

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA

RAYANA ARIANE PEREIRA MACIEL

ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PERMEABILIDADE VASCULAR  
RELACIONADA À TOXICIDADE URÊMICA



CURITIBA

2018

RAYANA ARIANE PEREIRA MACIEL

ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PERMEABILIDADE VASCULAR  
RELACIONADA À TOXICIDADE URÊMICA

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

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

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Maciel, Rayana Ariane Pereira  
Estudo dos mecanismos envolvidos na permeabilidade vascular  
relacionada à toxicidade urêmica. / Rayana Ariane Pereira Maciel. – Curitiba,  
2018.  
104 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Andréa Emilia Marques Stingen  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e  
Patologia.

1. Doença renal. 2. Permeabilidade vascular. 3. Toxicidade. 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.) 612.463



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

**“Estudo dos mecanismos envolvidos na permeabilidade vascular relacionada à toxicidade urêmica”**

por

**Rayana Ariane Pereira Maciel**

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

  
Prof. Dra. Andréa Emilia Marques Stinghen (Presidente)

  
Prof. Dr. Tarcio Teodoro Braga

  
Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho

  
Prof. Dr. Maurilo de Nazaré de Lima Leite Júnior

  
Prof. Dra. Maria Aparecida Dalboni

Curitiba, 18 de maio de 2018.

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, meu Pai, por estar presente em todas as situações da minha vida, por ser minha força e refúgio. Porque dEle e por Ele, para Ele são todas as coisas.

Ao meu marido Diego, meu amigo e companheiro de vida. Por todo o amor e paciência dispensados a mim.

Aos meus pais Allan e Rosangela, minha base, meu apoio. Pelos conselhos, orações e palavras de motivação.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra Andréa Stinghen, pelos mais de 7 anos de parceria e aprendizado, por todas as correções, reuniões com o grupo da França e pelas constantes sugestões. Agradeço por confiar em mim mais uma vez.

Ao *Brazilian Uremic Toxins Group* (BruTox), principalmente ao Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits Filho, por todo suporte com o recrutamento dos pacientes e assistência na parte clínica do trabalho.

Ao grupo francês, especialmente ao Dr. Ziad Massy e Dra Agnes Boullier, que gentilmente nos deram sugestões e nos encorajaram no trabalho, nas reuniões online.

À Prof<sup>a</sup> Dra Célia Regina pelas grandes colaborações, no auxílio na microscopia eletrônica de varredura e nas imunofluorescências. Agradeço a Vera Lucia Pereira dos Santos por ter me apresentado a Prof<sup>a</sup> Célia, pois essa parceria acabou se intensificando e deu fruto a várias imagens contidas nesse trabalho.

À Regiane Stafim da Cunha, por me ajudar em tudo, desde a parte técnica, até a escrita. O mérito desse trabalho também é dela.

Ao Paulo César Gregório e Kariman Assis Bochnie, pelo auxílio nas coletas de sangue e levantamento dos dados clínicos dos pacientes.

À Giane Favretto e Bruna Bosquetti, pela amizade e parceria diárias no laboratório.

À nossa aluna de Iniciação Científica Valentina Busato, pelo companheirismo e pró-atividade, sobretudo na biologia molecular.

À Prof<sup>a</sup>. Lia Sumie Nakao e Carla Juliana Ribeiro Dolenga, pela realização das dosagens das toxinas por HPLC nos soros dos pacientes.

Aos meus colegas do PPGMPP Alessandra Becker Finco, Andressa Chequim, Isabel Biasi Yamanaka e Silvia Daniele Rodrigues, pelos empréstimos e troca de ideias.

À Jenifer Pendiuk Gonçalves pela ajuda no manuseio do citômetro de fluxo e análise dos dados dessa técnica.

À Marina Luise Viola Azevedo pela padronização e realização das imunohistoquímicas das artérias.

Aos professores do PPGMPP Juliana de Moura e Edneia Cavalieri pelas correções de relatórios e da tese na qualificação, o que ajudou o crescimento do projeto.

