHI, S. E MATSUI, T. Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-Friend or foe? **Pharmacological Research** v. 64 n. 3 p. 187-94, 2011.
- YAMAMOTO, S. E KON, V. Mechanisms for increased cardiovascular disease in chronic kidney dysfunction. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension** v. 18 n. 3 p. 181-8, 2009.
- YU, L., CECIL, J., PENG, S. B., SCHREMENTI, J., KOVACEVIC, S., PAUL, D., SU, E. W., WANG, J. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. **Gene** v. 374 p. 174-9, 2006.
- ZAOUI, P., HAKIM, R. M. The effects of the dialysis membrane on cytokine release. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology** v. 4 n. 9 p. 1711-8, 1994.
- ZAZA, G., PONTRELLI, P., PERTOSA, G., GRANATA, S., ROSSINI, M., PORRECA, S., STAAL, F. J., GESUALDO, L., GRANDALIANO, G., SCHENA, F. P. Dialysis-related systemic microinflammation is associated with specific genomic patterns. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 23 n. 5 p. 1673-81, 2008.
- ZOCCALI, C., MALLAMACI, F., TRIPEPI, G. Inflammatory proteins as predictors of cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation** v. 19 Suppl 5 p. V67-72, 2004.

ANEXO I



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 04 de agosto de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Andréa Emília Marques Stinghen
Vanessa Ribeiro
Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da expressão do gene CXCL12 e associação à resposta inflamatória em pacientes com doença renal crônica**" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 04 de agosto de 2010.

Registro CEP/SD: 954.079.10.07

CAAE: 0054.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 04/02/2011.

Atenciosamente

Prof. Dra. Líliana Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Setor de Ciências da Saúde

Prof. Dra. Líliana Maria Labronici
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE CORDÃO UMBILICAL

Você, mulher em trabalho de parto, que **não** apresenta pressão alta, sinais clínicos de inflamação aguda, doença infecciosa, histórico de câncer, doenças auto-imunes, hepatite ou outra doença hepática atualmente ativa, que **não está** usando medicamentos imunossupressores, que **não tem** histórico de abuso de álcool ou drogas ilícitas, está sendo convidada a participar do estudo intitulado “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *CXCL12* E ASSOCIAÇÃO A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA. Para isto estamos solicitando sua colaboração através da doação do cordão umbilical, após o nascimento do seu bebê”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.

- (i) O objetivo desta pesquisa é avaliar se o paciente com doença renal crônica tem um aumento na manifestação de um gene específico. Por isso as células obtidas do cordão umbilical doado serão utilizadas como modelo para estudar inflamação, um processo que ocorre nos pacientes quando seus rins não funcionam corretamente;
- (ii) **Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento da doença renal crônica, e futuramente melhorar o diagnóstico da doença. Por isso a utilização de células endoteliais da veia do cordão umbilical de seu filho(a), poderá beneficiar outras pessoas portadoras da doença a um médio-longo prazo;**
- (iii) **O cordão umbilical, que a princípio seria descartado, será cortado por seu/sua obstetra, ou membro de sua equipe e utilizado somente após os procedimentos usuais de parto, sem causar nenhum dano físico ou moral, a você ou a seu bebê;**
- (iv) **Você poderá a qualquer momento (desde o início até o final da pesquisa) solicitar esclarecimentos sobre a pesquisa;**
- (v) **Você tem a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo;**
- (vi) **Sua privacidade está garantida quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;**
- (vii) **Você está doando e não vendendo, o cordão umbilical do seu bebê, portanto não receberá dinheiro por tal ato;**
- (viii) As pesquisadoras Andréa E. M. Stingham e Vanessa Ribeiro podem ser encontradas no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, no Departamento de Patologia Básica, sala 143A, pelo telefone: 3361-1691 das 8:30 às 17:30, ou pelos emails: andreastingham@ufpr.br e vane_ribeiro18@hotmail.com, para esclarecer eventuais dúvidas a respeito da pesquisa.

Eu, _____, portadora do RG _____, manifesto aqui meu consentimento em doar o cordão umbilical e participar da pesquisa intitulada “Avaliação da Expressão do Gene *CXCL12* e Associação à Resposta Inflamatória em Pacientes com Doença Renal Crônica”, sob responsabilidade da Prof^a. Dra. Andréa E. M. Stingham e sua orientada de pós- graduação Vanessa Ribeiro, na Universidade federal do Paraná, UFPR.

Nome, data e assinatura

Dra. Andréa _____

Mestranda Vanessa _____