

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LISIENNY CAMPOLI TONO REMPEL

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DE MCP-1 ENVOLVIDA NA DISFUNÇÃO  
ENDOTELIAL CAUSADA POR PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)**

CURITIBA  
2013

LISIENNY CAMPOLI TONO REMPEL

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DE MCP-1 ENVOLVIDA NA DISFUNÇÃO  
ENDOTELIAL CAUSADA POR PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Emilia Marques Stinghen

CURITIBA  
2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Rempel, Lisienny Campoli Tono

Avaliação *in vitro* da expressão de MCP-1 envolvida na disfunção endotelial causada por produtos de glicação avançada (AGES). / Lisienny Campoli Tono Rempel. – Curitiba, 2013.

64 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Andréa Emilia Marques Stingen

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

1. Rins - Doenças 2. Produtos Finais de Glicação I. Título II. Stingen, Andréa Emilia Marques III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.8765  
616.61



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

**“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DE MCP-1  
ENVOLVIDA NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL  
CAUSADA POR PRODUTOS DE GLICAÇÃO  
AVANÇADA (AGES)”**

Por

**LISIENNY CAMPOLI TONO REMPEL**

**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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Emília Marques Stingham (presidente)**

**Prof. Dr. Fellype de Carvalho Barrêto**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Frohlich Mercadante**

**Curitiba, 21 de junho de 2013.**

*Ao amor da minha vida, Thiago.*

*Aos meus pais, Samuel e Cineiva.*

*Ao meu irmão, Aharon.*

*Pela participação essencial de cada um em minha vida.*

*Pelo amor, suporte e apoio incondicionais a mim dedicados durante essa jornada.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por Seu grande amor por mim e por me presentear com o dom da vida. Por ter transformado e moldado meu coração de acordo com a Sua Palavra, dando-me a oportunidade de me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Por tudo que alcancei até aqui, pois a honra e a glória de tudo que tenho e conquistei são para Ele. Por ser essencial na minha vida, fonte de alegria plena. Por ser minha salvação ao sacrificar seu único Filho para que hoje eu pudesse ter vida, e vida em abundância.

Aos meus pais, Samuel e Cineiva, por suas infinitas demonstrações de amor e carinho. Pela constante motivação e amparo em prol aos estudos, que hoje valorizo mais do que nunca. Por serem exemplo a ser seguido, eternos estudiosos e pensadores. Pela intercessão, torcida e apoio durante o período de Mestrado. Por alegrarem-se comigo a cada nova vitória alcançada.

Ao meu marido e melhor amigo, Thiago, por me fazer a esposa mais feliz do mundo. Por me amar de forma tão sincera, cuidando de mim e se fazendo presente em todos os momentos da minha vida. Por ser meu refúgio, meu ouvinte, minha alegria. Por me incentivar a estudar, oferecendo todo suporte necessário para que eu chegasse até aqui. Por seu tempo dedicado a mim, seus conselhos e infinita paciência nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Stinghen, por acreditar em meu potencial e comprometimento. Por abrir as portas da UFPR para mim, junto às portas da pesquisa científica. Por transmitir seu conhecimento, abrindo minha mente ao mundo da Nefrologia Experimental. Por toda sua atenção no decorrer desses dois anos, mesmo que a uma grande distância física. Pelos ensinamentos, oferecendo-me oportunidades de crescimento profissional e pessoal. Por sua paciência e perseverança quando as coisas não aconteciam como o planejado. Por seu esforço em conceder a nós do laboratório um bom ambiente de trabalho.

À colega de trabalho do LabNefro, Rayana Maciel, por seu imenso companheirismo e ajuda a todo momento. Pelo apoio, encorajamento e pelos diversos momentos agradáveis e de descontração. À Bruna Bosquetti, que esteve sempre pronta

a ajudar no que fosse preciso, demonstrando real interesse pelas atividades propostas. À Vanessa Ribeiro, por ter me recebido com muito carinho no laboratório, ajudando-me de forma muito prestativa nos primeiros passos da execução do projeto.

Ao grupo “*Scientia Renal*” da PUC/PR, por suas valiosas contribuições no que tange a esse projeto. Um agradecimento especial ao Profº Drº Roberto Pecoits-Filho por inspirar cada vez mais pesquisadores a seguir os passos da pesquisa na Nefrologia.

À Profª Drª Fabiane Rego do Laboratório de Bioquímica Clínica, pela cooperação na dosagem de proteínas dos AGES e controles.

À Profª Drª Almeriane Santos do Laboratório de Hematologia, pela concessão da linhagem celular tumoral U-937 para a realização dos experimentos.

Aos colegas do laboratório de Imunoquímica, especialmente à Profª Drª Larissa Alvarenga, Profª Drª Juliana de Moura e Alessandra Becker, por suas constantes colaborações. Aos colegas do laboratório de Neurobiologia e de Microbiologia, pelas contribuições no auxílio e manuseio de equipamentos compartilhados.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Luciana Marques, por sua colaboração em processos administrativos referentes à minha pessoa ou ao projeto.

Aos funcionários do Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, por possibilitarem a cooperação nesse projeto, a partir da coleta de cordões umbilicais provenientes de parto. Agradeço ainda às gestantes que concordaram em ceder este material para a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e por subsidiar a aquisição de insumos através de verba distribuída ao Programa de Pós-Graduação.

Agradeço.

## RESUMO

A interação de toxinas urêmicas, tais como os produtos de glicação avançada (AGES), com o endotélio vascular desempenha um importante papel na fisiopatologia da disfunção endotelial relacionada à doença renal crônica (DRC). Estudos vêm demonstrando que a via PKC- $\beta$  é uma das principais vias mediadoras deste processo, levando a expressão de diversas moléculas, dentre elas o *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). O MCP-1 atua no recrutamento de monócitos do sangue periférico para a parede vascular, exercendo um papel essencial na formação da placa aterosclerótica e progressão da doença cardiovascular (DCV). O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o papel dos AGES na produção de MCP-1 via PKC- $\beta$ . Para tanto, células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVECs) foram extraídas e cultivadas em meio MEM-199 suplementado. Células U-937 (monócitos) foram cultivadas em meio RPMI suplementado. Foi estabelecido também o modelo de co-cultivo HUVECs + monócitos onde os tratamentos foram realizados logo após a inserção dos monócitos sobre as HUVECs. Os AGES foram preparados por reação de glicação da albumina bovina (BSA) com glicose. As HUVECs, monócitos e co-cultivo HUVECs + monócitos foram tratadas com BSA, AGES e AGES + inibidor da via PKC- $\beta$  e incubadas por 0, 3 e 6 horas. As HUVECs expostas aos AGES mostraram um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos níveis de MCP-1 após 3 e 6 horas ( $72 \pm 9$ ;  $77 \pm 12$  pg/mL, respectivamente), em comparação ao tempo 0 de tratamento ( $38 \pm 7$  pg/mL). Entretanto, HUVECs expostas aos AGES acrescido de inibidor da via PKC- $\beta$  demonstraram uma diminuição significativa ( $P < 0,005$ ) na expressão de MCP-1 após 3 e 6 horas ( $30 \pm 8$ ;  $20 \pm 7$  pg/mL, respectivamente), quando comparada ao tratamento apenas com AGES. O grupos de tratamento dos monócitos não evidenciaram diferenças significativas nas dosagens de MCP-1 após 3 e 6 horas. No modelo de co-cultivo HUVECs + monócitos, não foi observado diferença significativa nos níveis de MCP-1 dosados, sugerindo que uma cinética de tratamento maior seja necessária para evidenciar alterações na expressão dessa molécula. Os resultados alcançados propõem que a via PKC- $\beta$  contribui de forma importante na expressão de MCP-1 principalmente pelas HUVECs, mas as dosagens em monócitos sugerem que essa via também seja responsável pela produção de MCP-1 nessas células. Já no co-cultivo HUVECs + monócitos, a produção de MCP-1 esteve próxima dos níveis basais, levantando novos questionamentos acerca do comportamento de expressão dessa molécula após a adesão de monócitos à camada endotelial. Entretanto, mais experimentos devem ser elaborados para melhor entendimento dos mecanismos relacionados à disfunção endotelial mediada por AGES.

Palavras-chave: Doença renal crônica, disfunção endotelial, AGES, MCP-1.



## ABSTRACT

The interaction of uremic toxins, such as advanced glycation end products (AGES), to the vascular endothelium plays an important role in the pathophysiology of endothelial dysfunction related to chronic kidney disease (CKD). Studies have demonstrated that PKC- $\beta$  pathway is a major route mediating this process, leading to expression of several molecules, among them monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). MCP-1 acts in the recruitment of monocytes to the vascular wall, playing a major role in atherosclerotic plaque formation and progression of cardiovascular disease (CVD). This study aimed to evaluate *in vitro* the role of AGES in producing MCP-1 via PKC- $\beta$ . For this, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were extracted and cultured in MEM-199 supplemented. U-937 cells (monocytes) were cultured in RPMI supplemented. It was also established the model of co-cultivation HUVECs + monocytes where treatments were carried out immediately after insertion of monocytes on HUVECs. AGEs were prepared by reaction of glycation of bovine serum albumin with glucose. HUVECs, monocytes and co-culture HUVECs + monocytes were treated with BSA + AGES and AGES plus PKC- $\beta$  pathway inhibitor and incubated for 0, 3 and 6 hours. HUVECs exposed to AGES showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the levels of MCP-1 after 3 and 6 hours ( $72 \pm 9$ ;  $77 \pm 12$  pg/mL, respectively) compared to time 0 of treatment ( $38 \pm 7$  pg/mL). However, HUVECs exposed to AGES plus PKC- $\beta$  pathway inhibitor showed a significant difference ( $P < 0.005$ ) in the expression of MCP-1 after 3 and 6 hours ( $30 \pm 8$ ;  $20 \pm 7$  pg/mL, respectively), when compared to treatment with only AGES. In the model of co-culture HUVECs + monocytes there was no significant difference in levels of measured MCP-1, suggesting that a greater kinetic treatment is required to show changes in expression of this molecule. In the treatment of monocytes it was not observed a significant difference between the treatment groups after 3 and 6 hours. The obtained results propose that the PKC- $\beta$  pathway contributes importantly in the expression of MCP-1 mainly by HUVECs, but the dosages in monocytes suggest this pathway is also responsible for production of MCP-1 in these cells. In the co-culture HUVECs + monocytes, the production of MCP-1 was near baseline levels, raising new questions about the behavior of expression of this molecule after monocyte adhesion to the endothelial layer. However, further experiments should be designed to better understand the mechanisms related to endothelial dysfunction mediated by AGES.

Keywords: Chronic kidney disease, endothelial dysfunction, AGES, MCP-1.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - ESTRUTURA ANATÔMICA DO RIM E SUAS SUBUNIDADES.....	18
FIGURA 02 - FORMAÇÃO DE AGES A PARTIR DA REAÇÃO DE MAILLARD.....	22
FIGURA 03 - EFEITOS INTRACELULARES DOS AGES APÓS LIGAÇÃO COM RAGES EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	25
FIGURA 04 - INÍCIO E PROGRESSÃO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA.....	26
FIGURA 05 - RECRUTAMENTO, ADESÃO, ROLAMENTO E TRANSMIGRAÇÃO DE MONÓCITOS NO ENDOTÉLIO VASCULAR.....	27
FIGURA 06 - ESTRESSE OXIDATIVO NA HIPERGLICEMIA.....	30
FIGURA 07 - CORDÃO UMBILICAL RECÉM-COLETADO, EM MEIO DE TRANSPORTE.....	34
FIGURA 08 - SISTEMA FECHADO ESTABELECIDO EM VEIA DE CORDÃO UMBILICAL CONTENDO COLAGENASE PARA EXTRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	34
FIGURA 09 - FOTOMICROGRAFIA DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVECs) POR MICROSCOPIA ÓTICA (AUMENTO DE 10X).....	41
FIGURA 10 - CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	41
FIGURA 11 A/B - CO-CULTIVO HUVECs + MONÓCITOS (AUMENTO DE 10/20X) .....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01 - ABSORBÂNCIAS ENCONTRADAS NAS SOLUÇÕES DE AGES E CONTROLE BSA.....	43
GRÁFICO 02 - CURVA DE ABSORBÂNCIAS PADRÃO PARA AGES E CONTROLE BSA.....	43
GRÁFICO 03 - EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE MCP-1 EM SOBRENADANTE CELULAR DE HUVEC <sub>s</sub> APÓS 0, 3 E 6 HORAS.....	47
GRÁFICO 04 - EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE MCP-1 EM SOBRENADANTE CELULAR DE MONÓCITOS APÓS 0, 3 E 6 HORAS.....	49
GRÁFICO 05 - EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE MCP-1 EM SOBRENADANTE CELULAR DE HUVEC <sub>s</sub> + MONÓCITOS APÓS 0, 3 E 6 HORAS.....	50

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -EFEITOS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE C – $\beta$ .....	29
TABELA 02 -ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS PADRÃO, AGES E CONTROLE BSA.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGES	Produtos finais de glicação avançada
AGES-R1	Receptor de AGES (Oligosacaril-transferase-48)
b-FGF	<i>Basic fibroblast growth factor-human</i>
BSA -	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CEP/SD	Comitê de ética em pesquisa / Setor de Ciências da Saúde da UFPR
CML	N <sup>E</sup> -(carboximetil)lisina
Da	Daltons
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença cardiovascular
DRC	Doença renal crônica
ECGF	<i>Endothelial cell growth factor</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme linked absorbent assay</i>
HUVECs	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
KRP	<i>Krebs-Ringer phosphate buffer</i>
IL-1	<i>Interleukin-1</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
LFL-L	Polipeptídeo ligante do RAGE
M	Molar
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEM	<i>Minimal essential media</i>
mRNA	RNA mensageiro
N	Número total de amostras analisadas
nm	Nanômetros
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Proteína C reativa

PDG	Produtos de degradação da glicose
PKC- $\beta$	Proteína quinase C (isoforma beta)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
Q.S.P	Quantidade suficiente para
RAGES	<i>Receptors for advanced glycation end products</i>
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SFB	Soro fetal bovino
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA .....	17
2.2 TOXINAS URÊMICAS.....	19
2.3 AGES .....	21
2.4 RAGES .....	23
2.5 INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL.....	25
2.6 MCP-1.....	28
2.7 PROTEÍNA QUINASE C.....	29
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	32
4.1 OBJETIVO GERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
5.1 MATERIAL .....	33
5.2 MÉTODOS .....	33
5.2.1 <i>Extração, cultivo e caracterização de HUVECs</i> .....	33
5.2.2 <i>Células U-937</i> .....	35
5.2.3 <i>Preparo e caracterização de AGES e controle BSA</i> .....	36
5.2.4 <i>Tratamentos das células com AGES e BSA</i> .....	37
5.2.4.1 <i>HUVECs</i> .....	37
5.2.4.2 <i>Monócitos</i> .....	38
5.2.4.3 <i>Co-cultivo HUVECs + monócitos</i> .....	38
5.2.5 <i>Dosagens de MCP-1</i> .....	39
5.2.6 <i>Análise estatística</i> .....	39
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
6.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HUVECs.....	40
6.2 AGES E CONTROLE BSA .....	42
6.3 CO-CULTIVO HUVECs + MONÓCITOS .....	44
6.4 EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE MCP-1 .....	46
6.4.1 <i>HUVECs</i> .....	46
6.4.2 <i>Monócitos</i> .....	48
6.4.3 <i>Co-cultivo HUVECs + monócitos</i> .....	50
<b>7 ENSAIOS ADICIONAIS</b> .....	52
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
<b>APÊNDICE</b> .....	60
APÊNDICE I .....	60
APÊNDICE II .....	61
APÊNDICE III .....	62
<b>ANEXOS</b> .....	63
ANEXO I.....	63
ANEXO II.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que a doença renal crônica (DRC) é uma doença em crescimento exponencial e que a principal causa de morte dentre esses pacientes é a doença cardiovascular (DCV), correspondendo a uma incidência cinco vezes maior nesta população do que na população em geral (EL NAHAS, 2010; MEIJERS, 2010). Atualmente, existem aproximadamente 91 mil pessoas em tratamento dialítico no Brasil, sendo que os principais diagnósticos de base desses pacientes são hipertensão e diabetes *mellitus* (SBN, 2011). Com a progressão da doença, os rins perdem a capacidade de remover as toxinas urêmicas da circulação levando a uma resposta inflamatória sistêmica do organismo, e especialmente vascular (VANHOLDER, 2008).