Ao secretário do PPGMPP Alexandre Vieira por sua disponibilidade e dedicação em ajudar em todas as questões administrativas.

Aos meus colegas professores do UniBrasil, especialmente a Jannaina Ferreira de Melo Vasco, pela amizade, incentivo e pela compreensão nas atividades ou reuniões em que eu não podia estar presente por conta dos afazeres desse trabalho.

Ao Hospital Nossa Senhora da Luz (PUC/PR), por todos os funcionários que cooperaram conosco na coleta de sangue e de dados clínicos. Agradeço ainda aos pacientes recrutados e que concordaram em doar seu sangue e ajudar com a pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida e pelos recursos do Edital Pró-Equipamentos e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo Edital Pró-Infra 2009 (CT-INFRA), ambas pela aquisição do microscópico confocal e scanner de lâminas, utilizados nesse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por subsidiar a aquisição de insumos para a parte experimental através da Chamada Universal 2014.

## RESUMO

A disfunção endotelial é frequente em pacientes com doença renal crônica (DRC) e pode resultar na perda de junções intercelulares e assim contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). O objetivo do presente estudo foi investigar *in vivo* e *in vitro* o impacto do ambiente urêmico na permeabilidade vascular. Para tanto, foram coletados soros de 80 pacientes em diferentes estágios de DRC. Foram dosados os níveis séricos das toxinas urêmicas *p*-cresil sulfato (PCS), indoxil sulfato (IS) e fosfato (Pi) e dos biomarcadores inflamatórios *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1), *Interleukin 8* (IL-8), *Intercellular Adhesion Molecule 1* solúvel (ICAM-1s) e *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* solúvel (VCAM-1s). Em outra coorte, foram avaliadas a expressão de *Vascular Endothelial Cadherin* (VE-caderina) e *Zonula occludens-1* (ZO-1) em artérias ilíacas e renais de pacientes com DRC (receptores) e de doadores (controles), coletados durante transplante renal. *In vitro*, células endoteliais humanas foram tratadas com PCS, IS e Pi nas concentrações máximas urêmicas e com *pool* de soros dos pacientes, agrupados em diferentes estágios de uremia. A viabilidade, permeabilidade e morfologia celular foram avaliadas por MTT, *transwell* e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. As expressões gênicas de VE-caderina e ZO-1 foram avaliadas por RT-qPCR e as expressões proteicas por *Western Blot*, imunofluorescência e citometria de fluxo. *In vivo*, MCP-1, VCAM-1s, PCR-US e todas as toxinas testadas correlacionaram-se significativamente com a TFG ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,0001$ ;  $P < 0,01$  e  $P < 0,0001$ ). Nas artérias de doadores observou-se um endotélio intacto formando uma monocamada contínua com forte expressão de VE-caderina e ZO-1, o que não foi observado nas artérias de receptores. *In vitro*, houve um aumento significativo na permeabilidade celular, especialmente em células tratadas com Pi e *pools* urêmicos ( $P < 0,001$ ). Através da MEV, observou-se que dentre as três toxinas testadas, Pi é a que induz maior perda de junção intercelular, semelhante ao efeito do soro urêmico em estágios mais severos de DRC. A expressão gênica e proteica de VE-caderina diminuíram significativamente ( $P < 0,01$ ), especialmente em células tratadas com Pi3 e todos os grupos urêmicos. Por outro lado, na análise de ZO-1, percebeu-se que embora a expressão gênica esteja significativamente aumentada ( $P < 0,01$ ), a expressão proteica está diminuída ( $P < 0,05$ ). Em resumo, demonstrou-se *in vivo* e *in vitro* que a uremia afeta as junções endoteliais, e quanto mais avançada a DRC, mais comprometimento endotelial. O impacto da uremia na expressão de VE-caderina e ZO-1 é mais significativo nos estágios moderado e severo da DRC e é distinto quando analisado separadamente cada toxina ou os soros urêmicos, o que sugere diferentes mecanismos fisiopatológicos. *In vitro*, demonstrou-se que a expressão gênica e proteica de VE-caderina estão diminuídos em estágios mais avançados de DRC. Entretanto, observou-se uma maior expressão gênica de ZO-1, porém uma menor expressão proteica, o que sugere uma possível regulação pós-transcricional e um papel regulador dessa proteína. Nosso estudo abre perspectivas para avaliar o envolvimento de inúmeras proteínas de junções intercelulares, a fim de elucidar a relação da uremia com a disfunção endotelial e permeabilidade vascular.

