

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA AMARAL BUENO AZEVEDO

EFEITO DO AMBIENTE URÊMICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS E NA
FORMAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES: PAPEL DA TOXINA N-ÓXIDO
DE TRIMETILAMINA (TMAO)

CURITIBA

2025

CAROLINA AMARAL BUENO AZEVEDO

EFEITO DO AMBIENTE URÊMICO EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS E NA
FORMAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES: PAPEL DA TOXINA N-ÓXIDO
DE TRIMETILAMINA (TMAO)

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Emília Marques
Stinghen

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Regiane Stafim da Cunha

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Azevedo, Carolina Amaral Bueno.

Efeito do ambiente urêmico em células endoteliais humanas e na formação de vesículas extracelulares: papel da toxina n-óxido de trimetilamina (TMAO). / Carolina Amaral Bueno Azevedo. - Curitiba, 2025

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof.^a Dra. Andréa Emília Marques Stinghen.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Regiane Stafim da Cunha.

1. Insuficiência renal crônica. 2. Disfunção endotelial. 3. Vesículas extracelulares. I. Stinghen, Andréa Emília Marques, 1970-. II. Cunha, Regiane Stafim da, 1992-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINA AMARAL BUENO AZEVEDO**, intitulada: **Efeito do Ambiente Urêmico em Células Endoteliais Humanas e na Formação de Vesículas Extracelulares: Papel da Toxina N-Óxido de Trimetilamina (TMAO)**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Novembro de 2025.

Assinatura Eletrônica

05/12/2025 13:01:22.0

ANDREA EMILIA MARQUES STINGHEN
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/12/2025 11:48:25.0

MARIA APARECIDA DALBONI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO)

Assinatura Eletrônica

05/12/2025 10:40:46.0

ANDREA NOVAIS MORENO AMARAL
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/12/2025 11:06:51.0

CRISTINA RIBAS FÜRSTENAU
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC)

Dedico essa tese a uma criança que gostava de sonhar, a uma adolescente que pensou ter perdido o rumo e a mulher que superou os obstáculos e está construindo uma vida dia após dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meus avós Francisca e Edmundo, por cuidarem e acreditarem em mim, ao meu marido, André, por ser meu parceiro por todos esses anos e me incentivar a seguir esse caminho científico, por mais difícil que fosse, e a minha mãe, Aparecida de Fátima, que mesmo não estando mais entre nós continua minha fonte de inspiração e força.

A minha orientadora, Professora Doutora Andréa Stinghen, pela oportunidade dada a uma paulista recém-graduada, obrigada por acreditar em mim e me possibilitar tanto conhecimento. A minha coorientadora Professora Doutora Regiane Stafim da Cunha por ter me ensinado tantos experimentos, análises, por ter sido mentora e em especial, amiga. A Professora Doutora Edneia Cavalieri e Professora Doutora Juliana Ferreira de Moura pelo apoio e carinho. Aos meus companheiros de laboratório Guilherme, Gabriela, Emilene, Vanessa, Aline e Roberta por segurarem minha mão e por criarem um ambiente tão gostoso de se trabalhar.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, que contribuíram para minha formação profissional, científica e pessoal.

Aos meus amigos, sejam aqueles que me acompanham desde a infância, até aqueles que fui encontrando durante ao caminhar da vida. Muitas vezes foram eles que enxergaram um potencial que eu não conseguia, e não deixaram que eu desistisse. Obrigada por terem sido luz e apoio.

A Universidade Federal do Paraná, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a todos que possibilitaram a realização deste estudo.

Muito obrigada.

*“Não convém a gente levantar escândalo de começo, só aos poucos é que o escuro
é claro”*

Guimarães Rosa

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva da função renal com elevada morbimortalidade, sobretudo por doenças cardiovasculares, frequentemente associadas à disfunção endotelial. Essa disfunção é marcada por aumento da permeabilidade vascular, perda de adesão celular e alterações nas junções intercelulares, sendo fortemente influenciada pelo acúmulo de toxinas urêmicas que se acumulam na circulação em função da falha da função renal, tais como o p-cresil sulfato (PCS), indoxil sulfato (IS) e N-óxido de trimetilamina (TMAO), que atuam de forma ativa na patogênese da DRC ao induzir diversos efeitos em órgãos e tecidos. No presente estudo, *in vitro* demonstramos um mecanismo onde o TMAO induz disfunção endotelial por meio da redução da viabilidade celular, diminuição da expressão de proteínas de adesão célula-célula tais como VE-caderina e aumento de sua fosforilação em tirosina 658, resultando em maior permeabilidade e menor adesão à proteínas célula-matriz tais como a fibronectina. Outro efeito destas toxinas é a indução da formação de vesículas extracelulares (VEs). Observamos que células endoteliais tratadas com PCS, IS e TMAO em concentrações urêmicas produzem VEs com expressão de marcadores clássicos, tais como CD63, CD9, ALIX, TSG101, HSP70. As VEs induzidas pelas toxinas foram capazes de diminuir a viabilidade celular, contudo apenas VEs-controle e VEs-IS promoveram redução dose-dependente da viabilidade endotelial. Estes achados conectam diretamente toxinas urêmicas à disfunção endotelial e destacam as VEs como mediadores ativos neste processo, oferecendo perspectivas para futuras estratégias terapêuticas visando reduzir complicações cardiovasculares em pacientes com DRC.

Palavras-chave: doença renal crônica; disfunção endotelial; vesículas extracelulares; TMAO.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is characterized by the progressive loss of renal function and high morbidity and mortality, particularly due to cardiovascular diseases, which are frequently associated with endothelial dysfunction. This dysfunction is marked by increased vascular permeability, loss of cell adhesion, and alterations in intercellular junctions, and is strongly influenced by the accumulation of uremic toxins in the circulation as a consequence of renal failure, such as p-cresyl sulfate (PCS), indoxyl sulfate (IS), and trimethylamine N-oxide (TMAO). These toxins actively contribute to CKD pathogenesis by inducing multiple effects in different organs and tissues. In the present in vitro study, we demonstrated a mechanism by which TMAO induces endothelial dysfunction through reduced cell viability, decreased expression of cell–cell adhesion proteins such as VE-cadherin, and increased phosphorylation at tyrosine 658, resulting in increased permeability and reduced adhesion to cell–matrix proteins such as fibronectin. Another effect of these toxins is the induction of extracellular vesicle (EV) formation. We observed that endothelial cells treated with PCS, IS, and TMAO at uremic concentrations produced EVs expressing classical markers such as CD63, CD9, ALIX, TSG101, and HSP70. The toxin-induced EVs were able to reduce cell viability; however, only control EVs and IS-induced EVs promoted a dose-dependent reduction in endothelial viability. These findings directly link uremic toxins to endothelial dysfunction and highlight EVs as active mediators in this process, offering perspectives for future therapeutic strategies aimed at reducing cardiovascular complications in patients with CKD.

Keywords: chronic kidney disease; endothelial dysfunction; extracellular vesicles; TMAO.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolização do TMAO	21
Figura 2. Classificação das vesículas extracelulares	23
Figura 3. Distribuição do tamanho e morfologia das VEs	33
Figura 4. Detecção dos marcadores clássicos de VEs.	34
Figura 5. Viabilidade de células endoteliais expostas as VEs.....	35
Figura 6. Internalização das VEs por células endoteliais.....	35
Figura 7. Resumo esquemático do trabalho	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estadiamento da Doença Renal Crônica (DRC)	19
Tabela 2. Caracterização de tamanho e concentração das VEs	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AQP1 – Aquaporina 1
AQP2 – Aquaporina 2
DCV – Doenças Cardiovasculares
DE – Disfunção Endotelial
DRC – Doença Renal Crônica
EndMT – Transição epitélio-mesenquimal
FMO3 – *Flavin-containing monooxygenase 3*
GBD – *Global Burden of Disease*
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1
IL-18 - Interleucina 18
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina 6
IRA – Injúria Renal Aguda
IS – indoxil sulfato
KDIGO – *Kidney Disease Improving Global Outcomes*
MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócitos 1
NF- κ B – Fator Nuclear κ B
NO – Óxido Nítrico
PBUT – protein-bound uremic toxins
PCS – p-cresil sulfato
TFG – Taxa de Filtração Glomerular
TGF- β – Fator de crescimento transformador β
TMA – Trimetilamina
TMAO – n-óxido de trimetilamina
TNF- α – Fato de necrose tumoral α
TRS – Terapias Renais Substitutivas
TU – Toxinas urêmicas
VCAM-1 – Molécula de adesão de células vasculares 1
VEGF-A – Fator de crescimento endotelial vascular A
VEs – Vesículas Extracelulares

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	18
2.2 N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA (TMAO).....	21
2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES	22
CAPÍTULO 1.....	26
<i>Trimethylamine n-oxide (TMAO) impairs VE-cadherin–dependent endothelial junctions and promotes vascular permeability in chronic kidney disease</i>	<i>27</i>
ABSTRACT:	27
3 CAPÍTULO 2.....	28
<i>Vesículas extracelulares produzidas por células endoteliais no ambiente urêmico ..</i>	<i>28</i>
3.1 METODOLOGIA	28
3.1.1 CULTIVO CELULAR	28
3.1.2 INDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE VES	28
3.1.3 ISOLAMENTO DAS VES	29
3.1.4 ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS (NTA).....	29
3.1.5 CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) 29	
3.1.6 WESTERN BLOTTING	30
3.1.7 VIABILIDADE CELULAR.....	30
3.1.8 INTERNALIZAÇÃO DAS VES POR CÉLULAS ENDOTELIAIS	31
3.1.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3.2 RESULTADOS.....	31
3.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS VES	31
3.2.2 EFEITOS DAS VES NA VIABILIDADE CELULAR	34
3.2.3 INTERNALIZAÇÃO DAS VES POR CÉLULAS ENDOTELIAIS	35
3.3 DISCUSSÃO	36
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS	40
ANEXO 1 – PRODUÇÃO ACADÊMICA	49

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um importante e crescente desafio enfrentado pelos sistemas de saúde. Dados do *Global Burden of Disease* (GBD) em 2017 demonstram que há cerca de 697,5 milhões de pessoas com DRC no mundo, com uma incidência de 9,1% (Bikbov et al., 2020). A caracterização proposta pela *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) define a DRC como perda da função renal, demonstrada pela taxa de filtração glomerular (TFG) inferior a 60mL/min/1,73m², marcadores de dano renal, ou ambos, por um período superior a 3 meses (Inker et al., 2014). Perda e hipertrofia dos néfrons, fibrose e a filtração glomerular prejudicada são as principais características fisiopatológicas da DRC (Romagnani et al., 2017). Com a progressão da doença, os rins perdem a capacidade de filtração e remoção de solutos tóxicos presentes no sangue, conhecidos como toxinas urêmicas, que se acumulam no organismo levando a um estado chamado de uremia (Cozzolino; Magagnoli; Ciceri, 2025; Vanholder et al. 2024). Essas toxinas são classificadas em três grupos: moléculas pequenas solúveis em água (≤ 500 Da), moléculas médias (> 500 Da) e solutos ligados a proteínas (PBUT – *protein-bound uremic toxins*). O n-óxido de trimetilamina (TMAO) é uma toxina urêmica de baixo peso molecular gerada a partir da metabolização de colina, L-carnitina e betaína, presentes na dieta (Zixin et al., 2022). Na DRC, os altos níveis de TMAO estão relacionados a ocorrência e prognóstico da doença, podendo também atuar como fator de risco (Cho & Caudill, 2017). Apesar de ser parcialmente removido pela diálise, o TMAO permanece elevado em pacientes dialíticos, associando-se a maior risco cardiovascular, mortalidade e menor sobrevida (Gruppen et al., 2017; Kim et al., 2016; Stubbs et al., 2016; Zhou et al., 2022).