Várias células estão envolvidas na resposta celular relacionada à uremia, dentre elas as células endoteliais e os monócitos. Estudos desenvolvidos por nosso grupo demonstraram recentemente que a ação das toxinas urêmicas nestas células pode levar ao aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias tais como citocinas e moléculas de adesão e contribuir assim para a iniciação e propagação da DCV nos pacientes com DRC (STINGHEN *et al.*, 2009). A interação do endotélio e células circulantes com as toxinas urêmicas pode refletir, ao menos em parte, os níveis plasmáticos elevados de marcadores de inflamação vascular tais como o *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), encontrado nestes pacientes (SEGAL, BAYLIS e JOHNSON, 2006; DIAZ-BUXO e WOODS, 2006).

Os produtos de glicação avançada (AGES) consistem num grupo heterogêneo de proteínas ou lipídeos modificados, através de reações não enzimáticas de glicação, e oxidados após contato com açúcares aldose. Em pacientes com DRC, eles passam a ser acumulados na circulação sanguínea, pois são moléculas de tamanho médio e de difícil remoção através da terapia de substituição renal convencional (diálise). Por isso são considerados toxinas urêmicas, os quais causam efeitos deletérios ao vaso, entre eles aumento na expressão de MCP-1 na parede vascular (VANHOLDER, 2008; SCHWEDLER *et al.*, 2001).

O MCP-1 tem sido apontado como grande mediador da inflamação crônica nos vasos sanguíneos de pacientes com DRC, promovendo a formação da placa



aterosclerótica. Essa molécula participa basicamente do recrutamento de monócitos para o local da lesão, fazendo com que os mesmos se acumulem na parede do vaso e migrem do endotélio para a camada média (músculo liso). Esses monócitos fagocitam LDL-oxidado e tornam-se células chamadas *foam cells*, formando o ateroma. Atualmente, o MCP-1 tem sido considerado um importante marcador de inflamação vascular (KOLATTUKUDY e NIU, 2012; ELMARAKBY e SULLIVAN, 2012).

A proteína quinase C (PKC) é reconhecida atualmente por seu papel relevante no aumento da expressão de MCP-1 pelo endotélio e também pela disfunção endotelial através do estresse oxidativo. Essa proteína pertence à família de quimiocinas CC, que consiste em enzimas que atuam na regulação da atividade de diversas outras proteínas, sendo que sua ativação ocorre principalmente em ambientes ricos em glicose e AGES (IDRIS E DONNELLY, 2006). Estudos mostram que a inibição da via de ativação dessa proteína pode ser efetiva na amenização dos efeitos patológicos causados nas células endoteliais (GERALDES e KING, 2010).

Desta forma, esclarecer os mecanismos envolvidos na aceleração da DCV mediada por AGES nos pacientes com DRC, através de uma abordagem *in vitro*, poderia contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta à toxicidade urêmica, possibilitando a descoberta de novos alvos de intervenções terapêuticas, levando a uma maior sobrevida do paciente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

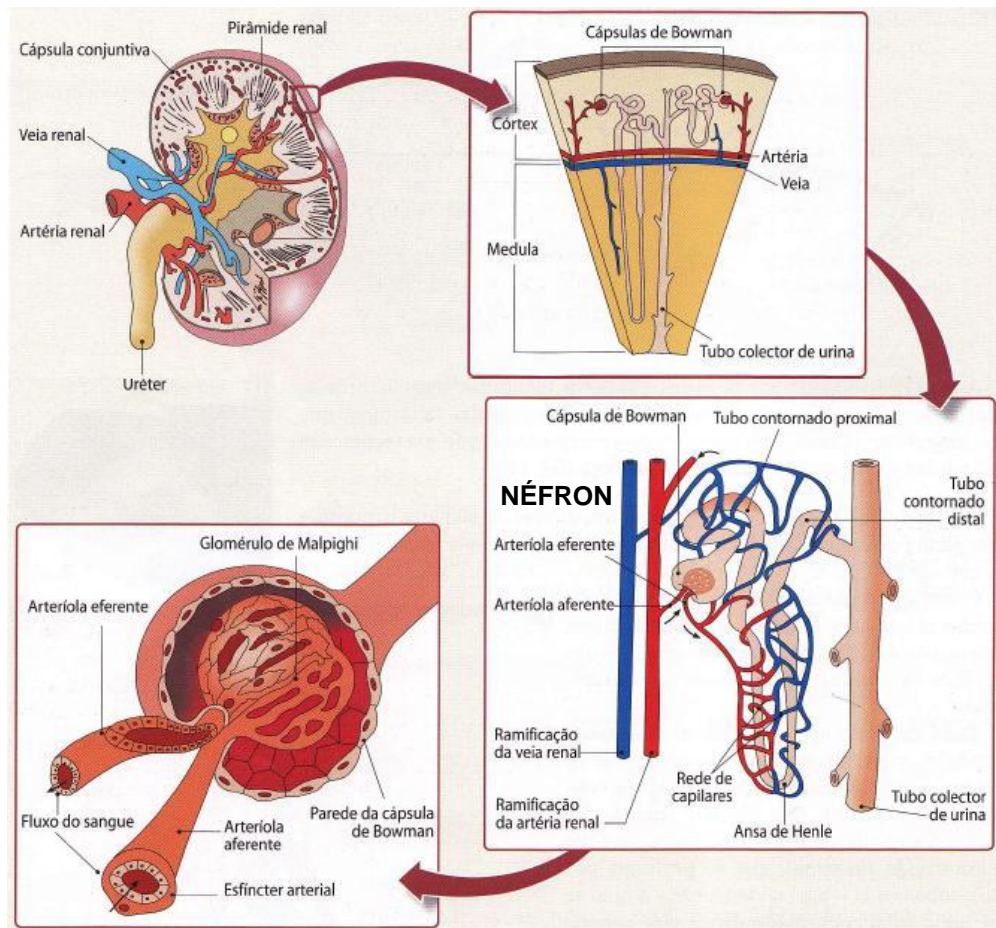
O sistema urinário do corpo humano é composto por rins, ureteres, bexiga e uretra. De acordo com Guyton e Hall (2011), o rim exerce diversas atividades importantes inerentes ao bom funcionamento do organismo, tais como:

- Regulação da osmolaridade e pressão arterial;
- Regulação dos equilíbrios hidroeletrolítico e ácido-básico;
- Regulação do volume sanguíneo;
- Gliconeogênese;
- Excreção de resíduos de degradação do metabolismo e produtos tóxicos;
- Secreção, metabolismo e excreção de hormônios, como a eritropoietina.

Os rins atuam na filtração do sangue para a remoção de compostos tóxicos circulantes no organismo, e essa eliminação ocorre através da urina. Eles são constituídos por néfrons e 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* (FIGURA 01). Para que o processo de filtração glomerular ocorra, o sangue é conduzido sob forte pressão ao interior dos capilares desse glomérulo, onde um quinto de seu volume é extravasado para a cápsula de *Bowman*, sendo chamado posteriormente de filtrado. 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 (GUYTON E HALL, 2011).

FIGURA 01 - ESTRUTURA ANATÔMICA DO RIM E SUAS SUBUNIDADES



FONTE: ADAPTADO DO ENDEREÇO ELETRÔNICO - WWW.RITA.WEBNODE.COM.

A DRC é uma doença em crescimento exponencial, e juntamente com outras doenças crônicas não transmissíveis, é responsável por 25 milhões de mortes ao ano, tendo como principal causa de morte as complicações relacionadas a doenças cardiovasculares (DCV), principalmente a aterosclerose (EL NAHAS, 2010). A DRC

caracteriza-se por lesão ou comprometimento funcional nos rins por tempo igual e/ou superior a três meses, acompanhada de albuminúria ou proteinúria (BERMÚDEZ *et al.*, 2011). Nos pacientes com DRC submetidos à terapia de substituição renal convencional (diálise), a morte por DCV é cinco vezes maior que na população em geral, mesmo após estratificação para idade, sexo, raça e diabetes (MEIJERS, 2010). Pacientes em hemodiálise apresentam uma expectativa de vida cinco vezes menor quando comparados a indivíduos saudáveis da mesma idade (ARSOV *et al.*, 2013).

Atualmente no Brasil, estima-se que existam mais de 2 milhões de brasileiros portadores de algum grau de disfunção renal, sendo que aproximadamente 91 mil encontram-se em diálise (SBN, 2011). Com a progressão da doença, os rins perdem a capacidade de remover efetivamente compostos tóxicos da corrente circulatória para posteriormente formar a urina, resultando em seu acúmulo no organismo. O acúmulo destas “toxinas urêmicas” é responsável por muitas das consequências clínicas de uma condição conhecida como uremia (HIMMELFARB, 2009; GLASSOCK, 2008). Entre os efeitos tóxicos da uremia, um dos principais é o dano cardiovascular, sendo responsável pela grande morbi-mortalidade neste grupo de pacientes, mesmo em estágios precoces da DRC. É interessante perceber que muitos desses efeitos, tais como inflamação e anemia, também têm impacto relevante sobre o *status* cardiovascular (VANHOLDER, VAN LAECKE e GLORIEUX, 2008).

## 2.2 TOXINAS URÊMICAS

As toxinas urêmicas podem ser definidas como solutos que produzem efeitos adversos no organismo (PIRODDI *et al.*, 2013). De acordo com Vanholder *et al.* (2008, 2003, 2001), já foram identificados mais de 100 compostos urêmicos, que são classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas e características de remoção por diálise em:

- Compostos pequenos solúveis em água com no máximo 500 Da. Os protótipos deste grupo são ureia e creatinina, moléculas facilmente removidas por diálise. Os compostos neste grupo não têm necessariamente uma toxicidade funcional;
- Compostos de peso molecular moderado com mais de 500 Da. Os protótipos deste grupo são  $\beta$ 2-microglobulina e leptina, e estas moléculas só podem ser removidas por membranas de porosidade grande o suficiente para permitir sua passagem através da membrana. Muitos dos compostos neste grupo são peptídeos que afetam um grande número de órgãos e sistemas. Os AGES estão alocados nesse grupo de classificação;
- Compostos ligados a proteínas, em geral com baixo peso molecular. Os protótipos deste grupo são os fenóis e os indóis tais como indoxil sulfato e paracresil-sulfato, compostos difíceis de remover por diálise e com diversas atividades tóxicas no organismo.

As toxinas urêmicas não podem ser definidas simplesmente como substâncias presentes nos fluidos corporais dos pacientes urêmicos. Deve ser demonstrada também uma conexão entre a substância tóxica e um ou mais eventos pato-biológicos ou clínicos. Para estabelecer esta conexão é necessário que a toxina obedeça a um postulado, semelhante ao postulado de Koch, modificado por Massry em 1977 (GLASSOCK, 2008). Neste postulado para uma toxina urêmica ser autêntica, ela precisa:

- 1) Ser quimicamente identificada e caracterizada;
- 2) Deve ser possível sua quantificação nos fluídos corporais;
- 3) O nível desta toxina deve estar aumentado na uremia;
- 4) Deve ocorrer uma relação entre o nível da toxina nos fluídos corporais e um ou mais dos sintomas da uremia;
- 5) Deve existir uma redução dos níveis corporais da toxina quando houver melhora no quadro urêmico do paciente;

- 6) A administração da toxina em modelo animal *in vitro* e *in vivo*, em níveis semelhantes àqueles encontrados na uremia deve reproduzir a manifestação urêmica (MASSRY, 1977).

Além destes critérios, um último deve ser acrescentado: um mecanismo patológico deve ser demonstrado a fim de explicar a ligação entre a toxina e o quadro urêmico (GLASSOCK, 2008).

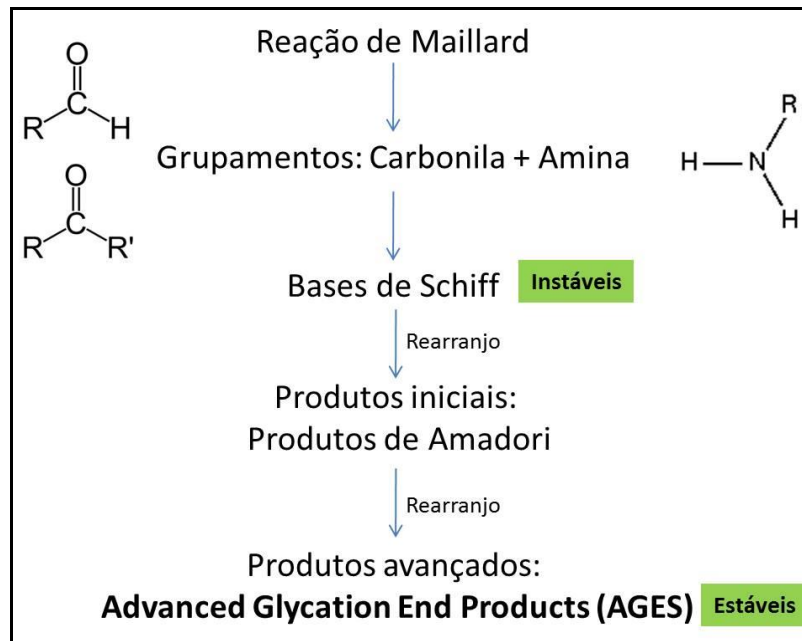
Atualmente uma das preocupações referentes às toxinas urêmicas consiste no desenvolvimento de protocolos clínicos inovadores que possibilitem a eliminação ou prevenir a formação de toxinas não-dializáveis, devido principalmente a sua grande dimensão. Tais toxinas representam grande relevância na pesquisa científica, pois tem sido apontadas como grandes responsáveis pela comorbidade inflamatória vascular na síndrome urêmica (PIRODDI *et al.*, 2013).

### 2.3 AGES

Os produtos de glicação avançada (AGES) consistem num grupo heterogêneo de proteínas ou lipídeos modificados, através de reações não enzimáticas de glicação, e oxidados após contato com açúcares aldose. Os AGES são derivados de grupamentos aldeídos e cetonas de carboidratos que reagem com grupos amino primários de aminoácidos livres ou proteínas para formar uma base de Schiff após poucas horas. Depois de alguns dias, essa molécula sofre um rearranjo, formando os produtos de Amadori. Esses produtos são então oxidados na presença de metais de transição, fazendo com que dentro de algumas semanas os AGES sejam formados (HEGAB *et al.*, 2012; SCHWEDLER *et al.*, 2011). A partir do momento que são formados, os AGES tornam-se estruturas irreversíveis. O processo de formação dos AGES pode ser observado na FIGURA 02. Como já mencionado, os AGES englobam um grupo de diversos tipos de moléculas glicadas, porém o produto mais prevalente *in vivo* é o N<sup>E</sup>-(carboximetil)lisina, mais conhecido como CML (GOLDIN *et al.*, 2006).

Os humanos estão expostos a duas fontes principais de AGES: a exógena (via alimentar) e a endógena (formados no organismo). Alimentos com alto índice de proteínas (carnes, queijos e ovos) são muito ricos em AGES, ao contrário do grupo dos carboidratos, que apresenta menor quantidade dessa molécula (GOLDIN *et al.*, 2006). Os AGES também podem ser formados durante o processamento de alimentos industrializados, por serem manipulados em altas temperaturas. Por via endógena, a formação de AGES ocorre quando o organismo é exposto a altos níveis de glicose, como nos pacientes diabéticos (SEMBA, NICKLETT e FERRUCCI, 2010), no decorrer do envelhecimento e na uremia (SCHWEDLER *et al.*, 2011).