**Palavras-chave:** doença renal crônica, toxicidade urêmica, permeabilidade vascular, junções intercelulares.

## ABSTRACT

Endothelial dysfunction is common in patients with chronic kidney disease (CKD) and may result in the loss of intercellular junctions and thus contribute to the development of cardiovascular disease (CVD). The aim of the present study was to investigate *in vivo* and *in vitro* the impact of the uremic environment on vascular permeability. For this, sera from 80 patients were collected at different stages of CKD. Serum levels of uremic toxins *p*-cresyl sulfate (PCS), indoxyl sulfate (IS) and phosphate (Pi) and the inflammatory biomarkers Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), Interleukin 8 (IL-8), Intercellular Adhesion Molecule 1 soluble (ICAM-1s) and Vascular Cell Adhesion Molecule 1 soluble (VCAM-1s) were measured. In another cohort, the expression of Vascular Endothelial Cadherin (VE-cadherin) and Zonula occludens-1 (ZO-1) in the renal and iliac arteries of patients with CKD (receptors) and donors (controls) collected during renal transplantation were analyzed. *In vitro*, human endothelial cells were treated with PCS, IS and Pi at the maximum uremic and serum pool concentrations of patients, grouped at different stages of uremia. The viability, permeability and cellular morphology were evaluated by MTT, transwell and scanning electron microscopy (SEM), respectively. The gene expression of VE-cadherin and ZO-1 were evaluated by RT-qPCR and the protein expression were evaluated by Western Blot, immunofluorescence and flow cytometry. *In vivo*, MCP-1, sVCAM-1, PCR-US and all toxins tested correlated significantly with GFR ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.0001$ ). In the donor arteries an intact endothelium was observed forming a continuous monolayer with strong expression of VE-cadherin and ZO-1, which was not observed in the recipient arteries. *In vitro*, there was a significant increase in cell permeability, especially in cells treated with Pi and uremic pools ( $P < 0.001$ ). Through SEM, it was observed that among the three toxins tested, Pi is the one that induces greater loss of intercellular junction, similar to the effect of uremic serum in more severe stages of CKD. Genetic and protein expression of VE-cadherin decreased significantly ( $P < 0.01$ ), especially in cells treated with Pi3 and all uremic groups. On the other hand, in the analysis of ZO-1, it was observed that although the gene expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the protein expression was decreased ( $P < 0.05$ ). In summary, uremia has been shown *in vivo* and *in vitro* to affect endothelial junctions, and the more advanced the CKD, the more endothelial involvement. The impact of uremia on the expression of VE-cadherin and ZO-1 is more significant in the moderate and severe stages of CKD and is distinct when analyzed separately for each toxin or uremic sera, suggesting different pathophysiological mechanisms. *In vitro*, it has been demonstrated that the gene and protein expression of VE-cadherin are decreased in more advanced stages of CKD. However, a greater gene expression of ZO-1 was observed, but a lower protein expression, which suggests a possible post-transcriptional regulation and a regulating role of this protein. Our study opens perspectives to evaluate the involvement of innumerable intercellular junction proteins in order to elucidate the relationship of uremia with endothelial dysfunction and vascular permeability.