Apesar dos avanços significativos nas terapias renais substitutivas (TRS) e no entendimento da fisiopatologia da DRC, a mortalidade anual desses pacientes permanece extremamente elevada, sendo os eventos cardiovasculares a principal causa de óbito (Hauser et al., 2008). O acúmulo de toxinas urêmicas prejudica ainda mais a TFG, favorecendo a retenção de solutos tóxicos e desencadeando respostas inflamatórias exacerbadas. Esse ciclo amplifica lesões em outros órgãos, contribuindo para a progressão da disfunção endotelial (DE) e acelerando o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Bro et al., 2004; Falconi et al., 2021; Fujii et al., 2018). DE

é um componente chave no desenvolvimento da DCV na DRC. Vesículas extracelulares (VEs) emergem como biomarcadores dessa disfunção, essas estruturas são delimitadas por uma bicamada lipídica e transportam biomoléculas como proteínas, microRNAs (miRNAs) e metabólitos provenientes de sua célula de origem, possibilitando a transferência desse conteúdo para células-alvo e, consequentemente, modulando mecanismos fisiológicos e patológicos (Azevedo et al., 2021; Borges et al., 2013; Nederveen et al., 2021; Yáñez-Mó et al., 2015).

Os efeitos do TMAO nas células endoteliais, especialmente o impacto na disfunção endotelial e na formação de VEs, ainda é pouco explorado. Diante disso, o presente estudo investigou alterações induzidas pelo TMAO em células endoteliais, incluindo a formação de VEs e seus efeitos funcionais, com potencial uso como biomarcadores de disfunção endotelial. O Capítulo 1 apresenta o resumo do artigo experimental *“Trimethylamine n-oxide (TMAO) disrupts VE-Cadherin-mediated endothelial junctions and increases vascular permeability in chronic kidney disease”*, focando no impacto desta toxina urêmica nas proteínas de junção celular e na permeabilidade vascular. O Capítulo 2, *“Vesículas extracelulares produzidas por células endoteliais no ambiente urêmico”*, avalia a formação de VEs induzidas por TMAO, PCS e IS e seu impacto sobre o endotélio.

Em suma, toxinas urêmicas estão intrinsecamente associadas à disfunção celular e ao dano vascular, eventos que contribuem para DCV e agravamento da DRC. O estudo isolado de toxinas como o TMAO auxilia no entendimento dos mecanismos envolvidos e abre caminhos para novas intervenções terapêuticas, visando melhorar a sobrevida dos pacientes com DRC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A DRC vem crescendo como um importante problema de saúde pública global, atingindo mais de 10% da população mundial, com crescimento constante nas últimas décadas (Kovesdy, 2022; K. Xie et al., 2025). Dados do *Global Burden of Diseases* indicam que a DRC é a 11ª principal causa de morte mundial (Duncan et al., 2024). Em especial, países de baixa e média renda possuem maior dificuldade para lidar com suas consequências, devido à dificuldade de diagnóstico e acesso ao tratamento (Kovesdy, 2022). Além de um importante contribuinte para a morbimortalidade, a DRC também é um importante fator de risco para DCV. Indivíduos com DRC possuem risco significativamente maior mortalidade cardiovascular, com cerca de 40 a 50% das mortes na DRC avançada sendo atribuídas a desfechos cardiovasculares (Jankowski et al., 2021). O estudo GBD demonstrou que 1,4 milhões de mortes por DCV foram atribuídas à função renal prejudicada em 2017 (Bikbov et al., 2020), exemplificando a forte correlação entre doenças renais e cardiovasculares.

A DRC é definida como perda da função renal, demonstrada pela TFG inferior a 60mL/min/1,73m², marcadores de dano renal, ou ambos, por um período superior a 90 dias (Inker et al., 2014). Com base na TFG é possível determinar o estadiamento da DRC de 1 a 5 de acordo com a classificação proposta pela KDIGO (tabela 1). Indivíduos em estágio 5 de DRC necessitam de TRS, que incluem duas modalidades de diálise (hemodiálise e diálise peritoneal) e o transplante renal.

Tabela 1. Estadiamento da Doença Renal Crônica (DRC)

Estágios da Doença Renal Crônica		TFG (mL/min/1.73m ²)
Estágio 1	Dano renal, com função renal normal	≥ 90
Estágio 2	Dano renal com pequena perda da função renal	60 - 89
Estágio 3a	Perda moderada a média da função renal	45 – 59
Estágio 3b	Perda moderada a severa da função renal	30 – 44
Estágio 4	Perda severa da função renal	15 – 29
Estágio 5	Falência renal	< 15

NOTA: A medida 1,73m³ é o equivalente à média da superfície corporal.

Adaptado de National Kidney Foundation (2018).

De acordo com o relatório *International Society of Nephrology Global Kidney Health Atlas 2023*, a prevalência de pacientes em TRS tem mediana global de cerca de 822,8 por milhão de população (Prihodina et al., 2024). Estima-se que até 2030 mais de 5,4 milhões de pessoas mundialmente estarão em uso da TRS (Liyanage et al., 2015; Thurlow et al., 2021). Ainda, projeções da *International Society of Nephrology* indicam que em 2030 mais de 14,5 milhões de pessoas poderão necessitar de TRS, mas apenas 5,4 milhões conseguirão recebê-la por razões econômicas, sociais e políticas (ISN, 2019). No Brasil, o censo brasileiro de diálise estimou que em 2023, 157.357 pacientes estavam em tratamento dialítico, destes, 51.153 iniciaram o tratamento naquele ano, com uma taxa bruta de mortalidade anual de 16,2% (Nerbass et al., 2025). Essas estimativas demonstram um aumento contínuo da prevalência de pacientes em diálise crônica, o que impacta a qualidade de vida dos pacientes e gastos no sistema público de saúde. No Brasil, os custos com as terapias renais substitutivas são estimados em R\$ 2,2 bilhões de reais, sendo R\$ 2 bilhões com tratamentos dialíticos e R\$ 200 milhões com transplantes renais, majoritariamente custeados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Alcalde & Kirsztajn, 2018).

A DRC se desenvolve a partir de dois componentes principais: um gatilho inicial e um mecanismo de perpetuação (Charles & Ferris, 2020; Perlman & Heung, 2019). O dano inicial pode decorrer de condições predisponentes, como anormalidades do desenvolvimento renal ou danos cumulativos ao longo da vida, sendo diabetes

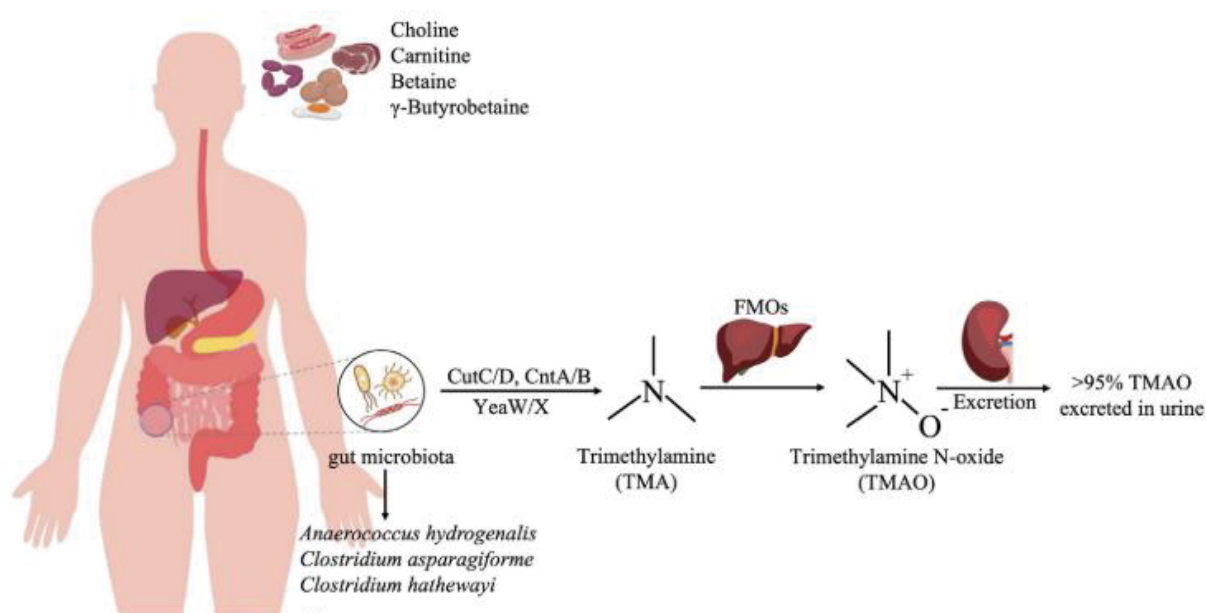
mellitus e hipertensão arterial sistêmica os principais fatores de risco. Além disso, causas inflamatórias, imunomediadas ou tóxico-metabólicas também podem desencadear a lesão renal. Uma vez iniciada, a doença progride por mecanismos de hiperfiltração e hipertrofia dos néfrons remanescentes, que passam a compensar a perda funcional. Esse processo envolve aumento da atividade do sistema renina–angiotensina–aldosterona, liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, resultando em elevação da pressão intraglomerular. Consequentemente, ocorrem alterações estruturais nos glomérulos e podócitos, culminando em dano ao sistema de filtração, esclerose dos néfrons e perda progressiva da função renal (Charles & Ferris, 2020).

Com a perda progressiva da função renal, ocorre o comprometimento da depuração glomerular e tubular, favorecendo o acúmulo de solutos que normalmente seriam excretados pelos rins, as chamadas toxinas urêmicas (TUs), levando a um estado clínico chamado de uremia (Cozzolino; Magagnoli; Ciceri, 2025; Vanholder et al. 2024). Esse acúmulo de TUs não representa apenas uma consequência do declínio da função renal, já que essas moléculas também atuam ativamente na patogênese da doença (Lim et al., 2021). Diversas TUs desencadeiam respostas celulares pró-inflamatórias, pró-oxidativas e pró-fibrogênicas, contribuindo para o dano tubular, ativação imunológica e fibrose renal (Chermiti et al., 2024; Frağ et al., 2024; Lim et al., 2021; Rosner et al., 2021). Principalmente, as TUs exercem efeito direto sobre o endotélio, promovendo sua disfunção (R. S. Da Cunha et al., 2020). Estudos clínicos demonstram comprometimento funcional e alterações estruturais na monocamada endotelial de artérias de pacientes com DRC (Alexandrou et al., 2020; Maciel et al., 2018; Seliger et al., 2016). Estudos *in vitro* mostram que toxinas como PCS, IS e soro urêmico de pacientes com DRC induzem a ruptura das junções intercelulares, resultando em aumento da permeabilidade da barreira endotelial (Assefa et al., 2019; Azevedo et al., 2024; Chen et al., 2020; Cuenca et al., 2019; Da Cunha et al., 2025; Maciel et al., 2018). Além disso, essas toxinas promovem a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como MCP-1, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais (Favretto et al., 2017; Stinghen et al., 2009). A indução dessas moléculas favorece o recrutamento e adesão de leucócitos ao endotélio ativado, contribuindo para a patogênese da aterosclerose (Tao et al., 2016; Toyohara et al., 2010). Dessa forma, a disfunção endotelial provocada pelo acúmulo de toxinas urêmicas representa um importante mecanismo na progressão de DCV em pacientes com DRC.