FIGURA 02 – FORMAÇÃO DE AGES A PARTIR DA REAÇÃO DE MAILLARD



FONTE: O AUTOR (2011).

Os AGES têm alto *clearance* renal no organismo e sua principal forma de excreção é através da urina, ou diálise nos casos de terapia de reposição da função renal (THORNALLEY e RABBANI, 2009). Pacientes que fazem diálise peritoneal são altamente susceptíveis a formação sistêmica e local de AGES, como resultado da uremia e também da constante exposição do peritônio a altos níveis de produtos de degradação de glicose (PDG) gerados durante a esterilização através do calor do fluido de diálise. Os PDG presentes no fluido de diálise são absorvidos da cavidade peritoneal

para a corrente sanguínea, levando ao aumento das concentrações de AGES circulantes (ALHAMDANI, AL-AZZAWIE e ABBAS, 2007). Outra causa de aumento dos AGES na uremia é pelo aumento do estresse oxidativo, gerado por um desequilíbrio nos níveis de glutatona oxidada e glutatona reduzida, e, alterações no sistema antioxidante (tais como a superóxido desmutase/peroxidase). Ainda, compostos carbonílicos formados através de mecanismos não-oxidativos podem gerar um aumento na formação de AGES (MEERWALDT *et al.*, 2009).

Tomando-se por base a classificação atual de toxinas urêmicas, os AGES são consideradas toxinas de tamanho médio (maiores que 500 Da) que não são removidas facilmente, pois sua eliminação total requer a utilização de membranas de poros largos na diálise (VANHOLDER, 2008). Foi demonstrado que os AGES acumulam-se na parede dos vasos, causando efeitos danosos no âmbito micro e macrovascular, afetando a estrutura e a função das células, podendo modificar a matriz extracelular e a ação de citocinas e radicais livres através da ligação com receptores da superfície celular (GOLDIN *et al.*, 2006). No sistema cardiovascular, o acúmulo de AGES contribui para o enrijecimento das artérias, anormalidades miocárdicas, na formação da placa aterosclerótica e na disfunção endotelial. Quando estas moléculas se ligam ao colágeno e elastina (responsáveis por grande parte da elasticidade vascular) acumulam-se na matriz dos vasos de forma desordenada e não funcional. Ainda, alteram a modulação endotelial, o tônus vasomotor, a adesão plaquetária e a proliferação celular (ZIEMAN e KASS, 2004).

## 2.4 RAGES

Os AGES exercem tais ações no sistema vascular, ligando-se a seus receptores, principalmente os *receptors for advanced glycation end products* (RAGES). Os RAGES são multiligantes que pertencem à superfamília de imunoglobulinas (Ig) de proteínas de receptores da superfície celular. Sabe-se que a via NFκB controla a expressão celular dos RAGES, relacionando-os assim à resposta inflamatória. Os RAGES podem ser ligados com outro polipeptídeo, chamado LFL-L, através de ligação não covalente ao seu domínio extracelular. O LFL-L por sua vez, estabelece a ligação com os AGES

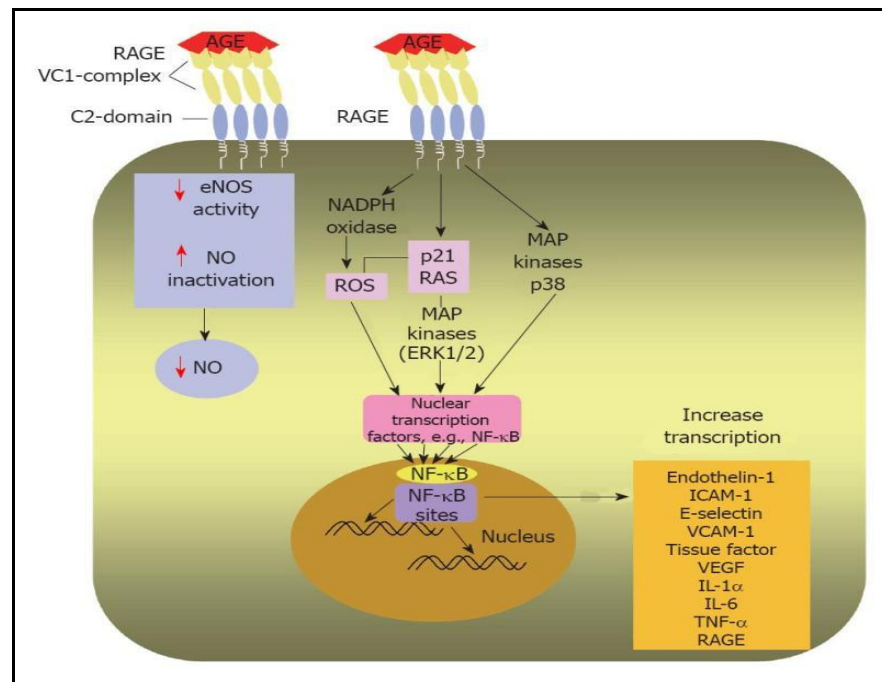


(GOLDIN, 2006). A expressão de RAGES é aumentada principalmente na presença exacerbada de AGES e ocorre, por exemplo, em células endoteliais, células de músculo liso e fagócitos mononucleares na vasculatura diabética (GOLDIN, 2006).

A ativação dos RAGES induz a resposta inflamatória, levando aos efeitos descritos acima e ainda, por exemplo, ao aumento da produção de moléculas de adesão, aumento da proliferação da camada íntima do vaso, angiogênese e estresse oxidativo (XU *et al.*, 2010). A presença de RAGES tem sido demonstrada em todas as células envolvidas no processo aterogênico, tais como monócitos, macrófagos, células endoteliais e células de músculo liso. Estas células não expressam RAGES significativamente sob condições fisiológicas, mas podem ser induzidas a expressá-los em situações onde seus ligantes e/ou fatores de transcrição se acumulam. Desta forma pode-se pensar que limitando a expressão de RAGES nas células vasculares, a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios poderia ser diminuída, prevenindo o desenvolvimento da disfunção endotelial (FIGAROLA *et al.*, 2007).

A interação entre AGES e RAGES tem sido levantada como um importante fator em alterações na sinalização intracelular, dentre elas a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, o qual induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias, como a *interleukin-1- $\alpha$*  (IL-1 $\alpha$ ), *interleukin-6* (IL-6) e *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) (BUCCIARELLI *et al.*, 2002) (FIGURA 03). Sabe-se que existem grupos de receptores *scavenger* que também se ligam aos AGES, com destaque para duas classes de *scavenger* B: CD36 e o tipo I da classe B. Nesse caso, os receptores compõem um papel importante no estresse oxidativo na célula, tendo-se em vista que sua ligação com os AGES leva a uma superexpressão de receptores de LDL oxidado-1 em ratos diabéticos. O receptor AGE-R1 (oligosacaril-transferase-48), e suas variações -R2 e -R3, também atua como potencial ligante dos AGES, porém tem sido demonstrado que ele não interfere na transdução de sinais celulares após a ligação receptor-AGES (GOLDIN *et al.*, 2006).

FIGURA 03 – EFEITOS INTRACELULARES DOS AGES APÓS LIGAÇÃO COM RAGES EM CÉLULAS ENDOTELIAIS



FONTE: HEGAB *et al.*, 2012.

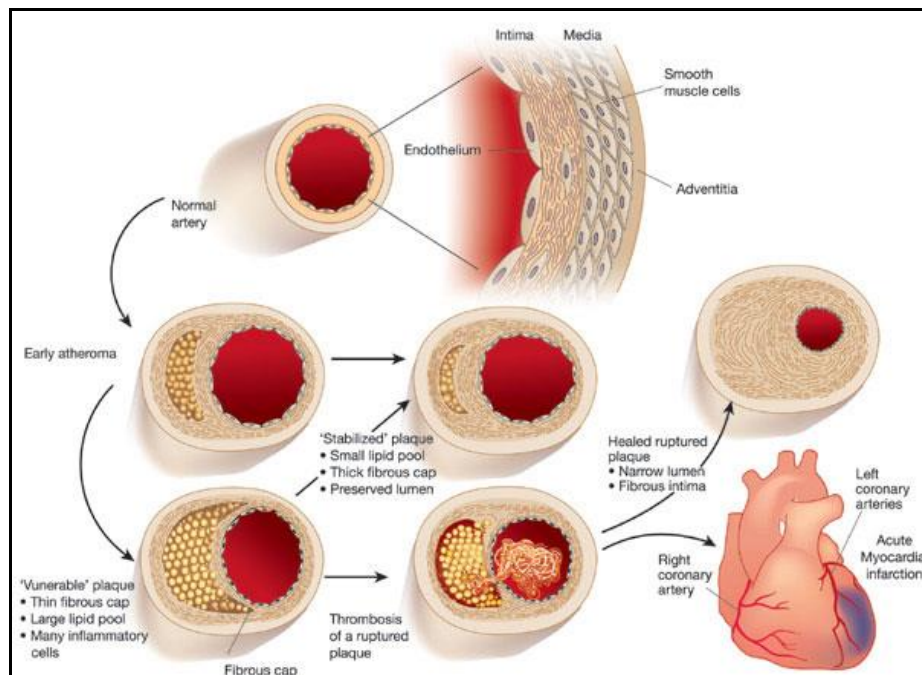
NOTA: A interação de AGEs com seus receptores (RAGES) sobre a superfície endotelial conduz a transdução de uma cascata de sinalização, ativando a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase e aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa ligação também desencadeia uma cascata inflamatória, diminuindo a disponibilidade de NO na célula. A etapa principal dessas sinalizações dá-se na ativação da via NF- $\kappa$ B e a sua translocação para o núcleo, aumentando a transcrição de genes-alvo de moléculas pró-inflamatórias, como endotelina-1 e ICAM-1.

## 2.5 INFLAMAÇÃO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A inflamação envolve alterações de permeabilidade nas paredes vasculares que levam ao aumento do fluxo de células do sistema imunológico do lúmen vascular para o tecido. De curta duração, a inflamação aguda pode ocorrer como resposta a um antígeno ou uma lesão tecidual. Esse processo leva à ativação de leucócitos e espécies reativas de oxigênio (ROS), cessando logo após a “retirada” do estímulo. Como resultado de um estímulo pró-inflamatório persistente, inicia-se a disfunção tecidual e desenvolve-se a fase crônica da inflamação. A resposta inflamatória crônica tem sido demonstrada como colaboradora no surgimento de diversas doenças, incluindo as cardiovasculares (KOLATTUKUDY e NIU, 2012).

A disfunção endotelial é um evento comumente descrito na falência renal, tanto crônica como aguda, assim como em estágio final de todas as doenças renais. Acredita-se que o acúmulo de toxinas urêmicas devido à perda ou diminuição da função renal, pode levar a uma resposta inflamatória endotelial (COHEN *et al.*, 2007; VANHOLDER *et al.*, 2003). De fato, a exposição do endotélio a estas toxinas, leva a modificações no fenótipo celular, fazendo com que as células endoteliais respondam com a produção de moléculas pró-inflamatórias (SEGAL, BAYLIS e JOHNSON, 2006; DIAZ-BUXO e WOODS, 2006). A resposta inflamatória endotelial, permitindo o fluxo de macromoléculas e células para a parede do vaso, inicia e promove um papel essencial no início e progressão da aterosclerose, resultando na formação, desenvolvimento e ruptura da placa de ateroma e nos consequentes eventos vasculares (FIGURA 04). Adicionalmente, eventos paralelos como a calcificação vascular também podem ser mediados pela resposta inflamatória do vaso (MASSY *et al.*, 2005).

FIGURA 04 - INÍCIO E PROGRESSÃO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA



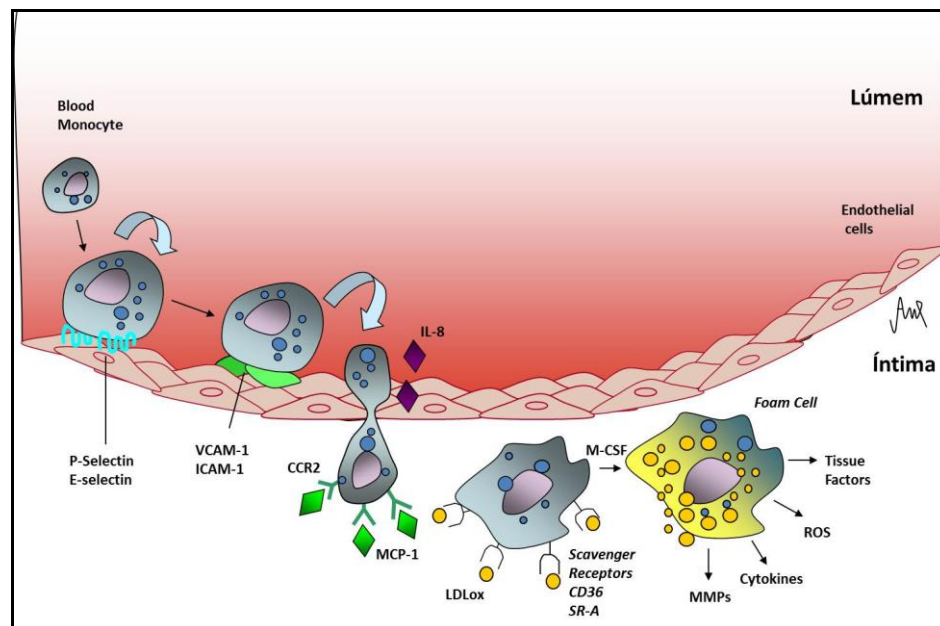
FONTE: LIBBY (2002).

NOTA: Em artérias coronárias humanas, o acúmulo de lipídios juntamente com o recrutamento de células inflamatórias leva à formação de um núcleo rico em lipídeos à medida que a artéria se alarga em um de seus lados no intuito de acomodar a expansão da lesão. Se as condições inflamatórias e fatores de risco prevalecerem, esse núcleo lipídico pode crescer e proteases secretadas pelos leucócitos ativados podem degradar a matriz extracelular, enquanto que as citocinas pró-inflamatórias podem limitar a síntese de colágeno. Essas mudanças podem diluir a cápsula fibrosa e torna-la frágil e susceptível a ruptura. Se a

lesão se romper, o sangue entra em contato com o fator tecidual presente na placa e coagula. As plaquetas ativadas pela trombina gerada a partir da cascata de coagulação e pelo contato com o lúmen do vaso levam à formação de trombos. Se a oclusão do trombo no vaso for persistente, corre-se o risco de um infarto agudo do miocárdio. Ou então, o trombo pode ser reabsorvido eventualmente como resultado da trombólise endógena ou terapêutica.

A interação dos monócitos com o endotélio vascular durante a inflamação ocorre através de várias etapas envolvendo o rolamento mediado pela selectina, adesão leve mediada por moléculas de adesão como a *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) e a *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e subsequente adesão firme mediada por quimiocinas, como a *interleukin-8* (IL-8) e o MCP-1. Monócitos aderentes ao endotélio migram através da camada íntima, transformam-se em macrófagos, e fagocitam lipídios oxidados, tornando-se células espumosas ou *foam cells* (FIGURA 05). Este dinâmico e controlado mecanismo contribui para o crescimento e expansão das lesões, e o recrutamento de monócitos participa diretamente na destabilização da placa aterosclerótica, resultando em complicações associadas a taxas significativas de morbidade e mortalidade (LI e GLASS, 2002).

FIGURA 05 - RECRUTAMENTO, ADESÃO, ROLAMENTO E TRANSMIGRAÇÃO DE MONÓCITOS NO ENDOTÉLIO VASCULAR



FONTE: STINGHEN (2009).