**Key words:** chronic renal disease, uremic toxicity, vascular permeability, intercellular junctions.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – FORMAÇÃO E CONJUGAÇÃO DE PCS E IS.....	23
<b>FIGURA 2</b> – PRINCIPAIS JUNÇÕES INTERCELULARES ENDOTELIAIS: <i>ADHERENS JUNCTIONS</i> (AJs) E <i>TIGHT JUNCTIONS</i> (TJs).....	29
<b>FIGURA 3</b> – ESTADIAMENTO DA DRC DE ACORDO COM A TFG.....	36
<b>FIGURA 4</b> – DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS TOXINAS E CORRELAÇÃO COM A TFG.....	53
<b>FIGURA 5</b> – EXPRESSAO DE VE-CADERINA E ZO-1 EM ARTÉRIAS ILÍACAS E RENAIIS.....	54
<b>FIGURA 6</b> – EFEITO DAS TOXINAS UREMICAS PCS, IS E Pi NA VIABILIDADE CELULAR.....	56
<b>FIGURA 7</b> – EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS E <i>POOLS</i> URÊMICOS NA PERMEABILIDADE CELULAR.....	57
<b>FIGURA 8</b> – ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS JUNÇÕES INTERCELULARES EM CELULAS ENDOTELIAIS HUMANAS APOS TRATAMENTO COM TOXINAS UREMICAS E <i>POOLS</i> UREMICOS.....	61
<b>FIGURA 9</b> – MARCAÇÃO DE F-ACTINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	64
<b>FIGURA 10</b> – EFEITO DAS TOXINAS E <i>POOLS</i> URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE VE-CADERINA.....	65
<b>FIGURA 11</b> – EFEITO DAS TOXINAS E <i>POOLS</i> URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ZO-1.....	66
<b>FIGURA 12</b> – EFEITO DAS TOXINAS E <i>POOLS</i> URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE P120.....	67
<b>FIGURA 13</b> – EFEITO DAS TOXINAS E <i>POOLS</i> URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE $\beta$ -CATENINA.....	67
<b>FIGURA 14</b> – EFEITO DAS TOXINAS E <i>POOLS</i> URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE VINCULINA.....	68
<b>FIGURA 15</b> – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VE-CADERINA.....	69
<b>FIGURA 16</b> – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ZO-1.....	70
<b>FIGURA 17</b> – EXPRESSAO DE VE-CADERINA E ZO-1 POR FACS.....	71

<b>FIGURA 18</b> – EXPRESSÃO POR IMUNOMARCAÇÃO DE VE-CADERINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	73
<b>FIGURA 19</b> – EXPRESSÃO POR IMUNOMARCAÇÃO DE ZO-1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES.....	45
<b>TABELA 2</b> – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	49
<b>TABELA 3</b> – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS <i>POOLS</i> URÊMICOS	50
<b>TABELA 4</b> – USO CONTÍNUO DE MEDICAMENTOS DE ACORDO COM OS GRUPOS URÊMICOS.....	51
<b>TABELA 5</b> – CORRELAÇÃO DE QUIMIOCINAS (MCP-1 E IL-8), MOLÉCULAS DE ADESÃO SOLÚVEIS (ICAM-1s E VCAM-1s) e PCR-US.....	51

## LISTA DE SIGLAS

AJ	- <i>Adherens junction</i>
BSA	- <i>Bovin seric albumin</i>
CKD-EPI	- <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
DAB	- 3,3'-diaminobenzidina
DAPI	- 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride salt
DCV	- Doença Cardiovascular
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DRC	- Doença Renal Crônica
ECA	- Enzima conversora da angiotensina
EDTA	- Ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	- Ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
FACS	- <i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FITC	- <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GJ	- <i>Gap junction</i>
HMG-CoA	- 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA
HPLC	- <i>High performance liquid chromatography</i>
HPRT	- <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>
ICAM-1	- <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IL-8	- <i>Interleukin-8</i>
IS	- Indoxil sulfato
KDIGO	- <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
MCP-1	- <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MEM	- <i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MTT	- 3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide
NO	- <i>Nitric Oxide</i>

PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PCR-US	- Proteína C Reativa ultrasensível
PCS	- <i>p</i> -cresil sulfato
PFA	- Paraformaldeído
Pi	- Fosfato inorgânico
PVDF	- <i>Polyvinylidene difluoride</i>
RCF	- <i>Relative Centrifugal Force</i>
RIPA	- <i>Radio immunoprecipitation assay</i>
RT-PCR	- Reação de cadeia de polimerase com transcriptase reversa
RT-qPCR	- Reação de cadeia de polimerase quantitativo com transcriptase reversa
SFB	- Soro Fetal Bovino
TBST	- <i>Tris Buffered Saline + Tween 20</i>
TJ	- <i>Tight junction</i>
VCAM-1	- <i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
VE-CADERINA	- <i>Vascular Endothelial Cadherin</i>
ZO-1	- <i>Zonula occludens-1</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) E TOXICIDADE UREMICA .....	22
2.2 DOENÇA CARDIOVASCULAR (DCV) RELACIONADA A DRC .....	26
2.3 JUNÇÕES CELULARES E PERMEABILIDADE VASCULAR .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>33</b>
4.1 PACIENTES .....	33
4.2 COLETA DE SANGUE .....	34
4.3 ESTADIAMENTO DOS PACIENTES PARA CONFEÇÃO DE <i>POOLS</i> URÊMICOS .....	34
4.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS PACIENTES .....	35
4.5 DOSAGEM DE PCS E IS NO SORO DOS PACIENTES .....	36
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1, IL-8, VCAM-1s e ICAM-1s NO SORO DOS PACIENTES .....	36
4.7 AMOSTRAS DE ARTÉRIAS DE RECEPTORES E DOADORES .....	37
4.8 ENSAIO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA DETECÇÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 EM ARTÉRIAS ILÍACAS E RENAIIS .....	38
4.9 PREPARO DAS TOXINAS URÊMICAS .....	39
4.10 CULTIVO CELULAR .....	40
4.11 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR .....	40
4.12 ENSAIO DE PERMEABILIDADE CELULAR .....	41
4.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	42
4.14 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE MICROFILAMENTOS DE F-ACTINA .....	42

4.15 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VE-CADERINA, ZO-1, P120, $\beta$ -CATENINA E VINCULINA.....	43
4.16 IMUNOMARCAÇÕES POR WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 .....	44
4.17 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA IMUNOMARCAÇÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 .....	45
4.18 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS) PARA VE-CADERINA E ZO-1 .....	46
4.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	48
5.2 DISTRIBUICAO DOS NIVEIS SÉRICOS DE TOXINAS URÊMICAS E CORRELAÇÃO COM A TFG.....	51
5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 EM ARTÉRIAS ILÍACAS E RENAIIS.....	53
5.4 VIABILIDADE CELULAR.....	54
5.5 PERMEABILIDADE CELULAR .....	55
5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL POR MEV .....	56
5.7 EXPRESSAO DE MICROFILAMENTOS DE F-ACTINA .....	62
5.8 EXPRESSÃO GÊNICA DE VE-CADERINA, ZO-1, P120, $\beta$ -CATENINA E VINCULINA.....	63
5.9 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VE-CADERINA.....	67
5.10 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ZO-1 .....	68
5.11 EXPRESSAO DE VE-CADERINA E ZO-1 POR FACS .....	69
5.12 IMUNOMARCAÇÃO DE VE-CADERINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS .....	71
5.13 IMUNOMARCAÇÃO DE ZO-1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS .....	72
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>90</b>
APÊNDICE I.....	90

APÊNDICE II.....	93
APÊNDICE III.....	95
<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA CONCOMITANTE AO DESENVOLVIMENTO DA TESE ...</b>	<b>96</b>
<b>NOTA BIOGRÁFICA .....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A perda da função renal em pacientes com DRC leva ao acúmulo de compostos tóxicos no sangue, que normalmente seriam excretados pela urina. Esses metabólitos são chamados de toxinas urêmicas e são responsáveis por muitas das consequências clínicas encontradas no organismo do paciente, produzindo uma condição conhecida como uremia (VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). Como consequência da uremia, alterações estruturais do sistema cardiovascular, causadas por distúrbios metabólicos, alterações de pressão e/ou sobrecarga do fluxo sanguíneo, influenciam a integridade do endotélio (PANNIER et al., 2000). As toxinas urêmicas PCS, IS e Pi estão frequentemente relacionadas a esse desequilíbrio na homeostase endotelial, contribuindo para a disfunção endotelial encontrada em pacientes com DRC.