2.2 N-ÓXIDO DE TRIMETILAMINA (TMAO)

O TMAO é um produto da metabolização da colina, L-carnitina e betaína provenientes da dieta. A colina e L-carnitina que não são absorvidas no intestino delgado são metabolizadas em trimetilamina (TMA) no cólon pela microbiota intestinal e então oxidada em TMAO no fígado pela enzima *Flavin-containing monooxygenase 3* (FMO3) (Bennett et al., 2013). A maior parte da excreção do TMAO ocorre na urina, com apenas 4% ocorrendo nas fezes e menos de 1% no hálito (Zixin et al., 2022).

Figura 1. Metabolização do TMAO



Fonte: Zixin et al. (2022)

Na DRC, os altos níveis de TMAO estão relacionados com sua ocorrência e prognóstico, assim como pode ser um potencial fator de risco para o seu desenvolvimento (Cho et al., 2017). Tang et al., (2015) demonstraram que os níveis de TMAO em pacientes com DRC são maiores do que nos indivíduos saudáveis (Tang et al., 2015). Em pacientes com DRC em estágio final antes do início da hemodiálise, os níveis de TMA e TMAO também são mais elevados quando comparados a pacientes controle (Bain et al., 2006). Ainda, altos níveis plasmáticos de TMAO nos estágios iniciais da DRC indicam uma menor taxa de filtração glomerular estimada (Tang et al., 2015; Xu et al., 2017). Pelletier et al. (2019) encontraram uma forte correlação negativa entre os níveis plasmáticos de TMAO e a TGF média em

pacientes com DRC que podem estar relacionados principalmente a um declínio da filtração glomerular do TMAO (Pelletier et al., 2019). Apesar de fazer parte do grupo de toxinas urêmicas facilmente eliminados pela diálise, altos níveis de TMAO são encontrados em pacientes dialíticos e estão relacionados com um maior risco de eventos cardiovasculares, mortalidade em longo tempo, além de estar associada a sobrevida a longo prazo menor em pacientes com DRC (Gruppen et al., 2017; R. B. Kim et al., 2016; Stubbs et al., 2016; Zhou et al., 2022). Em modelos animais, o aumento de TMAO agravou a disfunção e fibrose renal (Tang et al., 2015).

Embora os mecanismos exatos pelos quais o TMAO acelera o dano renal ainda não estejam totalmente esclarecidos, a inflamação é reconhecida como um importante mediador no desenvolvimento da DRC induzida por TMAO. Níveis elevados dessa toxina promovem fibrose intersticial e disfunção renal, além de induzir estresse oxidativo e inflamação nos rins (Sun et al., 2017). O TMAO também pode reduzir a produção de óxido nítrico (NO) por meio do estresse oxidativo vascular e da inflamação, contribuindo para complicações da DRC, como disfunção endotelial e doenças cardiovasculares subsequentes (Ke et al., 2018).

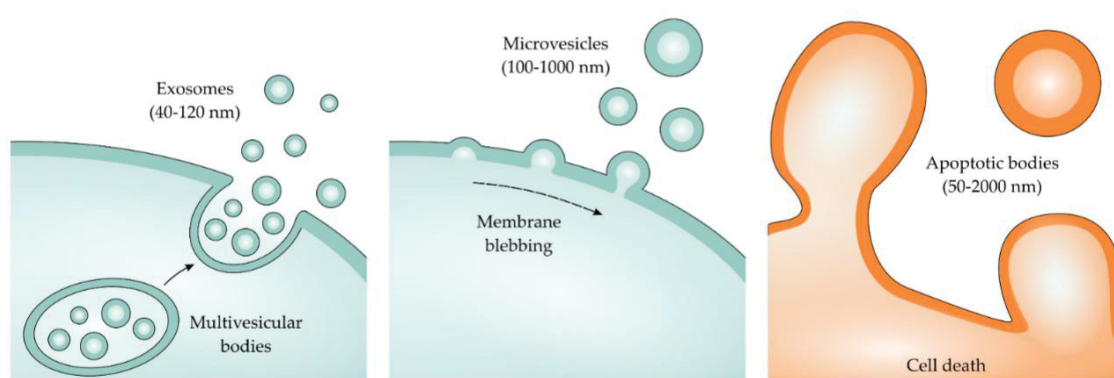
Uma das principais vias inflamatórias ativadas pelo TMAO envolve o inflamassoma NLRP3, cuja ativação resulta na liberação de IL-1 β e IL-18, intensificando a inflamação renal e vascular, promovendo fibrose miocárdica e agravando doenças cardiovasculares (M. L. Chen et al., 2017; Yang et al., 2019). Em modelos de DRC em ratos, a ativação do inflamassoma NLRP3 e da via de sinalização NF- κ B induzida pelo TMAO foi associada à calcificação vascular (Zhang et al., 2020). Evidências recentes indicam ainda que os efeitos deletérios do TMAO podem ser mediados, ao menos em parte, pela comunicação intercelular mediada por vesículas extracelulares (VEs).

2.3 VESÍCULAS EXTRACELULARES

O estudo das vesículas extracelulares (VEs) tem se expandido de forma expressiva na última década, em virtude de sua relevância nos processos de comunicação intercelular. De acordo com a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV - *International Society of Extracellular Vesicles*), VEs são classificadas por biogênese, modo de liberação e tamanho, sendo então divididas em três grupos: microvesículas (10–1000 nm), exossomos (40–120 nm) e corpos

apoptóticos (50–2000 nm) (Nederveen et al., 2021; Théry et al., 2018). Estudos com VEs abriram novos caminhos na descoberta por biomarcadores, já que alguns biomarcadores menos abundantes na circulação podem estar concentrados nas VEs, facilitando sua identificação e quantificação. Ainda, o perfil molecular das VEs reflete o estado funcional e metabólico da célula secretora, dessa forma se tornando potenciais biomarcadores precoces em distintas condições clínicas.

Figura 2. Classificação das vesículas extracelulares



Fonte: Azevedo et al. (2021)

Diversos estudos demonstraram que o perfil molecular das VEs urinárias e plasmáticas reflete alterações patofisiológicas renais, incluindo inflamação, estresse oxidativo e fibrose. Sonoda et al. (2009) e Abdeen et al. (2014) demonstraram que os níveis de Aquaporina 1 (AQP1) e 2 (AQP2) em exossomos urinários estavam relacionados com a expressão dessas proteínas nos rins (Abdeen et al., 2014; Sonoda et al., 2009). Lu et al. (2019) relacionaram os níveis de microvesículas derivadas de podócitos com a progressão da doença renal crônica. No estudo eles demonstraram que os níveis das microvesículas estavam associados ao dano podocitário e glomerulonecrose (Lu et al., 2019). Em estudo realizado com pacientes renais crônicos em diálise peritoneal, Corciulo et al. (2019) demonstraram que os níveis de AQP1 em exossomos isolados do dialisato peritoneal podem estar relacionados com a eficiência dialítica, podendo ser biomarcadores da integridade da barreira peritoneal e possíveis preditores da falha da ultrafiltração nesses pacientes (Corciulo et al., 2019). Sonoda et al. (2019) realizaram o perfil de miRNA de exossomos urinários e encontraram que os exossomos liberados em resposta a injúria por isquemia e reperfusão estavam relacionados com a sinalização por TGF- β (Sonoda et al., 2019).

Além da sua capacidade de agirem como biomarcadores, cresce o interesse na aplicação translacional das VEs, seja como alvo terapêutico, seja como plataforma para estratégias inovadoras de tratamento. Bruno et al. (2023) demonstraram que VEs derivadas de células-tronco hepáticas humanas (HLSC-EVs), administradas por via intravenosa em duas doses (imediatamente após a isquemia-reperfusão e no 3º dia), atenuaram necrose tubular, promoveram proliferação epitelial e reduziram a deposição de matriz extracelular, além de suprimir a expressão de genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos, prevenindo a progressão para DRC em modelo murino (Bruno et al., 2022). De forma complementar, Xie et al. (2025) desenvolveram VEs com tropismo endotelial, que, quando aplicadas em modelo de injúria renal aguda (IRA), reduziram a produção de IL-6, TNF- α e TGF- β , limitaram o recrutamento de neutrófilos e macrófagos M1, promoveram polarização de macrófagos M2 e expansão de células T regulatórias, além de estimular células progenitoras renais e reparo microvascular (L. Xie et al., 2025). Zhong et al. (2022) demonstraram em resposta a lesão, células tubulares liberam VEs contendo VEGF-A, que quando captadas por células endoteliais adjacentes, estimulam a proliferação e facilita o reparo vascular (Zhong et al., 2022). Kim et al. (2025) demonstraram que VEs derivadas de células-tronco mesenquimais induzidas exercem efeito protetor na progressão da IRA para DRC. Em modelo animal, a administração dessas VEs preservou a função renal, reduziu a fibrose intersticial e preveniu a rarefação capilar, sugerindo que esses efeitos estão associados à modulação de vias inflamatórias, antiapoptóticas e pró-angiogênicas (H. Kim et al., 2025).

Por outro lado, evidências também sugerem efeitos deletérios das VEs: Lv et al. (2020) demonstraram que altos níveis de miR-19b-3p foram encontrados em exossomos e estavam correlacionados com a severidade da inflamação tubulointersticial em pacientes com nefropatia diabética. Também, que esse miRNA foi capaz de mediar a comunicação entre células epiteliais tubulares e macrófagos, levando a ativação de macrófagos M1 e estimulando a inflamação (Lv et al., 2020). Em estudo realizado por Li et al. (2024), VEs isoladas do plasma de pacientes com DRC carregavam um conjunto de miRNAs capazes de induzir apoptose de cardiomiócitos e reduzir sua contratilidade in vivo e in vitro (Li et al., 2024). Favretto et al. (2021) demonstraram que toxinas urêmicas são capazes de induzir a formação de VEs em células endoteliais e essas VEs estão relacionadas com diminuição da adesão e aumento da migração celular, assim como um aumento na expressão de

VCAM-1 (Favretto et al., 2021). Alique et al. (2020) descreveram que o indoxil sulfato, uma toxina urêmica, foi capaz de induzir a liberação de VEs em células endoteliais e, quando células vasculares musculares lisas foram tratadas com essas VEs, houve um aumento em marcadores inflamatórios e de calcificação celular (Alique et al., 2020).

Evidências crescentes indicam que o TMAO modula a biogênese e a função de vesículas extracelulares (VEs) em diferentes tipos celulares. Estudos de Liu et al. (2021, 2022) mostraram que hepatócitos expostos ao TMAO liberam exossomos (TMAO-exos) capazes de induzir inflamação, apoptose, prejuízo da migração celular e disfunção da vasodilatação dependente do endotélio, além de ativar a via NF- κ B. Esses exossomos apresentam um perfil de miRNAs distinto dos controles, com alvos associados à inflamação e disfunção endotelial, sugerindo efeitos mediados por VEs além da ação direta do TMAO (Liu et al., 2021; Liu, Shao, et al., 2022; Liu, Tu, et al., 2022). Al Akhdar e colaboradores (2025) demonstraram que o TMAO induz transição endotelial-mesenquimal (EndMT), promovendo a liberação de VEs com capacidade de desencadear alterações fenotípicas e calcificação em células musculares lisas vasculares, destacando um elo direto entre TMAO, EndMT e remodelamento vascular patológico (Al Akhdar et al., 2025). Dados preliminares de nosso grupo mostram que o TMAO estimula a liberação de VEs endoteliais com alterações no padrão de tamanho e capacidade de internalização por células endoteliais, reforçando o papel potencial dessas VEs induzidas por TMAO nas complicações cardiovasculares associadas à DRC (Azevedo et al., 2024).