NOTA: A disfunção endotelial faz com que as células endoteliais expressem em sua superfície moléculas de adesão que permitem aos monócitos sanguíneos rolar (P-selectina e E-selectina) e se aderirem a camada íntima (VCAM-1 e ICAM-1) estimulados por um gradiente quimiotático x haptotático mediado por

quimiocinas (IL-8 e MCP-1). Os monócitos diferenciam-se em macrófagos, expressam receptores *scavenger* e englobam partículas lipídicas (LDLox), tornando-se as *foam cells*, capazes de secretar citocinas, fatores tissulares, espécies reativas de oxigênio (ROS) e metaloproteinases (MMPs).

Na DRC, vários marcadores de risco cardiovascular têm sido amplamente estudados, tais como: Proteína C reativa (PCR), IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e recentemente, moléculas de adesão tais como VCAM-1 e ICAM-1 e quimiocinas, tais como o MCP-1 (STINGHEN *et al.*, 2009; STENVINKEL *et al.*, 2000). Estudos desenvolvidos em nosso grupo vêm demonstrando que com o desenvolvimento da DRC, e conseqüente acúmulo de toxinas urêmicas, ocorre uma ativação da resposta inflamatória sistêmica (mediada por citocinas pró-inflamatórias) e especialmente vascular (endotelial) (STINGHEN *et al.*, 2009).

## 2.6 MCP-1

O MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) é uma quimiocina expressa por diversos tipos de células, como células endoteliais, de músculo liso, monócitos e fibroblastos. Várias citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de MCP-1, incluindo IL-1, TNF- $\alpha$  e *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). É a quimiocina mais importante na regulação da migração/infiltração de monócitos/macrófagos nos tecidos, pois tem participação direta no recrutamento de monócitos, células T e células dendríticas para o local da lesão tecidual (ELMARAQBY e SULLIVAN, 2012). Altos níveis de MCP-1 no plasma são associados a fatores de risco clássicos na formação da placa aterosclerótica e também ao risco de morte por infarto agudo do miocárdio. Os glicosaminoglicanos presentes na superfície das células endoteliais tem sido apontados como grandes responsáveis na ativação e função do MCP-1 (WIESNER *et al.*, 2013). Estímulos como estresse oxidativo e hiperlipidemia também podem induzir a produção de MCP-1 e desencadear o recrutamento de monócitos na parede vascular, colaborando na formação das chamadas *foam cells* (células espumosas), e progressão da inflamação e aterosclerose (KOLATTUKUDY e NIU, 2012; SHANTSILA e LIP, 2009).

## 2.7 PROTEÍNA QUINASE C

A proteína quinase C (PKC) é uma família de enzimas que está envolvida no mecanismo fisiológico que regula a atividade de várias proteínas celulares, mediante a adição e remoção de grupos fosfato. As principais enzimas metabólicas do organismo são reguladas por quinases (enzimas que adicionam grupos fosfato) e fosfatases (enzimas que removem grupos fosfato). As quinases são divididas entre as que fosforilam proteínas ou nos resíduos de tirosina (tirosina-quinases) ou em serina e treonina (serina/treonina-quinases). A PKC é classificada como uma serina/treonina-quinase. Até hoje já foram identificadas doze isoformas da PKC. A PKC- $\beta$  (que pode ser subdividida em PKC- $\beta$ 1 e PKC- $\beta$ 2) faz parte do grupo das PKCs dependentes de cálcio e fosfolípídeos para sua ativação. A ativação da PKC, em geral, é mediada principalmente pelo aumento na liberação de diacilglicerol intracelular (DAG), que pode ser formado por diversas fontes. No caso do diabetes, o excesso de glicose é transportado para as células vasculares e metabolizado principalmente através da glicólise. O aumento da glicólise, por sua vez, leva a um aumento na síntese de DAG. Atualmente, o DAG é considerado o principal ativador endógeno da PKC (IDRIS e DONNELLY, 2006).

A ativação da PKC- $\beta$  leva a vários efeitos patológicos indesejáveis (TABELA 01), desta forma tem sido reconhecida como um mediador chave na disfunção vascular causada por AGES através do estresse oxidativo (XU *et al.*, 2010).

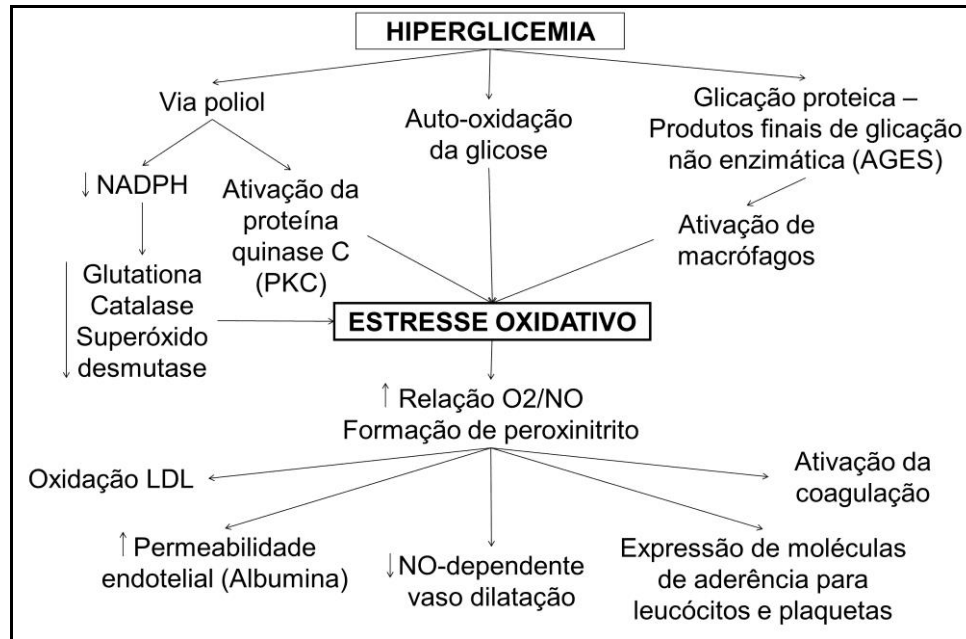
TABELA 01 - EFEITOS DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA QUINASE C –  $\beta$

<b>Alterações no transporte via membrana</b>	<b>Aumento na expressão gênica</b>	<b>Disfunção endotelial e de músculo liso</b>
Aumento na atividade da Fosfolipase A2	Angiogênese e permeabilidade do fator de crescimento endotelial vascular	Aumento das espécies reativas de oxigênio
Aumento na atividade do ácido aracdônico	Fatores de crescimento – Ex: Fator de crescimento de fibroblasto; hiperplasia do músculo liso vascular; moléculas de adesão intracelular; endotelina-1	Regulação deficiente da síntese de óxido nítrico
Aumento na atividade da Prostaglandina E2		Capacidade de resposta da Angiotensina-II e Endotelina-1
Redução na Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase		Vasodilatação mediada por plaquetas diminuída

FONTE: ADAPTADO DE IDRIS E DONNELLY (2006).

Sua atividade tem sido associada ao aumento da permeabilidade vascular, da contratilidade, da síntese de matriz extracelular, do crescimento celular e apoptose, da adesão leucocitária e da ativação e inibição de citocinas, como exemplificado na FIGURA 06 (DANIS e SHEETZ, 2009).

FIGURA 06 - ESTRESSE OXIDATIVO NA HIPERGLICEMIA



FONTE: ADAPTADO DE WAJCHENBERG (2002).

Alguns estudos *in vitro* e também estudos clínicos em fase II e III utilizando inibidores da isoforma PKC- $\beta$  têm obtido resultados positivos em pacientes diabéticos, retinopatia não proliferativa, nefropatias e disfunção endotelial (GERALDES e KING, 2010; DANIS e SHEETZ, 2009). Também, estudos *in vitro* vêm demonstrando que o bloqueio seletivo de PKC- $\beta$  pode reduzir a adesão de monócitos ao endotélio, mediada por AGES e consequente diminuição na expressão de ICAM-1, TGF- $\beta$  e dano gerado por estresse oxidativo em células endoteliais (XU *et al.*, 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

A influência da toxicidade urêmica na DRC, juntamente com as consequências cardiovasculares por ela desenvolvidos, vem representando um grande alvo de interesse em pesquisas nos últimos anos. Tem sido demonstrado que o contato contínuo de células vasculares com altas concentrações de toxinas urêmicas desencadeia um processo inflamatório endotelial, caracterizado pela alta expressão de marcadores de inflamação vascular, tais como o MCP-1, favorecendo o desenvolvimento do ateroma. Várias vias participam desta ativação vascular mediada por toxinas urêmicas como os AGES, entre elas a via da PKC- $\beta$ . Desta forma, esclarecer os mecanismos envolvidos na aceleração da DCV nos pacientes com DRC, através de uma abordagem *in vitro*, poderia contribuir para o desenvolvimento de novos alvos para intervenções terapêuticas a fim de melhorar o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na toxicidade urêmica e consequentemente a sobrevida do paciente.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão *in vitro* de MCP-1 via PKC- $\beta$  na disfunção endotelial causada por produtos de glicação avançada (AGES).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair, isolar e caracterizar células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVECs);
- Produzir e caracterizar os AGES;
- Padronizar o modelo de co-cultivo HUVECs + monócitos;
- Avaliar a expressão de MCP-1 em sobrenadante de HUVECs, monócitos, e co-cultivo HUVECs + monócitos após exposição aos tratamentos com albumina bovina (BSA) - controle; AGES; e AGES + bloqueador seletivo da via PKC- $\beta$ .

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

- Células endoteliais humanas de veia de cordão umbilical (HUVECs).
- Linhagem tumoral de células monocíticas (U-937) → CRL-1593.2, ATCC®.

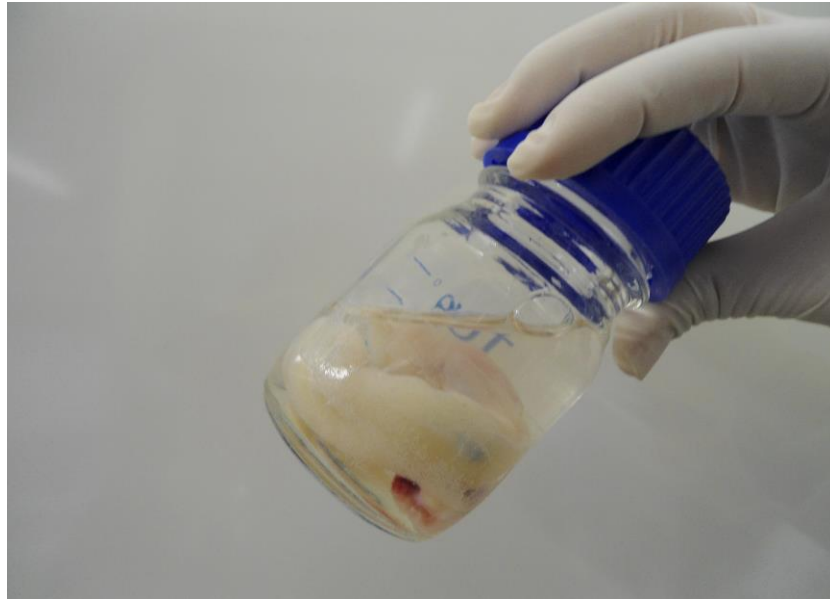
### 5.2 MÉTODOS

#### 5.2.1 *Extração, cultivo e caracterização de HUVECs*

Foram obtidos cordões umbilicais cedidos por gestantes no momento do parto, após concordância e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE II). Os cordões foram transportados em tampão salino fosfato pH 7,4 acrescido dos antimicrobianos penicilina/estreptomicina (10mg/mL) e mantidos sob refrigeração a 4°C por no máximo 24 horas até o processo de manipulação (FIGURA 06).

As HUVECs foram extraídas pelo método de Jaffe *et al.* (1973), adaptado por Stinghen *et al.* (2009). O procedimento foi iniciado pela canulação da veia do cordão com posterior lavagem com PBS pH 7.4. Basicamente as células foram extraídas por digestão enzimática, após tratamento com solução de colagenase tipo II (C6885, Sigma), 0,3mg/mL (FIGURAS 07 e 08).

FIGURA 07 - CORDÃO UMBILICAL RECÉM-COLETADO, EM MEIO DE TRANSPORTE



FONTE: O AUTOR (2011).

FIGURA 08 - SISTEMA FECHADO ESTABELECIDO EM VEIA DE CORDÃO UMBILICAL CONTENDO COLAGENASE PARA EXTRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.



FONTE: O AUTOR (2011).

O cordão foi incubado a 37°C por aproximadamente 10 minutos e após esse período, o conteúdo foi coletado em meio MEM-199 (Gibco®) e centrifugado por 5 minutos a 705xg. O *pellet* contendo as células foi ressuspenso em meio de cultivo

completo (descrito abaixo) e cultivado em frascos de cultivo T25 (25cm<sup>2</sup>), tratados com gelatina 1%, acrescido de meio de cultivo completo e incubado em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Preparo de meio de cultivo completo para HUVECs:

Glutamina .....	1mL
SFB 15% .....	15mL
Heparina 5000UI/mL .....	1mL
Hidrocortizona 0,5mg/mL .....	400µL
Penicilina/Estreptomicina 1000µL/mL .....	100µL
ECGF 30µg/mL .....	200µL
b-FGF 0,001µg/mL .....	100µL
MEM-199 filtrado .....	q.s.p 100mL

Ao atingir confluência de 90%, as células foram tripsinizadas e transferidas para outros três frascos, e assim sucessivamente, até que a 3<sup>a</sup> ou 4<sup>a</sup> passagem fossem alcançadas.

A cultura foi caracterizada como sendo de células endoteliais pelo método de citometria de fluxo (FAC-Scalibur®, BD Biosciences) através da marcação com anticorpo monoclonal anti-CD31 humano PE-A, e também por suas características morfológicas avaliadas através de microscopia ótica.

### 5.2.2 Células U-937

As células usadas como modelo de monócitos foram adquiridas a partir da linhagem tumoral comercial U-937 (CRL-1593.2, ATCC®), que provém de linfoma histiocítico, gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Almeriane Santos. A razão pela qual optou-se por essa linhagem celular ao invés de isolar monócitos de sangue periférico humano é o fato de que esse processo por si só resulta em ativação dos monócitos, podendo influenciar negativamente nos resultados alcançados (FAAS *et al.*, 2010). As

células foram cultivadas em RPMI 1640 (31800-014, Gibco®) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 10mg/mL de penicilina/estreptomicina e 10mg/mL de fungizona. Por ser um tipo de célula que cresce em suspensão, foi estabelecida a manutenção da proporção de  $10^5$  monócitos/mL de meio de cultivo a cada três dias. Os monócitos foram mantidos em frasco de cultivo T25 (25cm<sup>2</sup>) ou T75 (75cm<sup>2</sup>) e incubados a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 5.2.3 Preparo e caracterização de AGES e controle BSA

Os AGES e o controle BSA foram preparados como previamente descrito por IWASHIMA *et al.* (1999). O procedimento para produção dos AGES foi realizado a partir da adição de D-glucose à albumina bovina (BSA) em PBS pH 7.4 esterilizado, de acordo com a formulação abaixo:

- Albumina bovina fração V (BSA): 50mg/mL (A-4503, Sigma®)
- D-glucose: 50mM (Gibco®)
- PMSF: 1,5mM
- EDTA: 0,5mM (Merck®)
- Penicilina/Estreptomicina: 10mg/mL(LGC Biotecnologia®)

Para a produção do controle BSA, realizou-se a adição de albumina (BSA) em PBS pH 7.4 esterilizado, de acordo com a formulação abaixo:

- Albumina bovina (BSA): 50mg/mL (A-4503, Sigma®)
- PMSF: 1,5mM
- EDTA: 0,5mM (Merck®)
- Penicilina/Estreptomicina: 10mg/ml (LGC Biotecnologia®)

As soluções foram preparadas separadamente e agitadas cuidadosamente até que uma solução homogênea fosse formada. Após o preparo e tamponamento, as

soluções foram incubadas por sete semanas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. De acordo com a literatura, sabe-se que o tempo de sete semanas é suficiente para a formação dos AGES, que já é identificada a partir da quarta semana em técnicas *in vitro* (SCHMITT *et al.*, 2005). O pH foi monitorado e ajustado semanalmente para 7.4. Decorridas as sete semanas de incubação, os preparos de AGES e BSA foram submetidos separadamente à diálise em membrana (6-8Kd, Spectra®) contra PBS pH 7.4 num volume cinquenta vezes maior que a amostra a ser dialisada, por um período de aproximadamente 16 horas, sob 4°C e agitação constante. Após o processo de diálise, as soluções de AGES e controle BSA foram aliquotadas e estocadas a -20°C até o uso. Para quantificar proteínas nos AGES e controle BSA foi utilizada a técnica de Folin-Lowry (LOWRY, 1951). A concentração total de proteínas da amostra foi avaliada por técnica colorimétrica, a qual foi determinada através da leitura de absorbâncias em espectrofotômetro em 670 nm.