Demonstrou-se que o efeito pró-inflamatório do PCS ativa a produção de radicais livres pelos leucócitos (SCHEPERS et al., 2007) e induz a liberação de micropartículas endoteliais (MEIJERS et al., 2009a), reatividade vascular e remodelamento vascular (GROSS et al., 2015). A toxina IS pode induzir estresse oxidativo em diferentes células (NIWA, 2010a) e promover a progressão da DRC pelo aumento da produção de radicais livres pelas células tubulares renais (MOZAR et al., 2012; NIWA, 2010b) e também pode resultar em aumento da permeabilidade, com ação no remodelamento do citoesqueleto e na contração celular, interferindo nas junções intercelulares (PENG et al., 2012a, 2012b). Além disso, Pi e IS induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) diminuindo NO (STINGHEN et al., 2014). Ainda, sabe-se que a hiperfosfatemia prejudica a angiogênese, a morfologia celular, a migração endotelial e a formação de tubo capilar (DI MARCO et al., 2012).

A constante agressão do endotélio pela interação entre toxinas urêmicas e células endoteliais, com alteração do fenótipo celular, pode resultar em níveis plasmáticos elevados de biomarcadores da inflamação vascular. Na DRC, vários biomarcadores de risco cardiovascular têm sido extensivamente estudados, como as citocinas MCP-1 e IL-8 e as moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (SULIMAN et al., 2006). Anteriormente demonstrou-se que tais biomarcadores estão aumentados nos estágios mais avançados da DRC, pois a exposição de células endoteliais ao soro

urêmico resulta em aumento da expressão de MCP-1, IL-8 e VCAM-1, sugerindo uma ligação entre ativação vascular, inflamação e toxicidade urêmica (MACIEL et al., 2016b; STINGHEN et al., 2009).

As junções celulares no endotélio, como *tight junctions* (TJs), *adherens junctions* (AJs) e *gap junctions* (GJs), controlam funções importantes na homeostase celular (NITTA et al., 2003). Na uremia, essas junções podem estar comprometidas, o que pode favorecer a lesão endotelial e a doença cardiovascular progressiva (BAZZONI; DEJANA, 2004; BODA-HEGGEMANN; RÉGNIER-VIGOUROUX; FRANKE, 2009). Estudos em modelos animais demonstram que as toxinas urêmicas induzem a ruptura da barreira endotelial (BATES; HARPER, 2002), resultando na formação de lacunas entre células adjacentes (fenestras) e como consequência, perda de junções intercelulares. Através de estudos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que a VE-caderina, um AJ, é necessária para a integridade endotelial em vasos quiescentes e para a organização correta de novos vasos (LAMPUGNANI; DEJANA, 2007), sendo que a fosforilação transitória rápida da VE-caderina nas células endoteliais, pode ser induzida por VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Estes eventos moleculares são acompanhados por aumento da permeabilidade vascular e diminuição da associação da VE-caderina ao citoesqueleto. Estudos *in vivo* em camundongos demonstraram a importância da VE-caderina na manutenção da integridade vascular, uma vez que a administração de anticorpos anti VE-caderina levou os animais a um aumento significativo da permeabilidade vascular, fragilidade capilar e sangramento (CORADA et al., 1999). Algumas moléculas acessórias são importantes na regulação da VE-caderina no domínio citoplasmático, como  $\beta$ -catenina, p120-catenina (p120) e vinculina. Essas interações regulam a associação de caderinas com o citoesqueleto de actina e são importantes para uma forte adesão célula-célula. A p120 suprime a endocitose da caderina e regula o citoesqueleto (KOURTIDIS; NGOK; ANASTASIADIS, 2013; POKUTTA; WEIS, 2007). A desfosforilação da  $\beta$ -catenina, juntamente com a VE-caderina, contribui para a estabilização da junção célula-célula endotelial. No entanto, a  $\beta$ -catenina pode exercer efeitos mais amplos na expressão gênica e também se liga às caderinas nas AJs célula-a-célula e estabiliza sua interação com o citoesqueleto (CORADA et al., 2010). A vinculina protege as