Em conjunto, esses achados sustentam a noção de que as VEs atuam como mediadores críticos da interface inflamação-reparo-fibrose no rim, nos vasos e da comunicação entre órgãos, demonstrando a importância de estudos envolvendo toxinas urêmicas e VEs na DRC.

CAPÍTULO 1

ARTIGO EXPERIMENTAL

Status atual: Artigo a ser submetido

Possíveis periódicos: Archives in Toxicology (FI: 6.9), FASEB Journal (FI: 4.2),
Toxins (FI: 4.0), Frontiers in Physiology (FI: 3.4).

Trimethylamine n-oxide (TMAO) impairs ve-cadherin–dependent endothelial junctions and promotes vascular permeability in chronic kidney disease

Authors: Carolina Amaral Bueno Azevedo¹, Regiane Stafim da Cunha¹, Guilherme Miniskyskoski¹, Andréa Emília Marques Stinghen^{1*}

¹Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

ABSTRACT: Endothelial dysfunction caused by the accumulation of uremic toxins is an important contributor to the development of cardiovascular disease (CVD) in patients with chronic kidney disease (CKD). This study evaluated the impact of trimethylamine N-oxide (TMAO), a low molecular weight uremic toxin, on endothelial cells junction's proteins. Cells were treated with TMAO at normal (2.83 mg/L) and uremic (7.49 mg/L) concentrations for 24h. Cell viability was assessed using the MTT assay. VE-Cadherin expression and its phosphorylation were analyzed by western blotting and confirmed by confocal immunofluorescence. Cell permeability was determined by the passage of a FITC-Dextran solution through transwell inserts. Cell adhesion to extracellular matrix proteins was evaluated using plates coated with fibronectin. Our results demonstrate that TMAO reduced cell viability and disrupt endothelial cell-to-cell junctions through a decrease in VE-cadherin protein levels and increase its phosphorylation on tyrosine 658, thus increasing cell permeability. TMAO also decreased endothelial binding to fibronectin, an important protein of the extracellular matrix. Interestingly TMAO did not affect the expression levels of VE-cadherin–associated proteins, such as p120-catenin and β -catenin. This gives a new perspective regarding the direct effects of this uremic toxin in intercellular junctions and opens new targets to improve cardiovascular outcomes in CKD patients.

KEY-WORDS: uremic toxins; cardiovascular disease; chronic kidney disease; TMAO.

3 CAPÍTULO 2

Vesículas extracelulares produzidas por células endoteliais no ambiente urêmico

Neste capítulo, apresentamos os achados obtidos até o momento acerca dos efeitos das toxinas urêmicas PCS, indoxil sulfato e TMAO sobre vesículas extracelulares e sua interação com o endotélio. Ao longo das investigações, avaliamos como essas toxinas modulam a formação das vesículas, alteram seu perfil de tamanho e influenciam sua capacidade de serem internalizadas por células endoteliais. Também caracterizamos marcadores clássicos de vesículas extracelulares e examinamos seus impactos na viabilidade celular, buscando compreender como essas partículas contribuem para a disfunção endotelial no contexto urêmico. Assim, este capítulo demonstra evidências experimentais que lançam luz sobre os mecanismos pelos quais toxinas urêmicas remodelam a sinalização vesicular e potencialmente amplificam o risco cardiovascular associado à doença renal crônica. Os resultados aqui obtidos serão incorporados em um segundo artigo a ser publicado posteriormente a finalização dos experimentos.

3.1 Metodologia

3.1.1 Cultivo Celular

Células endoteliais humanas EA.hy 926 (ATCC CRL 2922, Virgínia, EUA) foram cultivadas em frascos de cultivo contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco, Grand Island, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, EUA) e 1% da solução de penicilina (10000 IU/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco, Grand Island, EUA). Os frascos foram mantidos em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. As células foram tratadas

3.1.2 Indução da formação de VEs

As células foram lavadas duas vezes com PBS, e incubadas durante 24 horas em meio DMEM, sem SFB e com concentrações urêmicas das toxinas PCS, IS ou TMAO, respectivamente: 23 mg/L, 37,07 mg/L e 7,49 mg/L. Essas concentrações são descritas pelo *European Uremic Toxin Work Group* (EUTOX, <http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>). As células foram mantidas à 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. VEs controle foram isoladas utilizando apenas DMEM sem SFB.

3.1.3 Isolamento das VEs

Após o período de incubação das células endoteliais com as toxinas, a obtenção das VEs foi realizada por centrifugação diferencial. Primeiramente, o sobrenadante das células foi centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos para remoção dos debris celulares. Após, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 x g por 90 minutos ultracentrífuga Beckman Coulter Optima MAX-XP com rotor MLA-50 e tubos de polipropileno OptiSeal (Beckman Coulter). Em seguida, o sobrenadante será descartado e o pellet foi lavado com PBS e ultracentrifugado novamente a 100.000 x g por 90 minutos. O pellet contendo as VEs foi ressuspensionado em 200uL PBS e armazenado à temperatura de -80 °C.

3.1.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

As VEs foram rastreadas utilizando o equipamento NanoSight LM14C (tecnologia NTA – Nanoparticle Tracking Analysis) com câmera sCMOS acoplada. As VEs foram diluídas na proporção 1:10 e cinco vídeos de 60 segundos foram gravados e analisados pelo NanoSight Analytical Software - NTA 3.4, Build 3.4.4 (Malvern instruments Ltd., Malvern, UK). A análise de rastreamento das vesículas utiliza a propriedade da dispersão da luz e do movimento Browniano para determinar a distribuição do tamanho das vesículas bem como a sua concentração (vesículas/mL)

3.1.5 Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Aproximadamente 50 µL de VEs foram colocadas em uma grid revestida com Formvar e 300 mesh (Electron Microscopy Science, Washington, DC, EUA) por 1 h em temperatura ambiente para a adsorção. As grids foram lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído a 2,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (Electron Microscopy Science, Washington, DC, EUA) durante 10 min a temperatura ambiente. Na sequência, as grids foram lavadas três vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 M e coradas com acetato de uranila a 5% (Electron Microscopy Science, Washington, DC, EUA) durante 2 minutos. Após isso, as grids foram lavadas uma vez com água destilada e deixadas a secar em temperatura ambiente. Por fim, as grids foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400 Plus (JEOL Ltd., Tóquio, Japão), a uma voltagem de aceleração de 100 kV, no laboratório de microscopia do Instituto Carlos Chagas FIOCRUZ-PR.

3.1.6 Western blotting

As amostras de VEs foram avaliadas em relação a presença de marcadores típicos para VEs, incluindo a detecção de CD63, CD9, ALIX, TSG101 e HSP70. Para isso, aproximadamente 10 µg de VEs foram misturadas em tampão de amostra (SDS 4%, 2-mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,004%, Tris HCl 0,125 M, pH 6,8) e aquecidas a 95 °C durante 10 min. Na sequência, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS a 9% para eletroforese, seguida de transferência para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). As membranas foram incubadas durante 1 hora com o bloqueio, uma solução salina tamponada com tris (TBS) contendo 0,05% de tween-20 e 3% de caseína. Em seguida, as membranas foram incubadas a 4° C por 18 horas com os seguintes anticorpos primários: anti-GM130/GOLGA2 (#66662-1-Ig, 1:2000), anti-CD63 (#25682-1 AP, 1:1000), anti-ALIX (#12422-1-AP, 1:2000), anti-TSG101 (#67381-1-Ig, 1:2000), anti-HSP70 (#10995-1-AP, 1:2000) e anti-CD9 (#10626D, 1:2000). Após isso, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com HRP anti-IgG mouse (0,01 mg/mL) ou anti-IgG rabbit (0,8 mg/mL) durante 1 hora à temperatura ambiente (19-23 °C). As lavagens entre os passos foram realizadas com TBS contendo 0,05% de tween-20. Por fim, a revelação da imunomarcação foi realizada por quimioluminescência no fotodocumentador Amersham Imager 600 GE (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

3.1.7 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio de ensaio colorimétrico utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) (Sigma, St. Louis, EUA) (MOSMANN, 1983). Para isso, as células endoteliais foram plaqueadas em placa de cultivo de 96 poços a uma densidade de 7×10^3 células por poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com as VEs por 24 horas. Na sequência, o meio foi trocado por meio novo (90 µL/poço) e 10 µL/poço da solução do reagente de MTT (5 mg/mL). Depois de 4 horas, a placa foi submetida à leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm no leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Bio-Rad, Califórnia, EUA).

3.1.8 Internalização das VEs por células endoteliais

Para análise da internalização das VEs por células endoteliais foi realizada a marcação de VEs com calceína-AM, um composto permeável a membrana lipídica e, após hidrólise pela esterase intracelular, torna-se um composto aniônico fluorescente não permeável, ficando retida dentro das VEs. As VEs foram incubadas com 10 μ M de calceína-AM a 37 °C por 30 min. Após a incubação, o excesso de calceína-AM foi removido com uma centrifugação com filtro Amicon de 30 kDa.

As células endoteliais foram cultivadas em lamínulas redondas (7×10^4 células/lamínulas) em uma placa de cultivo de 24 poços. As VEs marcadas foram então incubadas com as células endoteliais por 24 horas, utilizando meio DMEM sem SFB. Na sequência, as células foram fixadas com PFA 2% por 20 min e o citoesqueleto de actina foi marcado com ActinRed 555 por 20 min. Após três lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas nas lâminas com Fluoromount G Mounting Medium com DAPI (Invitrogen). As lamínulas foram analisadas sob um microscópio de fluorescência confocal Nikon A1RSiMP+ (Nikon Instruments, Tóquio, Japão) do Centro de Tecnologias Avançadas de Fluorescência da UFPR.

3.1.9 Análise estatística

Para análise estatística, foi realizada com o teste de normalidade, seguido dos testes t de Student ou ANOVA para os dados paramétricos e dos testes de Mann-Whitney ou ANOVA on Rank's para os dados não paramétricos. As diferenças entre os grupos serão consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os dados paramétricos serão expressos com as médias e \pm erro padrão da média (EPM) enquanto os dados não paramétricos serão expressos em mediana. Os dados foram analisados com auxílio do pacote estatístico GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, EUA).

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Caracterização das VES

As VEs foram caracterizadas em relação ao tamanho, morfologia e expressão de seus marcadores típicos, como recomendado pelo ISEV no Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles (MISEV2023) (Welsh et al., 2024). VEs derivadas das células endoteliais expostas a toxinas urêmicas, principalmente o IS, apresentaram

um tamanho menor se comparado com as VEs-controle (sem exposição às toxinas) (Tabela 2; Figura 2).

Tabela 2. Caracterização de tamanho e concentração das VEs

Amostra	Média (nm)	D50/mediana (nm)	Concentração (partículas/mL)
VEs-Controle	121,4 (±3,3)	114,6 (±2,5)	2,19 x 10 ¹⁰
VEs-PCS	109,5 (±0,5)	105,4 (±0,7)	2,74 x 10 ¹⁰
VEs-IS	101,0 (±0,8)	98,3 (±0,8)	1,86 x 10 ¹⁰
VEs-TMAO	109,9 (±0,9)	106,4 (±0,8)	1,76 x 10 ¹⁰

Nota: dados expressos em média ± erro padrão.

As imagens de MET (figura 2) também confirmam o tamanho das VEs e mostram VEs com morfologia típica, apresentando formato esférico, arredondado ou cupuliforme. Esses dados indicam o isolamento de pequenas VEs (com diâmetro menor que 200 nm), conforme a classificação proposta pela MISEV2023 (Welsh et al., 2024).