A caracterização dos AGES e controle BSA deu-se pela leitura comparativa de absorbâncias dos AGES e controle BSA, tomando-se por base o protocolo estabelecido primeiramente por Pongor *et al.* (1984). Ambas as amostras foram diluídas em água destilada para 1mg/mL para posterior leitura de absorbâncias nos comprimentos de onda 330, 360, 400 e 420nm em espectrofotômetro (Tecan®).

## 5.2.4 *Tratamentos das células com AGES e BSA*

### 5.2.4.1 *HUVECs*

As HUVECs foram plaqueadas com meio de cultura MEM-199 completo em placas de cultivo de 96 poços, previamente tratados com gelatina 1%, na proporção de 10<sup>4</sup> células por poço. Posteriormente, foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 8 horas. Em seguida foram submetidas a um período de 12 horas de supressão com MEM-199 + 0,3% de SFB. Para o tratamento, as toxinas e/ou controle foram diluídos em tampão *Krebs-Ringer phosphate buffer* (KRP pH 7.4), de seguinte composição: NaCl (120mM); KCl (4,7mM); CaCl<sub>2</sub> (2,2mM); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2mM); MgSO<sub>4</sub> (1,2mM);

dextrose (5,5mM) e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1,0mM). Dessa forma, os tratamentos foram realizados da seguinte maneira: KRP - controle (1,6M); BSA (0,2mg/mL); AGES (0,2mg/mL); e AGES (0,2mg/mL) + inibidor da via PKC- $\beta$  Gö-6983 (10 $\mu$ M) em uma cinética de 0, 3 e 6 horas. As concentrações das soluções utilizadas nos tratamentos foram estabelecidas tomando-se por base trabalhos anteriores (XU *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2006). Os sobrenadantes foram coletados a cada tempo pré-estabelecido e armazenados a -20°C para posterior quantificação de MCP-1. Foram realizados cinco experimentos em triplicata.

#### 5.2.4.2 Monócitos

Os monócitos foram plaqueados na proporção de 10<sup>4</sup> células por poço, em placas de 96 poços. Imediatamente após, fez-se os tratamentos de interesse em cada poço: KRP - controle (1,6M); BSA (0,2mg/mL); AGES (0,2mg/mL); AGES (0,2mg/mL) + inibidor da via PKC- $\beta$  Gö-6983 (10 $\mu$ M). Para os tratamentos, foi estabelecida a cinética de 0, 3 e 6 horas. Dessa maneira, os sobrenadantes foram coletados a cada tempo da cinética e armazenados a -20°C para posterior quantificação de MCP-1. Foram realizados cinco experimentos em triplicata.

#### 5.2.4.3 Co-cultivo HUVECs + monócitos

As HUVECs foram plaqueadas na proporção de 10<sup>4</sup> células por poço em placas de 96 poços, previamente tratados com gelatina 1%, os quais foram preenchidos com MEM-199 completo. Após a adesão (aproximadamente 8 horas), as células passaram por supressão de 12 horas com MEM-199 + 0,3% de SFB. Posteriormente, a quantidade de 10<sup>4</sup> monócitos por poço foi adicionada diretamente sobre as HUVECs. Estabelecido o co-cultivo, procedeu-se com os tratamentos de acordo com o protocolo a seguir: KRP - controle (1,6M); BSA (0,2mg/mL); AGES (0,2mg/mL); AGES (0,2mg/mL) + inibidor da via PKC- $\beta$  Gö-6983 (10 $\mu$ M). Para os tratamentos, foi estabelecida a cinética de 0, 3, e 6 horas. Dessa forma, os sobrenadantes foram coletados a cada tempo da cinética e

armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação de MCP-1. Foram realizados cinco experimentos em triplicata.

#### 5.2.5 *Dosagens de MCP-1*

As dosagens foram realizadas em sobrenadante de cultura através do método de ELISA sanduíche caseiro, com anticorpos da marca R&D Systems® (captura, detecção e recombinante). O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas seguiram as recomendações do fabricante. Basicamente, a placa foi sensibilizada com anticorpo captura (ou primário) MAB 679 ( $2\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24 horas sob temperatura ambiente ( $22$  a  $25^{\circ}\text{C}$ ). Após este período, a placa foi bloqueada com BSA 1% e armazenada a  $4^{\circ}\text{C}$  até o uso. Para a realização da curva de calibração utilizou-se anticorpos recombinantes MC 279 ( $100\text{ng}/\text{mL}$ ), e a detecção foi estabelecida com o anticorpo de detecção biotilado (ou secundário) BAF 279 ( $50\text{ng}/\text{mL}$ ). As absorbâncias foram lidas em  $450\text{nm}$  com filtro de referência em  $570\text{nm}$  em um leitor de microplaca Tecan®. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

#### 5.2.6 *Análise estatística*

Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  erro padrão da média. Para avaliar o resultado entre os grupos foram realizados os testes  $t$  de Student ou Anova para dados pareados e Mann-Whitney e Anova on Rank's para dados não pareados. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de  $P$  foi  $< 0,05$ . As análises foram realizadas com o uso dos pacotes estatísticos JMP Windows versão 8.0 e SigmaStat Windows versão 3.5.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (SD/UFPR) com registro no CEP/SD sob número 1139.064.11.06 (APÊNDICE I).



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pacientes com DRC apresentam alta exposição do endotélio vascular a toxinas urêmicas. Dentre outros eventos, a persistência desse contato acarreta em um processo patofisiológico conhecido como disfunção endotelial, o qual desencadeia a aceleração da DCV (COHEN *et al.*, 2007). Neste trabalho avaliou-se a resposta inflamatória das células endoteliais e monócitos ao ambiente urêmico, e também no modelo de co-cultivo HUVECs + monócitos. Para isso, ambas as células foram expostas aos AGES, conhecido grupo de toxinas urêmicas. A partir do sobrenadante celular desse tratamento, a molécula inflamatória MCP-1 foi quantificada. Avaliou-se também a importância da via PKC- $\beta$  na ativação e iniciação de processos inflamatórios nessas células, por meio de seu bloqueio nos tratamentos realizados.

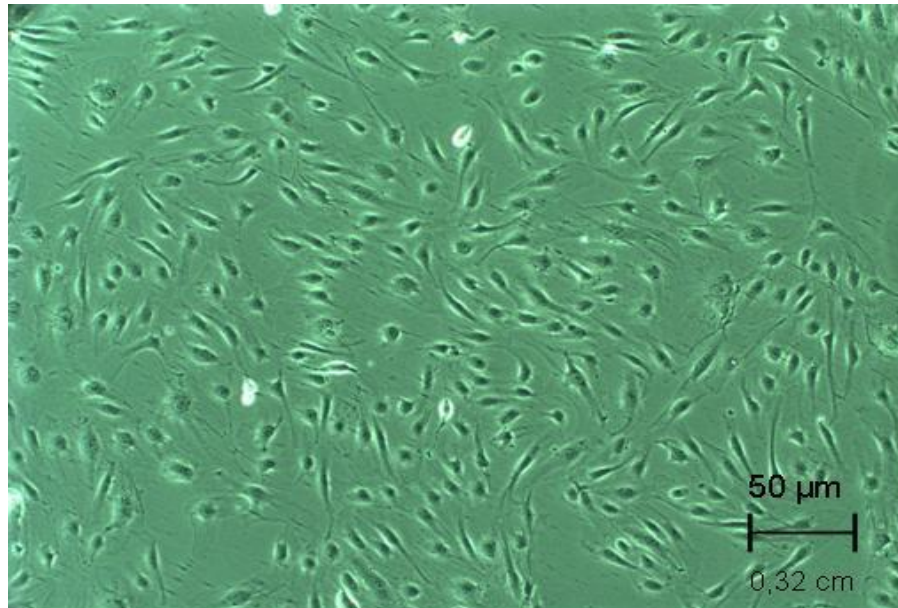
### 6.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HUVECs

As HUVECs foram caracterizadas através da morfologia e por citometria de fluxo (FAC-Scalibur®). A partir da microscopia ótica, pode-se observar a morfologia poligonal, o núcleo ovalado e o crescimento em monocamada, características que corroboram com células endoteliais (FIGURA 09).

As células endoteliais vasculares são organizadas em uma monocamada, chamada endotélio, presente na luz dos vasos sanguíneos. Dentre diversas funções, essas células são responsáveis por regular o fluxo de células e de várias moléculas bioativas circulantes no sangue, como fatores de crescimento e proteínas de coagulação. Em colaboração com a sua camada adjacente (músculo liso), controla o tônus vascular por meio da angiotensina I e participa ativamente de respostas inflamatórias e imunológicas através de antígenos de superfície, moléculas adesivas e síntese de citocinas. Devido ao fato destas células estarem em contato direto com o plasma e componentes celulares do sangue, tornam-se alvo de muitas moléculas endógenas prejudiciais à sua atividade (BAUDIN *et al.*, 2007). A proteção do endotélio em pacientes com DRC tem sido um dos grandes focos em pesquisas experimentais e clínicas contra a progressão da aterosclerose (DIAZ-BUXO e WOODS, 2006). Desta

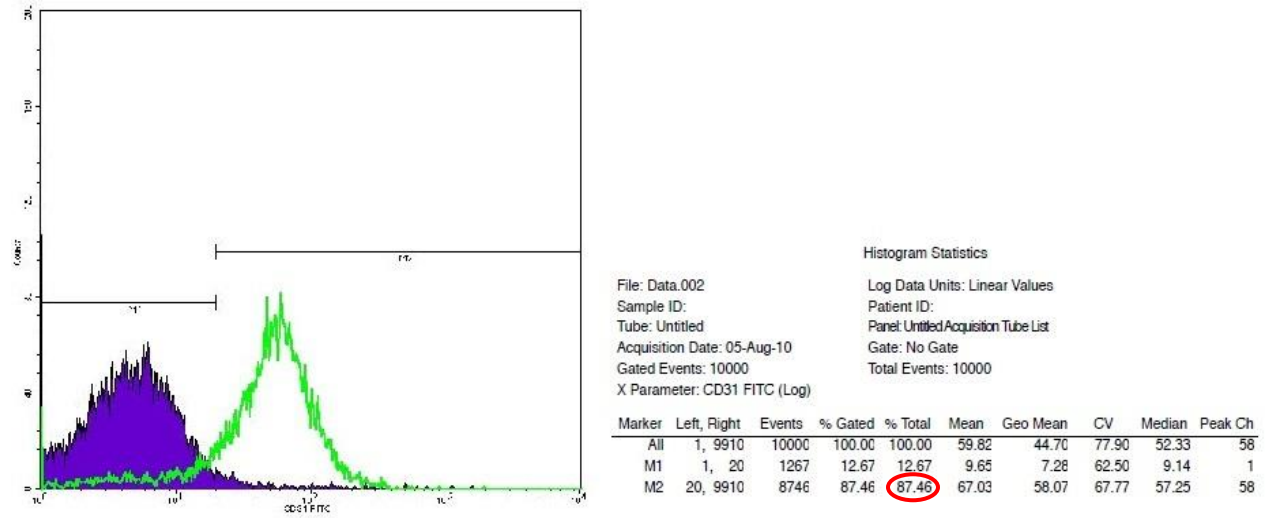
forma, para esse trabalho optou-se pelo modelo de estudo em HUVECs, onde é possível estabelecer uma análise o mais próxima possível da realidade da disfunção endotelial encontrada nesses pacientes.

FIGURA 09 - FOTOMICROGRAFIA DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS (HUVECs) POR MICROSCOPIA ÓTICA (AUMENTO DE 10X).



FONTE: STINGHEN (2011)

FIGURA 10 - CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS POR CITOMETRIA DE FLUXO.



FONTE: RIBEIRO (2012).

NOTA: O gráfico em verde indica a quantidade de células endoteliais e o valor demarcado em vermelho representa o total em percentagem de células endoteliais presentes na caracterização (87,46%).

Através da citometria de fluxo, pode-se perceber que 87,46% das células analisadas foram consideradas como células endoteliais. O pico em verde no gráfico indica a população de HUVECs marcadas com anti-CD31 (FIGURA 10).

## 6.2 AGES E CONTROLE BSA

A quantificação de proteínas nos AGES e no controle BSA deu-se pela leitura de absorvâncias após a realização das etapas estabelecidas por Folin-Lowry, chegando-se nos dados apresentados na TABELA 02.

TABELA 02 - ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS PADRÃO, AGES E CONTROLE BSA

<b>AMOSTRA</b>	<b>MÉDIA DE ABSORBÂNCIAS</b>
Padrão	0,0753 ± 0,0061
AGES	0,5689 ± 0,0032
Controle BSA	0,5580 ± 0,0113

FONTE: O AUTOR (2011).

NOTA: n = 3. Concentração do padrão: 5mg/ml.

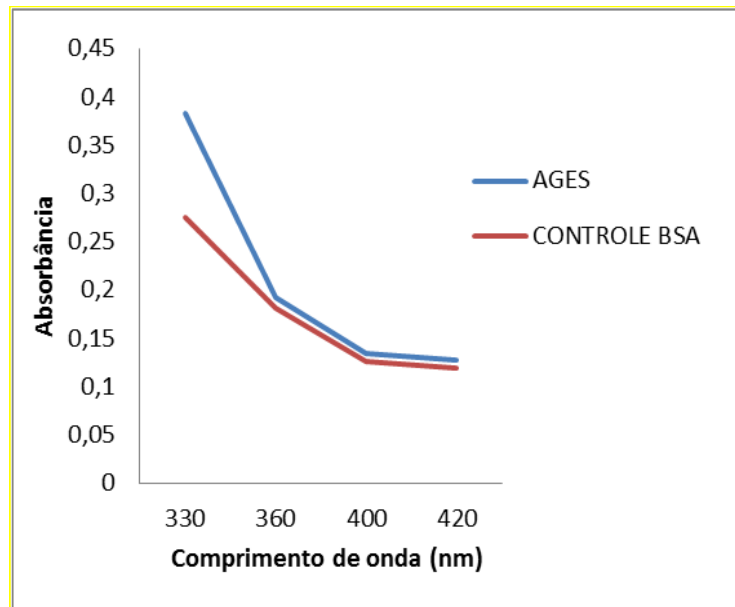
De acordo com LOWRY (1951), a fórmula utilizada para determinação da concentração de proteínas em AGES e controle BSA foi:

$$\left[ \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Média de absorvâncias do padrão}} \right] \times \text{média de absorvâncias da amostra} = [\text{Proteínas}]$$

Baseando-se na fórmula apresentada, a concentração de proteínas nos AGES foi de 37,77mg/mL e no controle BSA foi de 37,05mg/mL.