junções VE-caderina da abertura durante o remodelamento dependente de força (HUVENEERS et al., 2012) e é um importante regulador das junções célula-célula (BIRUKOVA et al., 2016; TWISS et al., 2012). Estudos envolvendo Zonula Occludens-1 (ZO-1), uma TJ, mostraram que as células deficientes em ZO-1 ainda são capazes de formar estruturas normais de TJ e exibem permeabilidade normal. No entanto, há um atraso no recrutamento de outras proteínas TJ, incluindo ocludinas e claudinas, indicando que a ZO-1 desempenha um papel importante na regulação de outras TJs (UMEDA et al., 2004) e estudos em camundongos deficientes em ZO-1 demonstraram a indução de defeitos nos vasos sanguíneos do saco vitelino (KATSUNO et al., 2008). ZO-1 também é um importante regulador central das junções endoteliais dependentes da VE-caderina, que organiza o citoesqueleto, ajustando a tensão célula-célula, a migração, a angiogênese e a formação de barreira (TORNAVACA et al., 2015).

Assim, a proposta do presente estudo é através de uma combinação de estudos *in vivo* e *in vitro* investigar o efeito da uremia sobre as proteínas da junção celular endotelial, correlacionando com diferentes estágios da DRC e suas implicações nas doenças vasculares. Se nossa hipótese for comprovada, esperamos que este estudo possa auxiliar na compreensão da fisiopatologia cardiovascular envolvida na uremia e levar à descoberta de novas estratégias terapêuticas nos pacientes com DRC.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC) E TOXICIDADE UREMICA

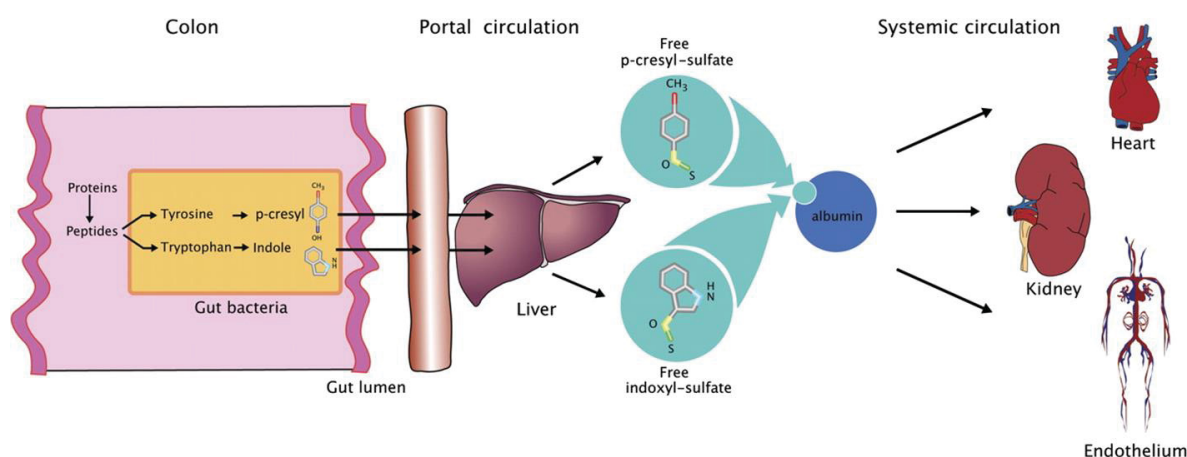
A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como presença de lesão renal por período igual ou superior a 3 meses, apresentando anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), sendo que quanto maior o estadiamento da DRC, menor a TFG. A insuficiência renal, que ocorre no estágio mais avançado da doença é estabelecida quando a TFG atinge valores inferiores a 15 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (INKER et al., 2014). O número total estimado de pacientes em diálise no Brasil foi de 122.825 em 2016 (SESSO et al., 2017).