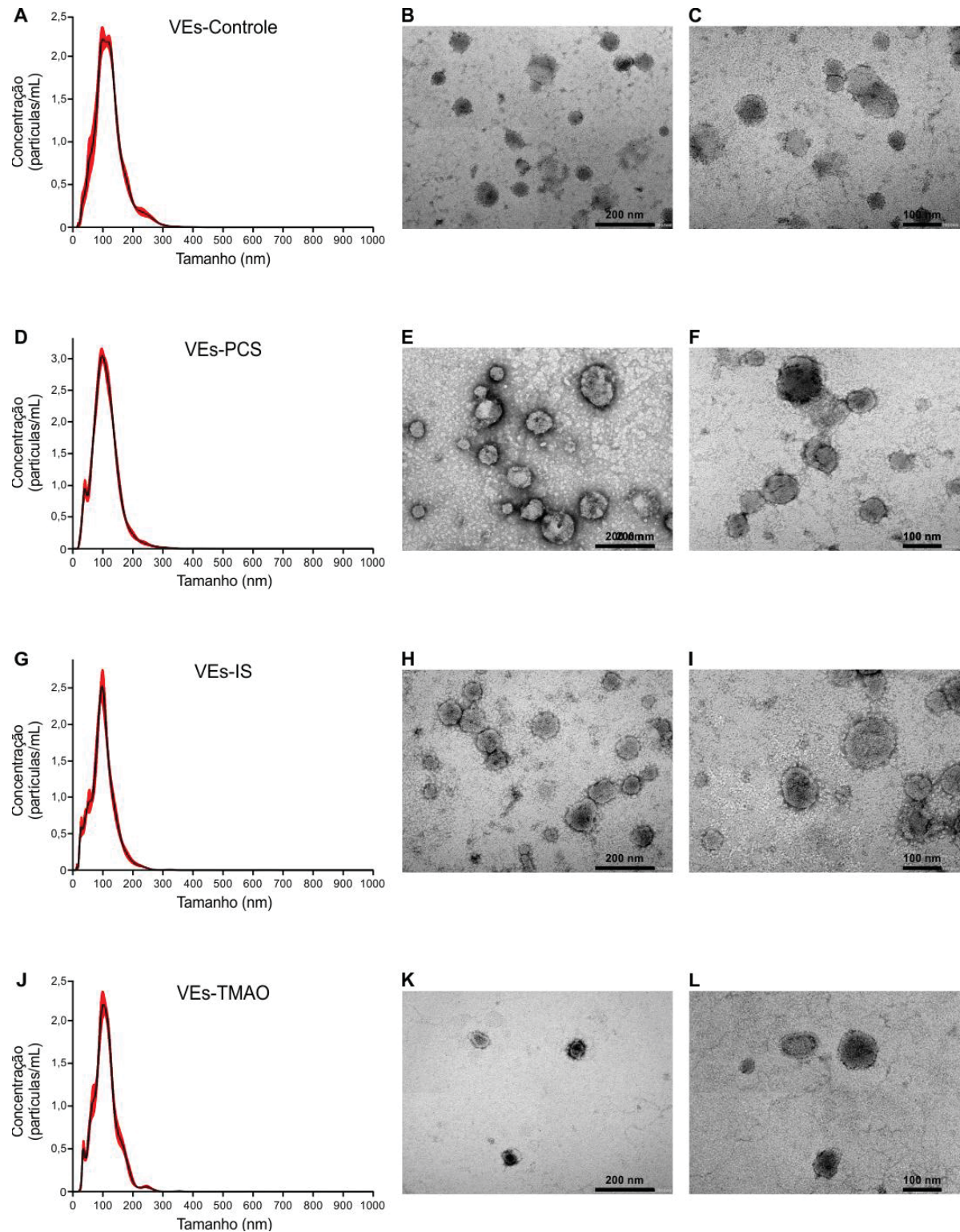


Figura 3. Distribuição do tamanho e morfologia das VEs derivadas de células endoteliais na ausência de toxinas urêmicas (controle; A, B, C) e expostas a concentrações urêmicas do IS (D, E, F), do PCS (G, H, I) e do TMAO (J, K, L). O diâmetro das VEs foi obtido pela análise de NTA (A, D, G, J). A morfologia das VEs foi avaliada pelas imagens do MET, com magnificação de 60.000x (B, E, H, K; escala 200 nm) e de 80.000x (C, F, I, L; escala 100 nm).

Para avaliação de marcadores típicos de VEs foi realizado ensaio de western Blotting. Foi possível identificar as proteínas CD63, CD9, ALIX, TSG101 e HSP70. Para confirmar o isolamento e demonstrar ausência de células nas amostras, o marcador GOLGA2/GM130 (um marcador do complexo de Golgi) foi utilizado. Esse marcador foi observado apenas no lisado celular como esperado (figura 3).

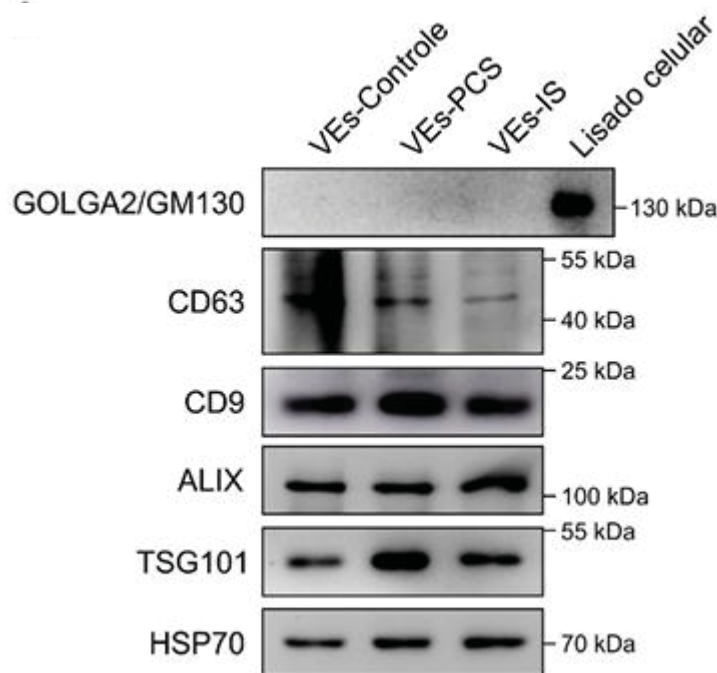


Figura 4. Detecção dos marcadores clássicos de VEs.

3.2.2 Efeitos das VEs na viabilidade celular

Para análise do efeito das VEs sob a viabilidade celular, o ensaio de MTT foi realizado. Todas as concentrações de VEs testadas reduziram de forma significativa a viabilidade de células endoteliais (figura 4, $P < 0,05$). As VEs-controle (produzidas na ausência de toxinas urêmicas) reduziram a viabilidade de forma significativa na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com a 10 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$) e 5 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,001$). De forma similar, a viabilidade das células expostas as VEs-IS diminuiu de forma significativa na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ em comparação com a 5 $\mu\text{g/mL}$ ($P < 0,05$).

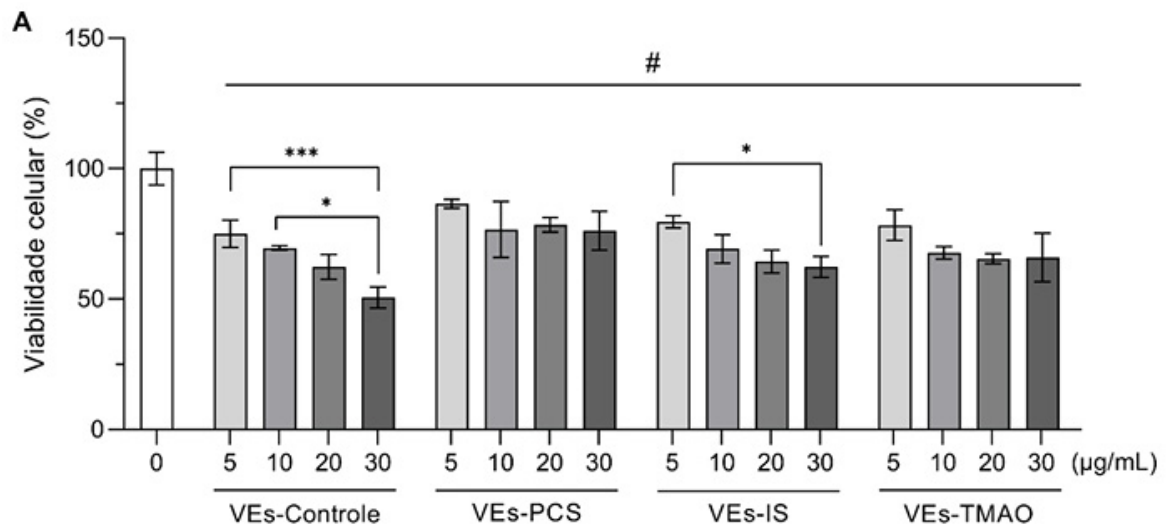


Figura 5. Viabilidade de células endoteliais expostas as VEs endoteliais induzidas por toxinas urêmicas. ANOVA seguido de pos hoc de Tukey. # $P < 0,05$: células não expostas as VEs vs todos os tratamentos; * $P < 0,05$: VEs-Control 10 vs 30; VEs-IS 5 vs 30; *** $P < 0,001$: VEs-Control 5 vs 30.

3.2.3 Internalização das VEs por células endoteliais

A internalização das VEs foi analisada após a marcação das VEs com calceína-AM. Após 24 de incubação, observamos a presença de marcação verde (calceína-AM) na região perinuclear das células recipientes, evidenciando a internalização e acúmulo das VEs nessa região (imagem 5).

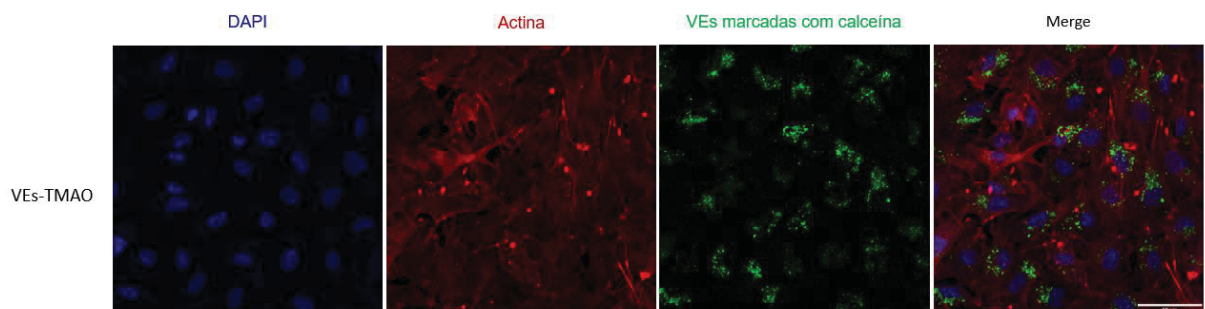


Figura 6. Internalização das VEs por células endoteliais. Detecção das VEs (calceína-AM, verde), da actina polimerizada (ActinRed 555, vermelho) e do núcleo (DAPI, azul). Magnificação de 600x e barra de escala de 50 µm.