Para a caracterização de AGES e controle BSA, as amostras foram submetidas à leitura de absorvâncias de acordo com o gráfico a seguir (GRÁFICO 01):

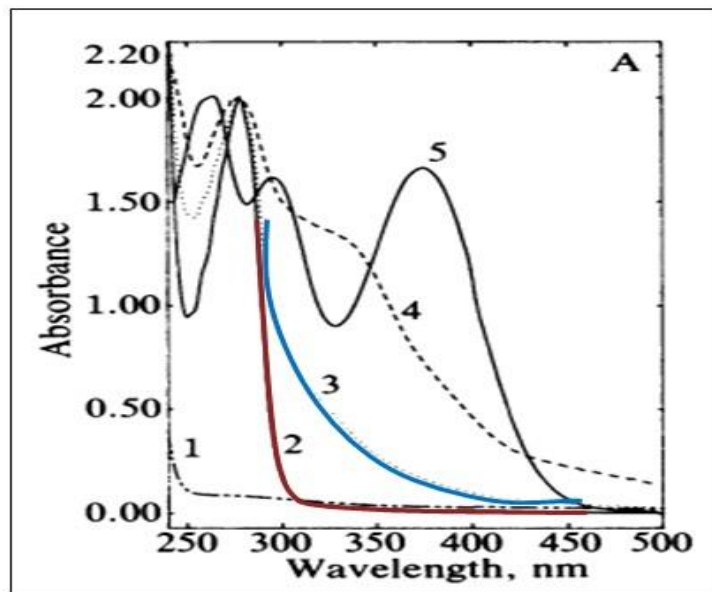
GRÁFICO 01 - ABSORBÂNCIAS ENCONTRADAS NAS SOLUÇÕES DE AGES E CONTROLE BSA



FONTE: O AUTOR (2011).

Tomando-se por base os dados apresentados por Pongor *et al.* (1984) no GRÁFICO 02, pode-se observar que as soluções de AGES e controle BSA corresponderam plenamente às absorbâncias estabelecidas para tais soluções.

GRÁFICO 02: CURVA DE ABSORBÂNCIAS PADRÃO PARA AGES E CONTROLE BSA



FONTE: PONGOR *et al.* (1984).

NOTA: CURVA 2 – ABSORBÂNCIAS DE CONTROLE BSA; CURVA 3 – ABSORBÂNCIAS DE AGES.

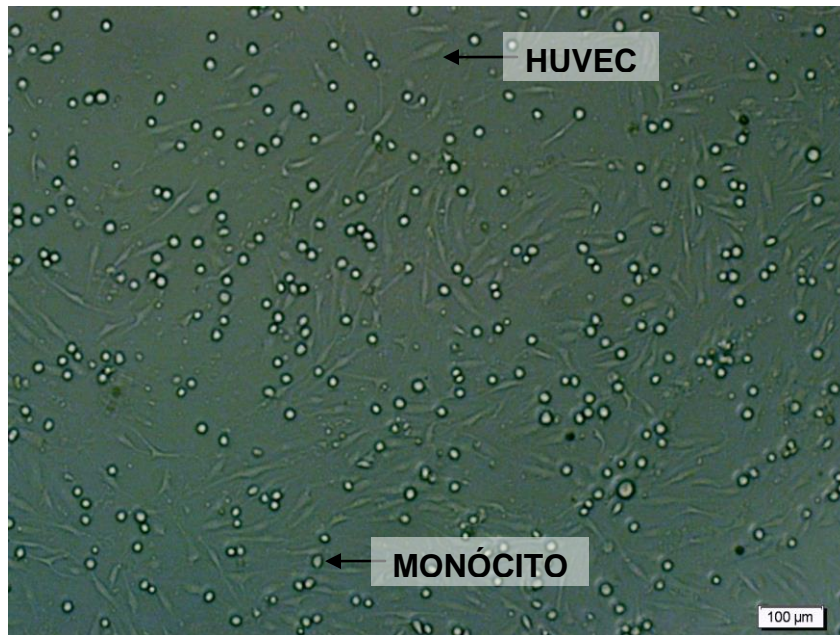
A caracterização dos AGES e controle BSA foi estabelecida de acordo com a literatura, em que a análise de absorvâncias é apontada como uma das principais técnicas para esse fim, sendo de fácil execução porém extremamente eficaz na avaliação de amostras de produção dos mesmos (SCHMITT *et al.*, 2005). As técnicas de análise de fluorescência e ressonância nuclear magnética também são amplamente utilizadas para esse tipo de caracterização (ARIF *et al.*, 2012; IWASHIMA *et al.*, 1999). De acordo com a formulação química do protocolo utilizado para a produção de AGES nesse trabalho, espera-se que o produto formado em maior abundância seja o CML; produto que também é apontado como o principal composto acumulado *in vivo* (GOLDIN *et al.*, 2006; VALENCIA *et al.*, 2004). Diante dessas informações, pode-se inferir que a solução produzida para esse estudo mostrou-se apropriada para as análises propostas nos objetivos.

### 6.3 CO-CULTIVO HUVECs + MONÓCITOS

Em pacientes com DRC, o acúmulo de toxinas urêmicas circulantes leva ao aumento no estresse oxidativo e a um quadro de inflamação generalizada do sistema circulatório, através da expressão de moléculas pró-inflamatórias por células da parede vascular. Tais mudanças resultam em disfunção endotelial que é caracterizada, dentre outros fatores, por uma alta aderência de plaquetas e leucócitos no local do dano vascular (MALYSZKO, 2010). Assim, o modelo de co-cultivo HUVECs + monócitos representa uma forma realista de estudo dos fenômenos que ocorrem no vaso sanguíneo humano em condições de dano endotelial relacionados ao recrutamento de monócitos.

A quantidade de monócitos escolhida para esse estudo foi baseada em trabalhos anteriores envolvendo análise de resposta inflamatória e adesão após um estímulo específico (NAM *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2010; RAINGER *et al.*, 1996). As figuras mostram o co-cultivo HUVECs + monócitos momentos antes de sucederem-se os tratamentos pré-determinados neste trabalho (FIGURAS 11 A e B).

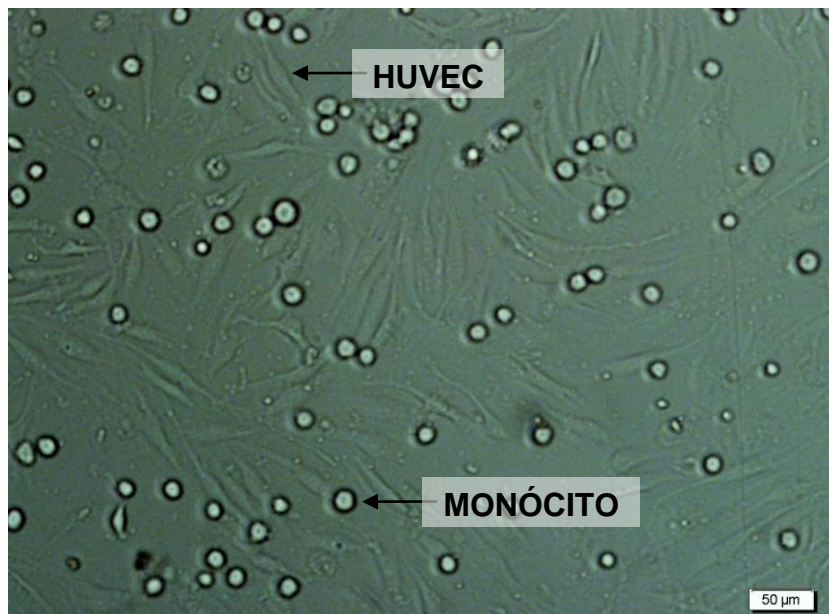
FIGURA 11 A - CO-CULTIVO HUVECs + MONÓCITOS (AUMENTO DE 10X)



FONTE: O AUTOR (2012).

NOTA: As HUVECs encontram-se na camada inferior do cultivo, mantendo sua morfologia habitual. Os monócitos correspondem às células em formato arredondado na cama superior do cultivo.

FIGURA 11 B - CO-CULTIVO HUVECs + MONÓCITOS (AUMENTO DE 20X)



FONTE: O AUTOR (2012).

NOTA: As HUVECs encontram-se na camada inferior do cultivo, mantendo sua morfologia habitual. Os monócitos correspondem às células em formato arredondado na cama superior do cultivo.

O protocolo de co-cultivo de HUVECs + monócitos foi estabelecido tomando-se por base diversos métodos apresentados pela literatura. Este método mostrou-se adequado para os tratamentos executados, pois através de microscopia ótica observou-se a adesão dos monócitos às células endoteliais, juntamente com a expressão das moléculas de interesse, assim como prevê a literatura em estudos semelhantes (NAM *et al.*, 2011; FAAS *et al.*, 2010; LUU *et al.*, 2007). LUU *et al.* (2007) demonstraram que após uma hora de contato, 70% dos monócitos provenientes de pacientes com doença arterial periférica adicionados no co-cultivo aderiram às HUVECs, contra 25% no modelo com células de pacientes saudáveis. Já FAAS *et al.* (2010) sugeriram que o plasma em condições de hipertensão arterial leva à ativação de monócitos, os quais subsequentemente induziriam células endoteliais a expressar moléculas pró-inflamatórias.

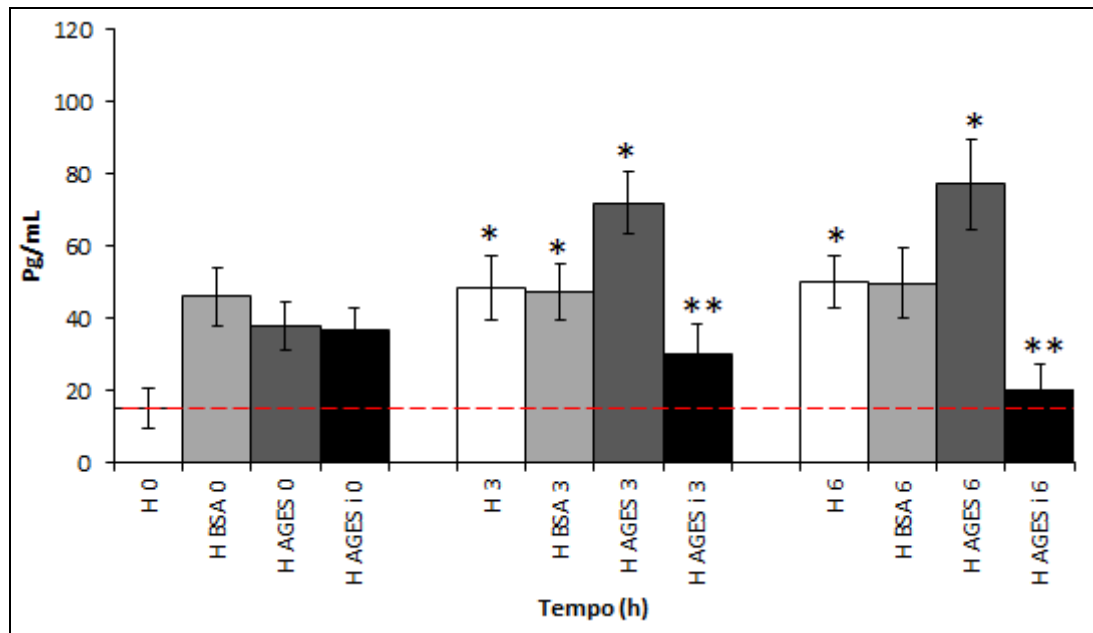
## 6.4 EXPRESSÃO *IN VITRO* DE MCP-1

### 6.4.1 HUVECs

Os níveis expressos de MCP-1 em sobrenadante celular de HUVECs estão apresentados no GRÁFICO 03. Nesse tratamento, constatou-se uma maior expressão de MCP-1 após 3 e 6 horas de exposição aos AGES, respectivamente  $72 \pm 9$ ;  $77 \pm 12$  pg/mL ( $P < 0,05$ ), quando comparada ao grupo controle ( $49 \pm 9$ ;  $50 \pm 7$  pg/mL, respectivamente) e ao exposto a BSA ( $47 \pm 8$ ;  $50 \pm 10$  pg/mL, respectivamente). Observou-se também que a expressão de MCP-1 foi drasticamente diminuída ( $P < 0,005$ ) quando a via PKC- $\beta$  foi inibida depois de 3 e 6 horas ( $30 \pm 8$ ;  $20 \pm 7$  pg/mL, respectivamente). Andréa, você vai querer adicionar mais algum dado da estatística, de acordo com o que foi discutido na arguição?



GRÁFICO 03 - EXPRESSÃO *IN VITRO* DE MCP-1 EM SOBRENADANTE CELULAR DE HUVECs APÓS 0, 3 E 6 HORAS



FONTE: O AUTOR (2012).

NOTA: H = HUVECs; i = INIBIDOR DA VIA PKC- $\beta$  GÖ-6983. \* $P < 0,05$  – H0 vs H3, H0 vs H6, H AGES 0 vs H AGES 3, H AGES 0 vs H AGES 6. \*\* $P < 0,005$  – H AGES 3 vs H AGESi 3, H AGES 6 vs H AGESi 6.

Nossos resultados corroboram com relatos anteriores, evidenciados a seguir. O MCP-1 urinário tem sido amplamente utilizado como biomarcador do processo de inflamação causada por células mononucleares para identificar injúrias renais em adultos (URBSCHAT, OBERMÜLLER e HAFERKAMP, 2011). Estudos anteriores mostram que o MCP-1 encontra-se elevado em estágios mais avançados de DRC (STINGHEN *et al.*, 2009). Foi demonstrado também que células mesangiais, podócitos e células epiteliais tubulares renais produzem uma quantidade elevada de MCP-1 na presença de alto teor de glicose e AGES (ELMARAQBY e SULLIVAN, 2012). XU *et al.* (2011) demonstraram que a expressão de mRNA de MCP-1 em HUVECs foi proporcional a concentrações crescentes de AGES aplicadas no tratamento. Chen Y *et al.* (2013) demonstraram que níveis elevados de proteína C reativa (PCR) podem levar ao aumento na expressão de MCP-1 e mRNA de MCP-1, promovendo significativamente a infiltração de macrófagos no tecido adiposo pericarotídeo, contribuindo para a perda da função endotelial como um todo. BAMBACE *et al.* (2013) demonstraram que o MCP-1 é encontrado em altas dosagens no tecido adiposo subcutâneo e epicardial de pacientes diabéticos. Esses achados sugerem que altas



concentrações de glicose circulante no sangue podem levar a um quadro de inflamação generalizada no sistema circulatório.