3.3 DISCUSSÃO

A lesão renal contribui para disfunção endotelial, processo associado à inflamação, trombose, vasoconstrição e aterosclerose. Na DRC, o acúmulo de toxinas urêmicas no plasma promove alterações celulares que favorecem o desenvolvimento de DCV. Nesse contexto, as vesículas extracelulares (VEs) geradas no ambiente urêmico desempenham papel relevante na comunicação intercelular ao transportar biomoléculas da célula de origem (Garcia et al., 2024). No presente estudo investigamos a formação e os efeitos de VEs endoteliais após exposição a três toxinas urêmicas clássicas: PCS, IS e TMAO.

Observamos que o IS induziu a formação de VEs de menor tamanho em comparação ao grupo controle. Em todas as condições, as VEs expressaram marcadores típicos, como CD63, CD9, ALIX, TSG101 e HSP70. Para avaliar o impacto funcional, realizamos ensaio de viabilidade celular com diferentes concentrações de VEs (5–30 µg/mL). Apenas VEs-controle e VEs-IS reduziram a viabilidade de maneira dose-dependente. As VEs-TMAO foram eficientemente internalizadas por células endoteliais, acumulando-se no citoplasma e em regiões perinucleares. Esses achados se alinham aos reportados por Favretto et al. (2021), que observaram diminuição de viabilidade e aumento da expressão de VCAM-1 em células endoteliais expostas a VEs geradas na presença de toxinas urêmicas (Favretto et al., 2021). Além disso, Figuer et al. (2024) demonstraram, via proteômica, que VEs induzidas por IS apresentam menor conteúdo de proteínas de matriz extracelular e relacionadas à miogênese, sugerindo contribuição adicional para a disfunção endotelial (Figuer et al., 2024).

Nas próximas etapas, buscaremos aprofundar os mecanismos pelos quais as toxinas urêmicas modulam a comunicação intercelular via vesículas extracelulares. Para isso, será realizada análise proteômica das VEs, a fim de avaliar se as toxinas são capazes de alterar o conteúdo proteico. Também, avaliaremos a internalização das VEs induzidas por PCS e IS em células endoteliais, a fim de determinar se esses estímulos reproduzem o padrão observado com TMAO. Em seguida, realizaremos a caracterização do perfil de miRNAs presentes nas VEs geradas por PCS, IS e TMAO, permitindo identificar potenciais reguladores moleculares associados à disfunção endotelial. Por fim, examinaremos o impacto funcional dessas VEs na expressão de marcadores inflamatórios em células endoteliais, visando elucidar como diferentes

toxinas urêmicas contribuem para a ativação vascular e o risco cardiovascular na DRC através das VEs.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

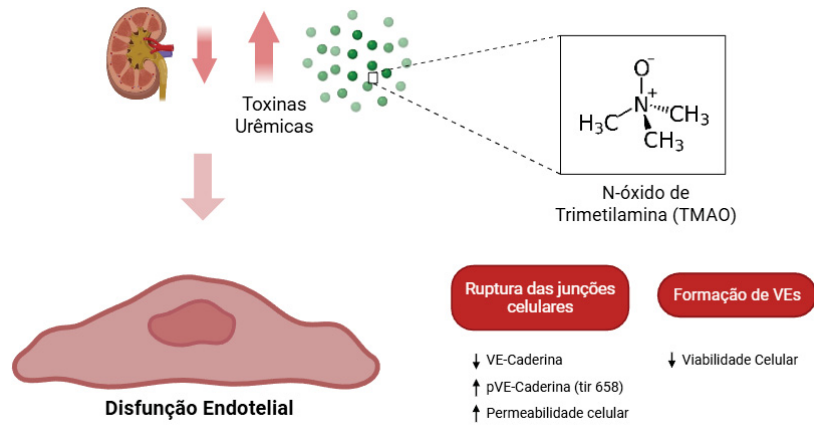
A disfunção endotelial constitui um componente central da fisiopatologia da DRC e está diretamente associada ao aumento do risco cardiovascular observado nessa população. O acúmulo sistêmico de toxinas urêmicas compromete a homeostase vascular ao modular processos-chave como permeabilidade endotelial, integridade da matriz extracelular, adesão celular e resposta inflamatória. Nesse contexto, a caracterização dos efeitos de toxinas urêmicas específicas sobre a biologia endotelial e sobre a biogênese e função de VEs torna-se essencial para avançar na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nas complicações vasculares associadas à DRC.

O presente trabalho demonstrou que as concentrações urêmicas de TMAO impacta significativamente a função endotelial, reduzindo a viabilidade celular, promovendo remodelamento do citoesqueleto e prejudicando as junções intercelulares. Foi possível observar que: (i) TMAO reduziu de forma significativa a viabilidade de células endoteliais; (ii) TMAO diminui a expressão de VE-Caderina total e aumentou sua fosforilação no resíduo de tirosina 658; (iii) TMAO aumentou a permeabilidade celular; (iv) TMAO diminui a adesão celular a fibronectina.

No segundo eixo do estudo, avaliamos a formação e os efeitos de VEs endoteliais produzidas na presença das toxinas clássicas p-cresil sulfato (PCS) e indoxil sulfato (IS), além do TMAO. Nessa etapa, nossos resultados demonstram que: (i) PCS, IS e TMAO foram capazes de induzir a formação de VEs com expressão de marcadores proteicos (CD63, CD9, ALIX, TSG101 e HSP70) e de morfologia característicos; (ii) IS induziu a formação de VEs de menor tamanho em comparação às VEs-controle; (iii) VEs induzidas pelas toxinas foram capazes de diminuir a viabilidade de células endoteliais, contudo apenas VEs-controle e VEs-IS promoveram redução dose-dependente da viabilidade endotelial; (iv) VEs induzidas por TMAO foram eficientemente internalizadas por células endoteliais, acumulando-se no citoplasma e regiões perinucleares.

Em conjunto, nossos resultados avançam a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares que conectam toxinas urêmicas à disfunção endotelial e apontam para a modulação das vias relacionadas às VEs como potencial estratégia terapêutica futura. Na figura 7 temos um resumo esquemático do trabalho.

Figura 7. Resumo esquemático do trabalho



Fonte: O autor (2025) criado com <https://BioRender.com>

REFERÊNCIAS

- Abdeen, A., Sonoda, H., El-Shawarby, R., Takahashi, S., & Ikeda, M. (2014). Urinary excretion pattern of exosomal aquaporin-2 in rats that received gentamicin. *https://doi.org/10.1152/AJPrenal.00140.2014*, 307(11), F1227–F1237. <https://doi.org/10.1152/AJPrenal.00140.2014>
- Al Akhdar, J., Yangin, M. N., & Baysal, K. (2025). Impact of TMAO-triggered EndMT and its derived extracellular vesicles on vascular smooth muscle cell phenotypic changes and calcification. *Atherosclerosis*, 407, 119647. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2025.119647>
- Alcalde, P. R., & Kirsztajn, G. M. (2018). Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. *Jornal Brasileiro de Nefrologia : 'orgao Oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*, 40(2), 122–129. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-3918>
- Alexandrou, M. E., Gkaliagkousi, E., Loutradis, C., Dimitriadis, C., Mitsopoulos, E., Lazaridis, A., Nikolaidou, B., Dolgiras, P., Douma, S., Papagianni, A., & Sarafidis, P. A. (2020). Haemodialysis and peritoneal dialysis patients have severely impaired post-occlusive skin forearm vasodilatory response assessed with laser speckle contrast imaging. *Clinical Kidney Journal*, 14(5), 1419–1427. <https://doi.org/10.1093/CKJ/SFAA136>
- Alique, M., Bodega, G., Corchete, E., García-Menéndez, E., de Sequera, P., Luque, R., Rodríguez-Padrón, D., Marqués, M., Portolés, J., Carracedo, J., & Ramírez, R. (2020). Microvesicles from indoxyl sulfate-treated endothelial cells induce vascular calcification in vitro. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 953–966. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.04.006>
- Assefa, E. G., Yan, Q., Gezahegn, S. B., Salissou, M. T. M., He, S., Wu, N., Zuo, X., & Ying, C. (2019). Role of Resveratrol on Indoxyl Sulfate-Induced Endothelial Hyperpermeability via Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR)/Src-Dependent Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5847040>
- Azevedo, C. A. B., Cunha, R. S. da, Miniskosky, G., Gregório, P. C., & Stinghen, A. M. (2024). Trimethylamine N-oxide Can Trigger Cardiovascular Disease by Affecting Endothelial Cell-to-Cell Junctions through ZO-1 Expression Decreasing. *Journal of the American Society of Nephrology*, 35(10S). <https://doi.org/10.1681/ASN.2024M99RPNRG>
- Azevedo, C. A. B., da Cunha, R. S., Junho, C. V. C., da Silva, J. V., Moreno-Amaral, A. N., de Moraes, T. P., Carneiro-Ramos, M. S., & Stinghen, A. E. M. (2021). Extracellular vesicles and their relationship with the heart–kidney axis,

uremia and peritoneal dialysis. *Toxins*, 13(11).

<https://doi.org/10.3390/toxins13110778>

Azevedo, C. A. B., da Cunha, R. S., Miniskosky De Almeida, G., Melo De Souza, I. L., & Stinghen, A. E. M. (2024). #1841 Trimethylamine N-oxide (TMAO) induces the formation of endothelial extracellular vesicles. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 39(Supplement_1). <https://doi.org/10.1093/NDT/GFAE069.499>

Bain, M. A., Faull, R., Fornasini, G., Milne, R. W., & Evans, A. M. (2006). Accumulation of trimethylamine and trimethylamine- N -oxide in end-stage renal disease patients undergoing haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(5), 1300–1304. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfk056>

Bennett, B. J., Vallim, T. Q. de A., Wang, Z., Shih, D. M., Meng, Y., Gregory, J., Allayee, H., Lee, R., Graham, M., Crooke, R., Edwards, P. A., Hazen, S. L., & Lusis, A. J. (2013). Trimethylamine-N-Oxide, a Metabolite Associated with Atherosclerosis, Exhibits Complex Genetic and Dietary Regulation. *Cell Metabolism*, 17(1), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.011>

Bikbov, B., Purcell, C. A., Levey, A. S., Smith, M., Abdoli, A., Abebe, M., Adebayo, O. M., Afarideh, M., Agarwal, S. K., Agudelo-Botero, M., Ahmadian, E., Al-Aly, Z., Alipour, V., Almasi-Hashiani, A., Al-Raddadi, R. M., Alvis-Guzman, N., Amini, S., Andrei, T., Andrei, C. L., ... Murray, C. J. L. (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 395(10225), 709–733. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)

Borges, F. T., Reis, L. A., & Schor, N. (2013). Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46(10), 824–830. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20132964>

Bro, S., Moeller, F., Andersen, C. B., Olgaard, K., & Nielsen, L. B. (2004). Increased Expression of Adhesion Molecules in Uremic Atherosclerosis in Apolipoprotein-E–Deficient Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(6), 1495 LP – 1503. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000128371.33195.7B>

Bruno, S., Chiabotto, G., Cedrino, M., Ceccotti, E., Pasquino, C., De Rosa, S., Grange, C., Tritta, S., & Camussi, G. (2022). Extracellular Vesicles Derived from Human Liver Stem Cells Attenuate Chronic Kidney Disease Development in an In Vivo Experimental Model of Renal Ischemia and Reperfusion Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS23031485>

Charles, C., & Ferris, A. H. (2020). Chronic Kidney Disease. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 47(4), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2020.08.001>

Chen, M. L., Zhu, X. H., Ran, L., Lang, H. D., Yi, L., & Mi, M. T. (2017). Trimethylamine-N-oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3

inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway. *Journal of the American Heart Association*, 6(9). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.006347>

Chen, S. C., Huang, S. Y., Wu, C. C., & Hsu, C. F. (2020). P-Cresylsulfate, the Protein-Bound Uremic Toxin, Increased Endothelial Permeability Partly Mediated by Src-Induced Phosphorylation of VE-Cadherin. *Toxins*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12020062>

Chermiti, R., Burtsey, S., & Dou, L. (2024). Role of Uremic Toxins in Vascular Inflammation Associated with Chronic Kidney Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/JCM13237149>

Cho, C. E., & Caudill, M. A. (2017). Trimethylamine-N-Oxide: Friend, Foe, or Simply Caught in the Cross-Fire? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.10.005>

Corciulo, S., Nicoletti, M. C., Mastrofrancesco, L., Milano, S., Mastrodonato, M., Carmosino, M., Gerbino, A., Corciulo, R., Russo, R., Svelto, M., Gesualdo, L., & Procino, G. (2019). AQP1-Containing Exosomes in Peritoneal Dialysis Effluent As Biomarker of Dialysis Efficiency. *Cells*, 8(4), 330. <https://doi.org/10.3390/cells8040330>

Cozzolino, Mario; Magagnoli, Lorenza; Ciceri, Paola. From Physicochemical Classification to Multidimensional Insights: A Comprehensive Review of Uremic Toxin Research. *Toxins*, v. 17, n. 6, p. 295, 2025. <https://doi.org/10.3390/toxins17060295>

Cuenca, M. V., Van Bezu, J., Beelen, R. H. J., Vervloet, M. G., & Hordijk, P. L. (2019). Stabilization of cell-cell junctions by active vitamin D ameliorates uraemia-induced loss of human endothelial barrier function. *Nephrology, Dialysis, Transplantation : Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 34(2), 252–264. <https://doi.org/10.1093/NDT/GFY111>

Da Cunha, R., Azevedo, C. A. B., Miniskiskosky, G., Del Amo, M. V. G., Gregorio, P. C., Lemos De Souza, R. K., Barreto, F., & Stinghen, A. E. M. (2025). #3204 Uremic toxicity impairs the endothelial barrier through phosphorylation of tyrosine 658 on VE-cadherin. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 40(Supplement_3), 518–524. <https://doi.org/10.1093/NDT/GFAF116.1402>

Da Cunha, R. S., Santos, A. F., Barreto, F. C., & Stinghen, A. E. M. (2020). How do Uremic Toxins Affect the Endothelium? *Toxins* 2020, Vol. 12, Page 412, 12(6), 412. <https://doi.org/10.3390/TOXINS12060412>
Duncan, B. B., Thomé, F. S., & Vos, T. (2024). The Global Burden of Disease Study—a kidney disease resource. *Nephrology Dialysis Transplantation*, gfae136. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfae136>

Falconi, C. A., Junho, C. V. da C., Fogaça-Ruiz, F., Vernier, I. C. S., da Cunha, R. S., Stinghen, A. E. M., & Carneiro-Ramos, M. S. (2021). Uremic Toxins: An

Alarming Danger Concerning the Cardiovascular System. *Frontiers in Physiology*, 12(May), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.686249>

Favretto, G., da Cunha, R. S., Flores Santos, A., Leitolis, A., Schiefer, E. M., Gregório, P. C., Franco, C. R. C., Massy, Z., Dalboni, M. A., & Stinghen, A. E. M. (2021). Uremic endothelial-derived extracellular vesicles: Mechanisms of formation and their role in cell adhesion, cell migration, inflammation, and oxidative stress. *Toxicology Letters*, 347, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.04.019>

Favretto, G., Souza, L. M., Gregório, P. C., Cunha, R. S., Maciel, R. A. P., Sasaki, G. L., Toledo, M. G., Pecoits-Filho, R., Souza, W. M., & Stinghen, A. E. M. (2017). Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-Bound Uremic Toxins by Human Endothelial Cells and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression. *Journal of Vascular Research*, 54(3), 170–179. <https://doi.org/10.1159/000468542>

Frańk, W., Dąbek, B., Balcerczyk-Lis, M., Motor, J., Radzioch, E., Młynarska, E., Rysz, J., & Franczyk, B. (2024). Role of Uremic Toxins, Oxidative Stress, and Renal Fibrosis in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants* 2024, Vol. 13, Page 687, 13(6), 687. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13060687>

Fujii, H., Goto, S., & Fukagawa, M. (2018). Role of uremic toxins for kidney, cardiovascular, and bone dysfunction. *Toxins*, 10(5), 18. <https://doi.org/10.3390/toxins10050202>

Gruppen, E. G., Garcia, E., Connelly, M. A., Jeyarajah, E. J., Otvos, J. D., Bakker, S. J. L., & Dullaart, R. P. F. (2017). TMAO is Associated with Mortality: Impact of Modestly Impaired Renal Function. *Scientific Reports*, 7(1), 13781. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13739-9>

Hauser, A. B., Stinghen, A. E. M., Kato, S., Bucharles, S., Aita, C., Yuzawa, Y., & Pecoits-Filho, R. (2008). Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Peritoneal Dialysis International*, 28(SUPP. 3).

Inker, L. A., Astor, B. C., Fox, C. H., Isakova, T., Lash, J. P., Peralta, C. A., Kurella Tamura, M., & Feldman, H. I. (2014). KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, 63(5), 713–735. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.01.416>

ISN. (2019). *ISN Global Kidney Health Atlas*. https://www.theisn.org/wp-content/uploads/2021/05/GKHAAtlas_2019_WebFile-1.pdf

Jankowski, J., Floege, J., Fliser, D., Böhm, M., & Marx, N. (2021). Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Circulation*, 143(11), 1157–1172. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050686>

Ke, Y., Li, D., Zhao, M., Liu, C., Liu, J., Zeng, A., Shi, X., Cheng, S., Pan, B., Zheng, L., & Hong, H. (2018). Gut flora-dependent metabolite Trimethylamine-N-

oxide accelerates endothelial cell senescence and vascular aging through oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 116, 88–100.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.007>

Kim, H., Hong, S., Kim, S., & Kim, T. M. (2025). Extracellular Vesicles from Induced Mesenchymal Stem Cells Inhibit Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease Transition. *International Journal of Stem Cells*, 18(3), 286–300.

<https://doi.org/10.15283/IJSC24127>

Kim, R. B., Morse, B. L., Djurdjev, O., Tang, M., Muirhead, N., Barrett, B., Holmes, D. T., Madore, F., Clase, C. M., Rigatto, C., Levin, A., Agharazii, M., Blouin, J., Samson, F., Akbarii, A., Cheesman, J., Courtney, J., Hamer, S., Delic, E., ... Mahoney, K. (2016). Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney International*, 89(5), 1144–1152.

<https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.01.014>

Kovesdy, C. P. (2022). Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney International Supplements*, 12(1), 7–11.

<https://doi.org/10.1016/j.kisu.2021.11.003>

Li, X., Raisinghani, N., Gallinat, A., zhang, shihong, Phan, A., yoon, seonghun, Salvia, S. La, Sachs, D., Dogra, N., Erdbruegger, U., & Sahoo, S. (2024). Abstract 4148020: Circulating Extracellular Vesicles-Mediated Cardiotoxicity: A Novel Mechanism Exacerbating Heart Failure in Chronic Kidney Disease. *Circulation*, 150(Suppl_1). https://doi.org/10.1161/CIRC.150.SUPPL_1.4148020

Lim, Y. J., Sidor, N. A., Tonial, N. C., Che, A., Urquhart, B. L., Lim, Y. J. ;, Sidor, N. A. ;, Tonial, N. C. ;, Che, A. ;, & Urquhart, B. L. (2021). Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins* 2021, Vol. 13, Page 142, 13(2), 142. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020142>

Liu, X., Shao, Y., Tu, J., Sun, J., Dong, B., Wang, Z., Zhou, J., Chen, L., Tao, J., & Chen, J. (2022). TMAO-Activated Hepatocyte-Derived Exosomes Impair Angiogenesis via Repressing CXCR4. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.804049>

Liu, X., Shao, Y., Tu, J., Sun, J., Li, L., Tao, J., & Chen, J. (2021). Trimethylamine-N-oxide-stimulated hepatocyte-derived exosomes promote inflammation and endothelial dysfunction through nuclear factor-kappa B signaling. *Annals of Translational Medicine*, 9(22), 1670–1670. <https://doi.org/10.21037/atm-21-5043>

Liu, X., Tu, J., Zhou, Z., Huang, B., Zhou, J., & Chen, J. (2022). TMAO-Activated Hepatocyte-Derived Exosomes Are Widely Distributed in Mice with Different Patterns and Promote Vascular Inflammation. *Cardiology Research and Practice*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5166302>

Liyanage, T., Ninomiya, T., Jha, V., Neal, B., Patrice, H. M., Okpechi, I., Zhao, M. H., Lv, J., Garg, A. X., Knight, J., Rodgers, A., Gallagher, M., Kotwal, S., Cass, A., & Perkovic, V. (2015). Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: A systematic review. *The Lancet*, 385(9981), 1975–1982.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61601-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61601-9)

Lu, J., Hu, Z.-B., Chen, P.-P., Lu, C.-C., Zhang, J.-X., Li, X.-Q., Yuan, B.-Y., Huang, S.-J., & Ma, K.-L. (2019). Urinary levels of podocyte-derived microparticles are associated with the progression of chronic kidney disease. *Annals of Translational Medicine*, 7(18), 445–445.

<https://doi.org/10.21037/ATM.2019.08.78>

Lv, L. L., Feng, Y., Wu, M., Wang, B., Li, Z. L., Zhong, X., Wu, W. J., Chen, J., Ni, H. F., Tang, T. T., Tang, R. N., Lan, H. Y., & Liu, B. C. (2020). Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury. *Cell Death and Differentiation*, 27(1), 210–226.

<https://doi.org/10.1038/S41418-019-0349-Y;TECHMETA>

Maciel, R. A. P., Cunha, R. S., Busato, V., Franco, C. R. C., Gregório, P. C., Dolenga, C. J. R., Nakao, L. S., Massy, Z. A., Boullier, A., Pecoits-Filho, R., & Stinghen, A. E. M. (2018). Uremia impacts ve-cadherin and zo-1 expression in human endothelial cell-to-cell junctions. *Toxins*, 10(10).

<https://doi.org/10.3390/toxins10100404>

Nederveen, J. P., Warnier, G., Di Carlo, A., Nilsson, M. I., & Tarnopolsky, M. A. (2021). Extracellular Vesicles and Exosomes: Insights From Exercise Science.

Frontiers in Physiology, 0, 1757. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.604274>

Nerbass, F. B., do Nascimento Lima, H., Strogoff-De-Matos, J. P., Zawadzki, B., Moura-Neto, J. A., Lugon, J. R., & Sesso, R. (2025). Brazilian Dialysis Survey 2023. *Brazilian Journal of Nephrology*, 47(1), e20240081.

<https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2024-0081PT>

Pelletier, C. C., Croyal, M., Ene, L., Aguesse, A., Billon-Crossouard, S., Krempf, M., Lemoine, S., Guebre-Egziabher, F., Juillard, L., & Soulage, C. O. (2019). Elevation of trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease: Contribution of decreased glomerular filtration rate. *Toxins*, 11(11).

<https://doi.org/10.3390/toxins11110635>

Perlman, R. L., & Heung, M. (2019). Renal Disease. In G. D. Hammer & S. J. McPhee (Eds.), *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, 8e. McGraw-Hill Education.