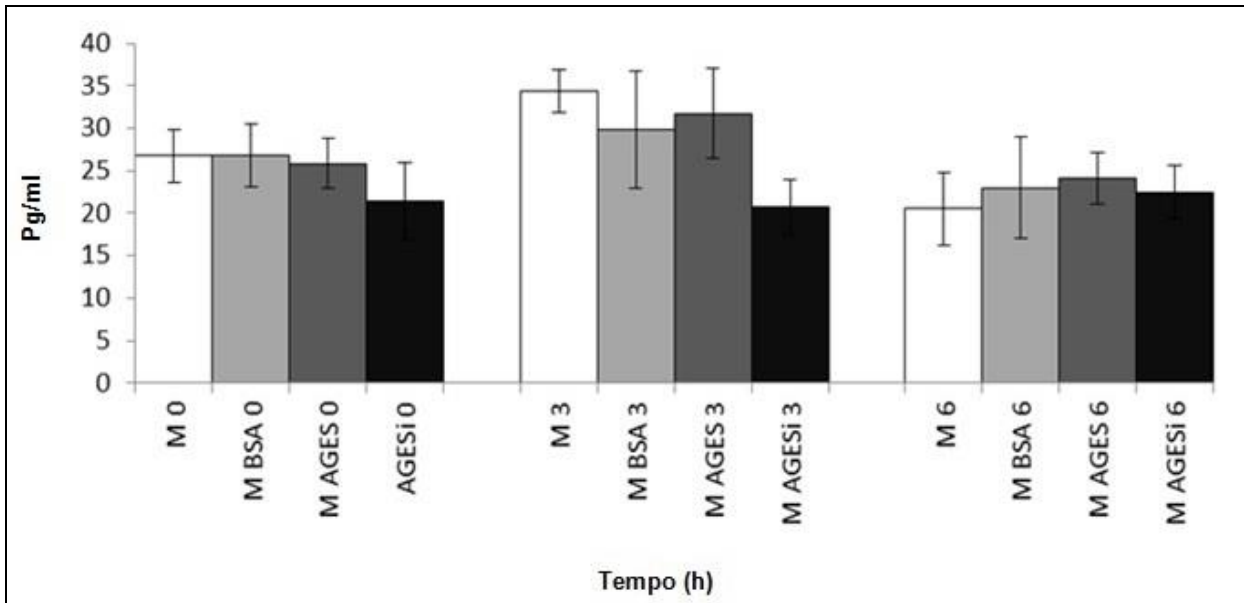
WU *et al.* (2006) evidenciaram que a ruboxistaurina (LY333531), um potente inibidor da via PKC- $\beta$ , diminuiu significativamente a expressão de MCP-1 em ratos diabéticos com alta glicose circulante. Da mesma forma, XU *et al.* (2010) sugeriram que a inibição da via PKC- $\beta$  atenuou a ação pró-inflamatória dos AGES sobre as HUVECs através de seu efeito na diminuição na expressão de citocinas inflamatórias e melhora na habilidade antioxidativa da célula. Ao inibir as isoformas PKC- $\alpha/\beta$  simultaneamente com CGP41252 em camundongos com nefropatia diabética, MENNE *et al.* (2013) demonstraram um efeito benéfico da inibição dessas vias contra o desenvolvimento de hipertrofia renal glomerular e a albuminúria.

Os dados encontrados em nosso grupo de tratamento de HUVECs indicaram que as células endoteliais aumentam a expressão de MCP-1 quando em contato com altas concentrações de AGES, de forma tempo-dependente. Evidenciou-se também que o bloqueio da via PKC- $\beta$  pode ser uma alternativa relevante de ação anti-inflamatória em pacientes com DRC, evitando assim a progressão de complicações cardiovasculares como a aterosclerose.

#### 6.4.2 Monócitos

Em estudos desenvolvidos sobre a expressão de MCP-1 por células mononucleares, COLOTTA *et al.* (1992) demonstraram que os monócitos por si só podem produzir MCP-1, sugerindo que essas células possuem autonomia na regulação de seu teor na circulação e tecidos. Porém, afirma também que alguns estímulos influenciam mais na produção de MCP-1 nessas células, como a IL-1, TNF- $\alpha$  e endotoxinas. SONG *et al.* (2012) demonstraram que o próprio envelhecimento humano leva a um aumento na produção basal de IL-6 e MCP-1 em células de músculo liso. Assim sendo, nesse trabalho decidiu-se analisar o papel dos AGES na indução de expressão de MCP-1 em monócitos de forma independente, e também em nível basal. O GRÁFICO 04 demonstra os níveis de MCP-1 encontrados em sobrenadante celular de monócitos.

GRÁFICO 04 - EXPRESSÃO *IN VITRO* DE MCP-1 EM SOBRENADANTE CELULAR DE MONÓCITOS APÓS 0, 3 E 6 HORAS.



FONTE: O AUTOR (2012).

NOTA: H = HUVECs; i = INIBIDOR DA VIA PKC- $\beta$  GÖ-6983.

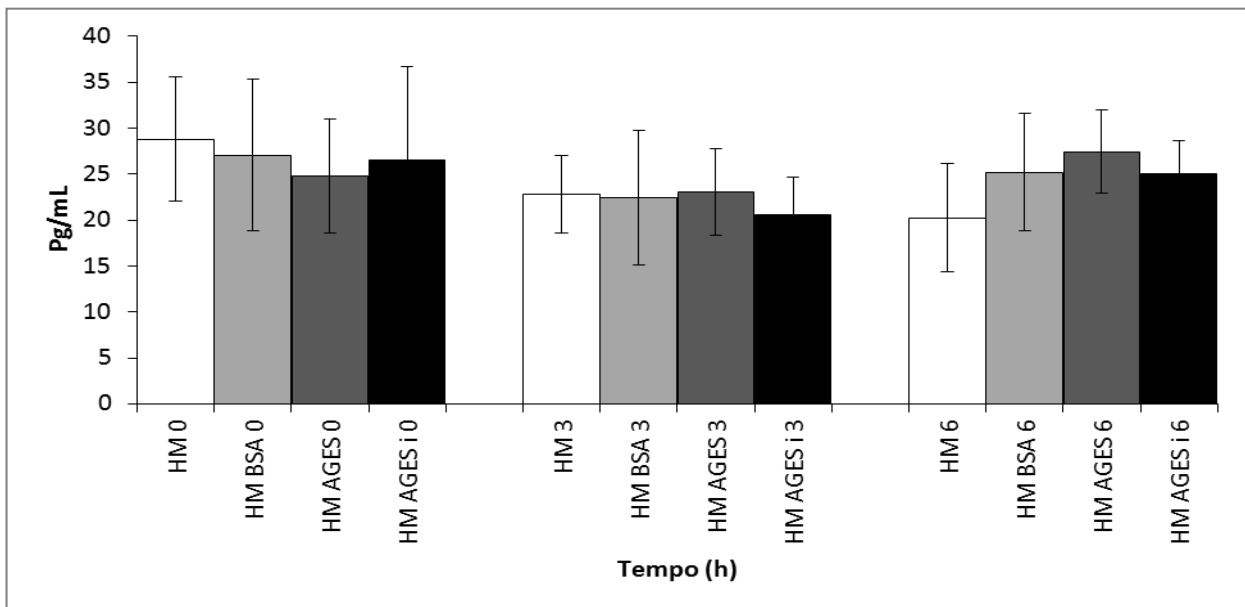
No tratamento dos monócitos, não foi observado diferença significativa entre as dosagens de MCP-1, já que os monócitos mantiveram a expressão dessa molécula em nível próximo ao basal mesmo após 3 e 6 horas. Em um estudo realizado por BERBAUM *et al.* (2008) onde macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram tratados com AGES, a expressão de MCP-1 mostrou-se aumentada somente a partir da quarta hora, com um pico relevante de produção após 12 horas. Tais achados sugerem que a cinética de expressão de MCP-1 em monócitos ocorra em períodos de tempo maiores dos que foram abordados em nosso trabalho. Outra hipótese seria de que o estímulo inicial com AGES aplicado às células não tenha sido suficiente para demandar uma resposta de expressão mais intensa. Pode-se pensar que ao manter um estímulo de contato célula-toxina de forma contínua, aproximando-se do que realmente acontece no vaso sanguíneo, talvez fosse possível obter resultados diferentes dos alcançados. Todavia, chama-nos atenção a redução na taxa de MCP-1 no grupo tratado com AGES + inibidor da via PKC- $\beta$  após 3 horas, quando comparado às células tratadas com AGES nesse mesmo período. Este achado sinaliza que a via PKC- $\beta$  possa ser uma das vias responsáveis pela produção de MCP-1 em monócitos, sugerindo ainda que sua inibição corresponda a um meio de intervenção para a regulação da expressão dessa

citocina por monócitos. Por isso, maiores análises necessitam ser realizadas para um melhor entendimento e confirmação desse mecanismo.

#### 6.4.3 Co-cultivo HUVECs + monócitos

As dosagens de MCP-1 encontradas no sobrenadante de co-cultivo HUVECs + monócitos estão representadas no GRÁFICO 05.

GRÁFICO 05 - EXPRESSÃO *IN VITRO* DE MCP-1 EM SOBRENADANTE CELULAR DE HUVECs + MONÓCITOS APÓS 0, 3 E 6 HORAS



FONTE: O AUTOR (2012).

NOTA: H = HUVECs; i = INIBIDOR DA VIA PKC- $\beta$  GÖ-6983.

Analisando-se o co-cultivo de HUVECs + monócitos notou-se que não houve diferença significativa entre os tempos testados, pois a expressão de MCP-1 conservou-se relativamente a mesma depois de 3 e 6 horas. Nossos resultados propõem que após o recrutamento e adesão dos monócitos à camada endotelial do vaso a expressão de MCP-1 seja reduzida e mantida em nível basal, ao menos que hipoteticamente uma nova carga de estímulo seja adicionada. Nosso tratamento forneceu um estímulo inicial à célula, o que em fatos reais ocorre, na verdade, de forma constante. Para tornar possível a detecção de expressões mais elevadas de MCP-1 imagina-se que talvez seja

necessário alterar a cinética de tratamento para tempos maiores. NAM *et al.* (2011) demonstraram que o nível de MCP-1 em co-cultivo de HUVECs + monócitos aumentou numa relação tempo-dependente somente após 24 e 48 horas de tratamento com AGES, o que justificaria as dosagens baixas encontradas em nosso trabalho.

É importante ressaltar a relevância dos resultados obtidos, pois nossos dados abrem novas perspectivas para intervenções terapêuticas em vias-alvo tais como a via do PKC- $\beta$ , na expressão de moléculas inflamatórias como o MCP-1. Vale salientar que mais experimentos são necessários para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na disfunção endotelial mediada por AGES.

## 7 ENSAIOS ADICIONAIS

Os ensaios a seguir serão providenciados para aperfeiçoamento dos resultados obtidos e complementação do manuscrito a ser publicado:

- Viabilidade de HUVECs por ensaio MTT;
- Dosagem de endotoxinas nos AGES;
- Dosagem de VCAM-1 em sobrenadante de HUVECs, monócitos e HUVEC + monócitos;
- Dosagem de VCAM-1 por imunocitoquímica em HUVECs.

## 8 CONCLUSÃO

- A técnica de extração/isolamento e caracterização de HUVECs foi estabelecida com eficiência, estando em conformidade para a execução dos estudos previstos;
- A produção e caracterização de AGES e controle BSA foi realizada com êxito e os produtos finais mostraram-se adequados para a realização dos tratamentos celulares;
- O modelo de co-cultivo HUVECs + monócitos foi padronizado e aperfeiçoado no decorrer do trabalho;
- HUVECs expostas aos AGES demonstraram um aumento significativo na produção de MCP-1 de forma tempo-dependente quando comparado ao controle;
- O bloqueio da via PKC- $\beta$  em HUVECs reduziu significativamente a expressão de MCP-1, sugerindo uma potencial ação anti-inflamatória através da inibição desta via;
- Não houve diferença significativa na expressão de MCP-1 em monócitos tratados com AGES após 3 e 6 horas;
- As dosagens de MCP-1 em co-cultivo HUVECs + monócitos não apresentaram diferença significativa entre os tempos testados, sugerindo que uma cinética de tratamento maior seja necessária para evidenciar alterações na expressão dessa molécula.

## REFERÊNCIAS

- ADDABBO, F.; MALLAMACI F.; LEONARDIS D.; TRIPEPI, R.; TRIPEPI G.; GOLIGORSKY M. S.; *et al.* Searching for biomarker patterns characterizing carotid atherosclerotic burden in patients with reduced renal function. **Nephrol Dial Transplant**, 2007.
- ALHAMDANI, M. S.; AL-AZZAWIE, H. F.; ABBAS, F. K. Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. **Perit Dial Int**, v. 27, n. 1, p. 86-89, 2007.
- ARIF, B.; ASHRAF, J. M.; M.; AHMAD, J.; ARIF, Z.; ALAM, K. Structural and immunological characterization of Amadori-rich human serum albumin: Role in diabetes mellitus. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 522, p. 17-25, 2012.
- ARSOV, S.; GRAAFF, R.; VAN OEVEREN, W.; STEGMAYR, B.; SIKOLE, A.; RAKHORST, G.; SMIT, A. Advanced glycation end-products and skin autofluorescence in end-stage renal disease: a review. **Clin Chem Lab Med**, 2013.
- BAUDIN, B.; BRUNEEL, A.; BOSSELUT, N.; VAUBOURDOLLE, M. Protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. **Nature Protocols**, v. 2, n. 3, p. 481-485, 2007.
- BAMBACE, C.; SEPE, A.; ZOICO, E.; *et al.* Inflammatory profile in subcutaneous and epicardial adipose tissue in men with and without diabetes. **Heart Vessels**, 2013.
- BERBAUM, K.; SHANMUGAM, K.; STUCHBURY, G.; WIEDE, F.; KÖRNER, H.; MÜNCH, G. Induction of novel cytokines and chemokines by advanced glycation end products determined with a cytometric bead array. **Cytokine**, v. 41, n. 3, p. 198-203, 2008.
- BERMÚDEZ, R. M.; GARCÍA, S. G.; SURRIBAS, D. P.; CASTELAO, A. M.; SANJUÁN, J. B. Consensus document. Recommendations on assessing proteinuria during the diagnosis and follow-up of chronic kidney disease. **Nefrologia**, v. 31, n. 3, p. 331-345, 2011.
- BUCCIARELLI, L.; WENDT, T.; RONG, L.; *et al.* RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, n. 7, p. 1117-1128, 2002.
- CHEN, Y.; *et al.* C-reactive protein promotes vascular endothelial dysfunction partly via activating adipose tissue inflammation in hyperlipidemic rabbits. **Int J Cardiol**, 2013.
- COHEN, G.; GLORIEUX, G.; THORNALLEY, P.; SCHEPERS, E.; MEERT, N.; JANKOWSKI, J.; *et al.* Review on uraemic toxins III: recommendations for handling

uraemic retention solutes *in vitro* towards a standardized approach for research on uraemia. **Nephrol Dial Transplant**, 2007.

COLOTTA, F.; SCIACCA, F.; SIRONI, M.; LUINI, W.; RABIET, M. J.; MANTOVANI, A. Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. **American Journal of Pathology**, v.144, n. 5, p. 975-985, 1994.

DANIS, R.P.; SHEETZ, M. J. Ruboxistaurin: PKC-beta inhibition for complications of diabetes. **Expert Opin Pharmacother**, v. 10, n. 17, p. 2913-2925, 2009.

DIAZ-BUXO, J. A.; WOODS, H. F. Protecting the endothelium: a new focus for management of chronic kidney disease. **Hemodial Int**, v. 10, n. 1, p. 42-48, 2006.

ELMARAQBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**, 2010.

EL NAHAS, M. Cardio-kidney-damage: a unifying concept. **Kidney Int**, v. 78, n. 1, p. 14-18, 2010.

FAAS, M. M.; PAMPUS, M. G. van; ANNINGA, Z. A.; SALOMONS, J.; WESTRA, I. M.; DONKER, R. B.; AARNOUDSE, J. G.; VOS, P. de. Plasma from preeclamptic women activates endothelial cells via monocyte activation *in vitro*. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 87, p. 28-38, 2010.

FIGAROLA, J. L.; SHANMUGAM, N.; NATARAJAN, R.; RAHBAR, S. Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. **Diabetes**, v. 56, n. 3, p. 647-655, 2007.

GERALDES, P.; KING, G. L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. **Circ Res**, v. 106, n. 8, p. 1319-1331, 2010.

GLASSOCK, R. J. Uremic toxins: what are they? An integrated overview of pathobiology and classification. **J Ren Nutr**, v. 18, n. 1, p. 2-6, 2008.

GOLDIN, A.; JOSHUA, A. B.; SCHMIDT, A. M.; CREAGER, M. A. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, p. 597-605, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

HEGAB, Z.; GIBBONS, S.; NEYSES, L.; MAMAS, M. A. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. **World J Cardiol**, v. 4, n. 4, p. 90-102, 2012.

HIMMELFARB, J. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. **Semin Dial**, v. 22, n. 6, p. 636-643, 2009.



IDRIS, I.; DONNELLY, R. Protein kinase C  $\beta$  inhibition: a novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 3, p. 172, 2006.

IWASHIMA, Y.; ETO, M.; HORIUCHI, S.; SANO, H. Advanced glycation end product-induced peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  gene expression in the cultured mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 264, n. 2, p. 441-448, 1999.

KOLATTUKUDY, P. E.; NIU, J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. **Circ Res**, v. 110, p. 174-189, 2012.

KUSANO, K. F.; NAKAMURA, K.; KUSANO, H.; NISHII, N.; BANBA, K.; IKEDA, T.; *et al.* Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. **Circ J**, v. 68, n. 7, p. 671-676, 2004.

LI, A. C.; GLASS, C. K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1235-1242, 2002.

LIBBY, P.; DICARLI, M.; WEISSLEDER, R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. **J Nucl Med**, v. 51, p. 33-37, 2010.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUU, N. T.; MADDEN, J.; CALDER, P.C.; GRIMBLE, R. F.; SHEARMAN, C. P.; CHAN, T.; TULL S. P.; DASTUR, N.; RAINGER, G.E.; NASH, G. B. Comparison of the pro-inflammatory potential of monocytes from healthy adults and those with peripheral arterial disease using an *in vitro* culture model. **Atherosclerosis**, v.193, p. 259-268, 2007.

MA, Y.; HE, X.; WANG, H.; XIA, Y.; WANG, S.; YE, Z.; TAO, H. Interaction of coagulation factors and tumor-associated macrophages mediates migration and invasion of gastric cancer. **Cancer Science**, v. 102, n. 2, p. 336-342, fev., 2011.

MALYSZKO, J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Clinica Chimica Acta**, p. 1412-1420, 2010.

MASSRY, S. G. Is parathyroid hormone a uremic toxin? **Nephron**, v. 19, n. 3, p. 125-130, 1977.

MASSY, Z. A.; IVANOVSKI, O.; NGUYEN-KHOA, T.; ANGULO, J.; SZUMILAK, D.; MOTHU, N.; *et al.* Uremia accelerates both atherosclerosis and arterial calcification in apolipoprotein E knockout mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 1, p. 109-116, 2005.

MEERWALDT, R.; ZEEBREGTS, C. J.; NAVIS, G.; HILLEBRANDS, J. L.; LEFRANDT, J. D.; SMIT, A. J. Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. **Am J Kidney Dis**, v. 53, n. 1, p. 138-150, 2009.

MEIJERS, B. K.; CLAES, K.; BAMMENS, B.; DE LOOR, H.; VIAENE, L.; VERBEKE, K.; et al. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 5, n. 7, p. 1182-1189, 2010.

MENNE, J.; SHUSHAKOVA, N.; BARTELS, J.; KIYAN, Y.; LAUDELEY, R.; HALLER, H.; et al. Dual inhibition of classical protein kinase C- $\alpha$  e protein kinase C- $\beta$  isoforms protects against experimental murine diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 62, p. 1167-1174, 2013.

NAM, M. H.; LEE, H. S.; SEOMUN, Y.; LEE, Y.; LEE, K. W. Monocyte-endothelium-smooth muscle cell interaction in co-culture: Proliferation and cytokine productions in response to advanced glycation end products. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1810, p. 907-912, 2011.

PIRODDI, M.; BARTOLINI, D.; CIFOLILLI, S.; GALLI, F. Nondialyzable uremic toxins. **Blood Purif**, v. 35, n. 2, p. 30-41, 2013.

PONGOR, S.; ULRICH, P. C.; BENCSATH, F. A.; CERAMI, A. Aging of proteins: Isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. **Proc Natl Acad Sci**, v. 81, n. 1, p. 2684-2688, 1984.

RAINER, G. E.; WAUTIER, M. P.; NASH, G. B.; WAUTIER, J.L. Prolonged E selectin induction by monocytes potentiates the adhesion of flowing neutrophils to cultured endothelial cells. **British Journal of Haematology**, v. 92, p. 192-199, 1996.

RIBEIRO, V. **Influência da uremia na resposta celular e expressão da quimiocina CXCL12 em pacientes em hemodiálise**. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SCHWEDLER, S.; SCHINZEL, R.; VAITH, P.; WANNER, C. Inflammation and advanced glycation end products in uremia: simple coexistence, potentiation or causal relationship? **Kidney Int Suppl**, v. 78, p. 32-36, 2001.

SEGAL, M. S.; BAYLIS, C.; JOHNSON, R. J. Endothelial health and diversity in the kidney. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, n. 2, p. 323-324, 2006.

SEMBA, R. D.; NICKLETT, E. J.; FERRUCCI, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 65, n. 9, p. 963-975, 2010.

SHANTSILA, E.; LIP, G. Y. H. Monocytes in acute coronary syndromes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 1433-1438, 2009.

SCHMITT, A.; SCHMITT, J.; MÜNCH, G.; GASIC-MILENCOVIC, J. Characterization of advanced end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. **Analytical Biochemistry**, p. 201-215, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **Censo Brasileiro de Diálise**. São Paulo, 2011.

SONG, Y.; SHEN, H.; SCHENTEN, D.; SHAN, P.; LEE, P. J.; GOLDSTEIN, D.R. Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 1, p. 103-109, 2012.

STENVINKEL, P.; LINDHOLM, B.; HEIMBÜRGER, M.; HEIMBÜRGER O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predicts death in predialysis patients: Association with malnutrition, inflammation and cardiovascular disease. **Nephrol Dial Transpl**, v. 15, p. 1624-1630, 2000.

STINGHEN, A. E.; GOLÇALVES, S. M.; MARTINES, E. G.; NAKAO, L. S.; RIELLA, M. C.; AITA C. A.; et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron Clin Pract**, v. 111, n. 2, p. 117-126, 2009.

SULIMAN, M. E.; QURESHI, A. R.; HEIMBÜRGER, O.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: a predictor of outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 6, p. 1603-1610, 2006.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. **Physiol Rev**, v. 86, p. 515-581, 2006.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N. Highlights and hotspots of protein glycation in end-stage renal disease. **Semin Dial**, v. 22, n. 4, p. 400-404, 2009.

URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers**, v. 16, n. S1, p. 22-30, 2011.

VALENCIA, J. V.; WELDON, S. C.; QUINN, D.; KIERS, G. H. DEGROOT, J.; TEKOPPELE, J. M.; et al. Advanced glycation end products ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. **Analytical biochemistry**, p. 68-78, 2004.

VANHOLDER, R.; ARGILES, A.; BAURMEISTER, U.; BRUNET, P.; CLARK, W.; COHEN, G.; et al. Uremic toxicity: present state of the art. **Int J Artif Organs**, v. 24, n. 10, p. 695-725, 2001.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; GLORIEUX, G.; ARGILES, A.; BAURMEISTER, U.; BRUNET, P.; *et al.* Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney Int**, v. 63, n. 5, p. 1934-1943, 2003.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatr Nephrol**, v. 23, n. 8, p. 1211-1221, 2008.

WAJCHENBERG, B. L. Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 5, p. 514-519, 2002.

WIESNER, P.; TAFELMEIER, M.; CHITTKA, D.; CHOI, S.; ZHANG, L.; BYUN, Y.; *et al.* MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma. **J Lipid Research**, 2013.

WU, Y.; WU, G.; QI, X.; LIN, H.; QIAN, H.; SHEN, J.; LIN, S. Protein kinase C beta inhibitor LY333531 attenuates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in the kidney in diabetic rats. **J Pharmacol Sci**, v.101, n. 4, p. 335-343, 2006.

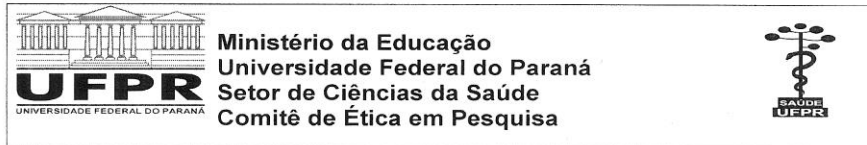
XU, S. H.; WANG, K. F.; XU, C. S.; XIE, L. D. Effect of atorvastatin on advanced glycation end products induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in cultured human endothelial cells. **Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi**, v. 39, n. 6, p. 512-517, 2011.

XU, Y.; WANG, S.; FENG, L.; ZHU, Q.; XIANG, P.; HE, B. Blockade of PKC-beta protects HUVEC from advanced glycation end products induced inflammation. **Int Immunopharmacol**, 2010.

ZIEMAN, S.; KASS, D. Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. **Congest Heart Fail**, v. 10, n. 3, p. 144-149, 2004.

## APÊNDICE

### APÊNDICE I



Curitiba, 11 de outubro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Andréa Emília Marques Stingenhen**  
**Lisienny Campoli Tono Rempel**  
**Roberto Pecoits-Filho**  
**Vanessa Ribeiro**  
**Liandra Kondrat**  
**Geison Tibera**

**Nesta**

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**ESTUDOS IN VITRO DOS MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL CAUSADA POR PRODUTOS DE GLICOSILAÇÃO AVANÇADA (AGES)**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 29 de junho de 2011 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 11 de outubro de 2011.

Registro **CEP/SD**: 1139.064.11.06

**CAAE**: 0062.0.091.000-11

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 1º relatório parcial e/ou de conclusão: 11/04/2012.**

Atenciosamente

**Profª. Drª. Cláudia Seely Rocco**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em  
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

**Profª. Drª. Cláudia Seely Rocco**  
 Coordenadora do Comitê de Ética  
 em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – C EP 80060-240  
 Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

## APÊNDICE II

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA COLETA DE CORDÃO UMBILICAL

Você, mulher em trabalho de parto, maior de 18 anos, 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 que baixam suas defesas (imunossupressores), que não tem histórico de abuso de álcool ou drogas ilícitas, está sendo convidada a participar dos estudos: *“Avaliação da resposta inflamatória frente à toxicidade urêmica e expressão da citocina CXCL12 em pacientes com doença renal crônica”* e *“Estudos in vitro dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na disfunção endotelial causada por produtos de glicação avançada (AGES)”*. 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 estudar inflamação, um processo que é intenso em pessoas com rins que não funcionam corretamente. Por isso, células obtidas do cordão umbilical doado serão utilizadas como modelo para essa pesquisa.
- (ii) Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento da doença renal, e futuramente melhorar o diagnóstico dessa doença. A doação do cordão umbilical para essa pesquisa não beneficiará diretamente você ou seu filho(a), mas poderá beneficiar a um médio-longo prazo outras pessoas portadoras de doença renal;
- (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 nenhuma forma de pagamento;
- (viii) As células obtidas do cordão umbilical poderão ser armazenadas mediante sua aprovação, para serem utilizadas em pesquisas posteriores. Entretanto, toda nova pesquisa a ser feita com este material será submetida para aprovação por um Comitê de Ética em Pesquisa. Por isso pedimos que assinale abaixo se autoriza ou não tal armazenamento.
- (ix) As pesquisadoras Andréa E. M. Stinghen e Lisienny Campoli Tono Rempel podem ser encontradas no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, no Departamento de Patologia Básica, sala 143A, pelo telefone: (41) 3361-1691 das 8:30 às 17:30, ou pelos emails: andreastinghen@ufpr.br e lisienny\_rempel@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 das pesquisas citadas acima, sob responsabilidade da Profª. Dra. Andréa E. M. Stinghen e sua orientada de pós- graduação Lisienny Campoli Tono Rempel, na Universidade Federal do Paraná, UFPR.

( ) Aceito o armazenamento do material doado e sua utilização em pesquisas posteriores.

( ) Não aceito o armazenamento do material doado, nem sua utilização em pesquisas posteriores.

\_\_\_\_\_  
Nome, data e assinatura

Dra. Andréa \_\_\_\_\_

Mestranda Lisienny \_\_\_\_\_

<p>Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>
--

## APÊNDICE III

**PRODUÇÃO RELACIONADA AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO:**

1. Resumo publicado em formato de pôster no XXVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia (2012), com o título: “Papel da via PKC- $\beta$  na expressão de MCP-1 após exposição a produtos de glicação avançada (AGES)”.
2. Resumos publicados no *Abstract Supplement 2012* do *Journal of the American Society of Nephrology* (JASN) e no *Kidney Week 2012 Program Builder*, com o título: “Advanced glycation end products and MCP-1 expression by endothelial cell through PKC- $\beta$  pathway” – Disponíveis no endereço eletrônico: <http://www.asn-online.org/>.
3. Aceite de publicação de manuscrito na *Latin American Journal of Pharmacy* intitulado “**Evaluation of Uleine in Cellular Adhesion of Murine Melanoma (B16F-10) and Human Gastric Carcinoma Cells (KATO III and MKN)**” por Wesley M. Souza, Lisienny C. T. Rempel, Rayana A. P. Maciel, Cid A. M. Santos & Andréa E. M. Stinghen, conforme ANEXO I.
4. Manuscrito intitulado “**Soro urêmico inibe a expressão da quimiocina SDF-1: possível impacto da toxicidade urêmica na lesão endotelial**” por Vanessa R. Heidemann, Bruna Bosquetti, Lisienny C. T. Rempel, Rayana A. P. Maciel, Simone M. Gonçalves, Sérgio G. E. Bucharles, Roberto Pecoits-Filho, Rodrigo B. Oliveira & Andréa E. M. Stinghen, submetido ao *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, conforme ANEXO II.
5. Participação em eventos:
  - XXVI Congresso Brasileiro de Nefrologia (2012);
  - Simpósio ISN-YNC - “Vascular calcification: new insights into underlying mechanisms and therapeutic strategies” (2012);
  - IV Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia (2011).

**ANEXOS**

## ANEXO I

**CARTA DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO DE MANUSCRITO:**

From: **Latin American Journal of Pharmacy** <info@latamjpharm.org>  
Date: 2013/5/18  
Subject: Latin American Journal of Pharmacy - Answer to the Presentation of Manuscript  
To: Andréa Stinghen <andreastinghen@ufpr.br>, Andréa Stinghen  
<andreastinghen@ufpr.br>

May 18th, 2013

Andréa Stinghen  
Federal University of Paraná (andreastinghen@ufpr.br)  
Manuscript Identification Number: LAJP 3277-13

Dear author:

I am glad to inform you that your article '**Evaluation of Uleine in Cellular Adhesion of Murine Melanoma (B16F-10) and Human Gastric Carcinoma Cells (KATO III and MKN)**' by *Wesley M. Souza, Lisienny C. T. Rempel, Rayana A. P. Maciel, Cid A. M. Santos & Andréa E. M. Stinghen* has been accepted for publication in Latin American Journal of Pharmacy. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments:

The manuscript "Evaluation of Uleine in Cellular Adhesion of Murine Melanoma (B16F-10) and Human Gastric Carcinoma Cells (KATO III and MKN) " has been fully revised, completed some references and corrected some terms. Is now suitable for publication.

Yours sincerely,

Prof. Néstor O. Caffini, Editor  
Latin American Journal of Pharmacy  
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar



## ANEXO II

**CARTA DE RECEBIMENTO DE MANUSCRITO PARA AVALIAÇÃO:**

De: <sgpjbn@sgponline.com.br>  
Data: 26 de março de 2013 07:35  
Assunto: Artigo Corrigido SGP/JBN  
Para: andreastinghen@ufpr.br

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) Andréa Emilia Marques Stinghen  
Referente ao código de fluxo: 2712  
Classificação: Artigo Original

Informamos que recebemos A CORREÇÃO do manuscrito SORO URÊMICO INIBE A EXPRESSÃO DA QUIMIOCINA SDF-1: POSSÍVEL IMPACTO DA TOXICIDADE URÊMICA NA LESÃO ENDOTELIAL que será reanalisado e verificado a possível publicação no Jornal Brasileiro de Nefrologia.

Por favor, para qualquer comunicação sobre o referido manuscrito cite o código de fluxo apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho no Jornal Brasileiro de Nefrologia.

Atenciosamente,

Dr. João Egídio Romão Junior

Editor

Rua Machado Bittencourt, 205,  
5º andar, conj. 53, Vila Clementino,  
São Paulo - SP, CEP 04044-000  
E-mail: jbn@sbn.org.br  
Fone: (11) 5579-1242