<http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1156659143>

Prikhodina, L., Komissarov, K., Bulanov, N., Arruebo, S., Bello, A. K., Caskey, F. J., Damster, S., Donner, J. A., Jha, V., Johnson, D. W., Levin, A., Malik, C., Nangaku, M., Okpechi, I. G., Tonelli, M., Ye, F., Gaipov, A., Amouzegar, A., Kyzy, A. A., ... Zakharova, E. (2024). Capacity for the management of kidney failure in the International Society of Nephrology Newly Independent States and Russia region: report from the 2023 ISN Global Kidney Health Atlas (ISN-

GKHA). *Kidney International Supplements*, 13(1), 71.
<https://doi.org/10.1016/J.KISU.2024.01.005>

Romagnani, P., Remuzzi, G., Glasscock, R., Levin, A., Jager, K. J., Tonelli, M., Massy, Z., Wanner, C., & Anders, H.-J. (2017). Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17088. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.88>

Rosner, M. H., Reis, T., Husain-Syed, F., Vanholder, R., Hutchison, C., Stenvinkel, P., Blankestijn, P. J., Cozzolino, M., Juillard, L., Kashani, K., Kaushik, M., Kawanishi, H., Massy, Z., Sirich, T. L., Zuo, L., & Ronco, C. (2021). Classification of Uremic Toxins and Their Role in Kidney Failure. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 16(12), 1918–1928.
<https://doi.org/10.2215/CJN.02660221/-/DCSUPPLEMENTAL>

Seliger, S. L., Salimi, S., Pierre, V., Giffuni, J., Katzel, L., & Parsa, A. (2016). Microvascular endothelial dysfunction is associated with albuminuria and CKD in older adults. *BMC Nephrology* 2016 17:1, 17(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/S12882-016-0303-X>

Sonoda, H., Lee, B. R., Park, K. H., Nihalani, D., Yoon, J. H., Ikeda, M., & Kwon, S. H. (2019). miRNA profiling of urinary exosomes to assess the progression of acute kidney injury. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/S41598-019-40747-8;TECHMETA>

Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Kanno, Y., Yoshinaga, K., Uchida, K., Ueda, Y., Kimiya, K., Uezono, S., Ueda, A., Ito, K., & Ikeda, M. (2009). Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *https://Doi.Org/10.1152/Ajpreal.00200.2009*, 297(4), 1006–1016. <https://doi.org/10.1152/AJPRENAL.00200.2009>

Stinghen, A. E. M., Gonçalves, S. M., Martines, E. G., Nakao, L. S., Riella, M. C., Aita, C. A., & Pecoits-Filho, R. (2009). Increased Plasma and Endothelial Cell Expression of Chemokines and Adhesion Molecules in Chronic Kidney Disease. *Nephron Clinical Practice*, 111(2), c117–c126.
<https://doi.org/10.1159/000191205>

Stinghen, A. E. M., & Pecoits-Filho, R. (2011). Vascular Damage in Kidney Disease: Beyond Hypertension. *International Journal of Hypertension*, 2011, 232683. <https://doi.org/10.4061/2011/232683>

Stubbs, J. R., House, J. A., Ocque, A. J., Zhang, S., Johnson, C., Kimber, C., Schmidt, K., Gupta, A., Wetmore, J. B., Nolin, T. D., Spertus, J. A., & Yu, A. S. (2016). Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(1), 305. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111063>

Sun, G., Yin, Z., Liu, N., Bian, X., Yu, R., Su, X., Zhang, B., & Wang, Y. (2017). Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. *Biochemical and Biophysical Research*

Communications, 493(2), 964–970.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.108>

Tang, W. H. W., Wang, Z., Kennedy, D. J., Wu, Y., Buffa, J. A., Agatista-Boyle, B., Li, X. S., Levison, B. S., & Hazen, S. L. (2015). Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circulation Research*, 116(3), 448–455. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305360>

Tao, X., Thijssen, S., Kotanko, P., Ho, C. H., Henrie, M., Stroup, E., & Handelsman, G. (2016). Improved dialytic removal of protein-bound uraemic toxins with use of albumin binding competitors: An in vitro human whole blood study. *Scientific Reports*, 6(March), 2–10. <https://doi.org/10.1038/srep23389>

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1).
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Thurlow, J. S., Joshi, M., Yan, G., Norris, K. C., Agodoa, L. Y., Yuan, C. M., & Nee, R. (2021). Global Epidemiology of End-Stage Kidney Disease and Disparities in Kidney Replacement Therapy. *American Journal of Nephrology*, 52(2), 98. <https://doi.org/10.1159/000514550>

Toyohara, T., Akiyama, Y., Suzuki, T., Takeuchi, Y., Mishima, E., Tanemoto, M., Momose, A., Toki, N., Sato, H., Nakayama, M., Hozawa, A., Tsuji, I., Ito, S., Soga, T., & Abe, T. (2010). Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertension Research*, 33(9), 944–952.
<https://doi.org/10.1038/hr.2010.113>

Vanholder, Raymond; Snauwaert, Evelien; Verbeke, Francis; Glorieux, Griet. Future of Uremic Toxin Management. *Toxins*, v. 16, n. 11, p. 463, 2024.
<https://doi.org/10.3390/toxins16110463>

Xie, K., Cao, H., Ling, S., Zhong, J., Chen, H., Chen, P., & Huang, R. (2025). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2021: a systematic analysis for the global burden of disease study 2021. *Frontiers in Endocrinology*, 16, 1526482. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2025.1526482>

Xie, L., Zhang, K., Pan, K., Su, X., Zhao, X., Li, R., Wang, Y., Pang, H., Fu, E., & Li, Z. (2025). Engineered extracellular vesicles promote the repair of acute kidney injury by modulating regulatory T cells and the immune microenvironment. *Journal of Translational Medicine*, 23(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1186/S12967-025-06268-X/FIGURES/9>

Xu, K.-Y., Xia, G.-H., Lu, J.-Q., Chen, M.-X., Zhen, X., Wang, S., You, C., Nie, J., Zhou, H.-W., & Yin, J. (2017). Impaired renal function and dysbiosis of gut

microbiota contribute to increased trimethylamine-N-oxide in chronic kidney disease patients. *Scientific Reports*, 7(1), 1445. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01387-y>

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(2015), 1–60. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

Yang, G., Lin, C. C., Yang, Y., Yuan, L., Wang, P., Wen, X., Pan, M. H., Zhao, H., Ho, C. T., & Li, S. (2019). Nobiletin Prevents Trimethylamine Oxide-Induced Vascular Inflammation via Inhibition of the NF- κ B/MAPK Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(22), 6169–6176. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01270>

Zhang, X., Li, Y., Yang, P., Liu, X., Lu, L., Chen, Y., Zhong, X., Li, Z., Liu, H., Ou, C., Yan, J., & Chen, M. (2020). Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF- κ B (Nuclear Factor κ B) Signals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(3), 751–765. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313414>

Zhong, X., Tang, T. T., Shen, A. R., Cao, J. Y., Jing, J., Wang, C., Zhu, X. X., Wen, Y., Li, Z. L., Wang, B., Qin, S. F., Liu, B. C., & Lv, L. L. (2022). Tubular epithelial cells-derived small extracellular vesicle-VEGF-A promotes peritubular capillary repair in ischemic kidney injury. *Npj Regenerative Medicine*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/S41536-022-00268-X;SUBJMETA>

Zhou, Z., Jin, H., Ju, H., Sun, M., Chen, H., & Li, L. (2022). Circulating Trimethylamine-N-Oxide and Risk of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Patients With Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.828343>

Zixin, Y., Lulu, C., Xiangchang, Z., Qing, F., Binjie, Z., Chunyang, L., Tai, R., & Dongsheng, O. (2022). TMAO as a potential biomarker and therapeutic target for chronic kidney disease: A review. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.929262>

ANEXO 1 – PRODUÇÃO ACADÊMICA

Produção científica concomitante ao doutorado

Artigos completos publicados em periódicos

1. CUNHA, REGIANE STAFIM DA; **AZEVEDO, CAROLINA AMARAL BUENO**; FALCONI, CARLOS ALEXANDRE; RUIZ, FERNANDA FOGAÇA; LIABEUF, SOPHIE; CARNEIRO-RAMOS, MARCELA SORELLI; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. The Interplay between Uremic Toxins and Albumin, Membrane Transporters and Drug Interaction. *Toxins*, v. 14, p. 177,
2. GREGÓRIO, PAULO CÉZAR; DA CUNHA, REGIANE STAFIM; **AZEVEDO, CAROLINA AMARAL BUENO**; DOS REIS, MARLENE ANTÔNIA; STINGHEN, ANDRÉA EMÍLIA MARQUES; BARRETO, FELLYPE DE CARVALHO. Fabry disease: integrative aspects from diagnosis to treatment. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 7, p. 6915-6938, 2024.
3. CUNHA, REGIANE STAFIM DA; AZEVEDO, **CAROLINA AMARAL BUENO**; MINISKISKOSKY, GUILHERME; GREGÓRIO, PAULO CÉZAR; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. MicroRNAs and vascular damage in chronic kidney disease: advances and clinical implications. *Brazilian Journal of Nephrology*. 2025;47(3):e20240223.

Capítulos de livros publicados

1. DA CUNHA, R. S.; **AZEVEDO, C. A. B.**; CARDOSO, G. C; RAMOS, E. A. S; STINGHEN, A. E. M. Endothelial Extracellular Vesicles as Biomarkers of Toxic Molecules. In: Patel, V.B; Preedy, V.R; Rajendram, R. (Org.). *Biomarkers in Disease: Methods, Discoveries and Applications*.. 1ed.: Springer Nature, 2023, v., p. 1-24.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **AZEVEDO, CAROLINA AMARAL BUENO**; DA CUNHA, REGIANE STAFIM; DE ALMEIDA, GUILHERME MINISKISKOSKY; DE SOUZA, INGRID LARISSA MELO; STINGHEN, ANDRÉA E M. #1841 Trimethylamine N-oxide (TMAO) induces the formation of endothelial extracellular vesicles. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION, v. 39, p. 0499-1841, 2024.
2. SANTANA, ALINE APARECIDA; GREGORIO, PAULO CÉZAR; DA CUNHA, REGIANE STAFIM; DE ALMEIDA, GUILHERME MINISKISKOSKY; **AZEVEDO, CAROLINA AMARAL BUENO**; FRANCO, CÉLIA REGINA CAVICHIOLO; BARRETO, FELLYPE; STINGHEN, ANDRÉA E M. #2928 Fabry disease may imbalance integrin $\alpha 3$ related to endothelial dysfunction. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION, v. 39, p. 0229-2928, 2024.
3. **AZEVEDO, CAROLINA AMARAL BUENO**; CUNHA, REGIANE STAFIM DA; MINISKISKOSKY, GUILHERME; GREGÓRIO, PAULO CÉZAR; STINGHEN, ANDRÉA MARQUES. Trimethylamine N-oxide Can Trigger Cardiovascular Disease by Affecting Endothelial Cell-to-Cell Junctions through ZO-1 Expression Decreasing. JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY, v. 35, p. 1681, 2024.
4. DA CUNHA, REGIANE; **AZEVEDO, CAROLINA AMARAL BUENO**; MINISKISKOSKY, GUILHERME; GUIMARÃES DEL AMO, MARIA VITÓRIA; GREGORIO, PAULO CÉZAR; DE SOUZA, ROBERTA KELLY LEMOS; BARRETO, FELLYPE; STINGHEN, ANDRÉA E M. #3204 Uremic toxicity impairs the endothelial barrier through phosphorylation of tyrosine 658 on VE-cadherin. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION, v. 40, p. 1402, 2025.

Prêmios

Trabalho premiado como um dos oito melhores resumos apresentados por jovens autores no 61º ERA Congress, European Renal Association (ERA).