Com a cronificação da DRC, os rins perdem a capacidade parcial ou total de remoção de metabólitos tóxicos da circulação, que comumente seriam excretados para formação da urina, resultando no acúmulo destes no organismo. Tais metabólitos são chamados de toxinas urêmicas e o acúmulo destas toxinas é responsável por muitas consequências clínicas no organismo, levando a uma condição conhecida como uremia. Como consequência, na uremia, ocorrem alterações estruturais do sistema cardiovascular, causados por distúrbios metabólicos, alterações de pressão e/ou sobrecarga do fluxo sanguíneo, influenciando na integridade do endotélio (VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). Atualmente já foram identificados mais de 150 compostos urêmicos (EuTox, <http://www.uremic-toxins.org/>), 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, que têm como protótipos moléculas como ureia e creatinina e que são facilmente removidos 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. Estas moléculas só podem ser removidas por membranas de porosidade grande o suficiente para permitir sua passagem através da membrana. Muitos dos compostos deste grupo são peptídeos que afetam um grande número de órgãos e sistemas;

- Compostos ligados a proteínas, em geral com baixo peso molecular. Os protótipos deste grupo são os fenóis, como o *p*-cresol (PC) e o *p*-cresil sulfato (PCS) e os indóis, como o indoxil sulfato (IS). São compostos de difícil remoção por diálise e com diversas atividades tóxicas no organismo pela sua alta afinidade com proteínas, sobretudo a albumina (VANHOLDER et al., 2001, 2003; VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). As toxinas PCS e IS são formadas a partir de PC e indol que são formados pela fermentação dos aminoácidos tirosina e triptofano pela microbiota intestinal. Posteriormente, PC e indol são conjugados pelo fígado por sulfatação, gerando os compostos PCS e IS (MEIJERS; EVENEPOEL, 2011) (FIGURA 1).

**FIGURA 1 – FORMAÇÃO E CONJUGAÇÃO DE PCS e IS**



**NOTA – Formação de PCS e IS.** A metabolização dos aminoácidos tirosina e triptofano pela microbiota intestinal gera *p*-cresol e indol, respectivamente. Após absorção, estas toxinas passam pelo fígado e são conjugadas (sulfatação) a *p*-cresil sulfato e indoxil sulfato, os quais se ligam a albumina causando vários efeitos deletérios no organismo (MEIJERS; EVENEPOEL, 2011).

A toxina PCS ( $C_7H_8O_4S$ ) é um fenol, com peso molecular de 188,2 Da, proveniente da conjugação (sulfatação) do seu precursor *p*-cresol (PC) pelo fígado. O PC é derivado dos aminoácidos tirosina e fenilalanina provenientes da dieta e metabolizados pela microbiota intestinal (LIABEUF et al., 2010a). A maioria dos estudos pioneiros com compostos fenólicos iniciou-se somente com o PC. Entretanto, descobriu-se que este composto se encontra em concentrações muito pequenas no organismo, sendo logo metabolizado para seus conjugados pela microbiota intestinal. Logo, PCS é considerada a toxina efetiva, tanto pelo seu nível significativamente

aumentado, quanto pelo seu expressivo impacto bioquímico, uma vez que o PCS afeta a resposta inflamatória, interferindo na ativação de leucócitos polimorfonucleares e resposta endotelial a citocinas (DOU et al., 2002; VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). Estudos *in vivo* avaliaram que níveis séricos elevados de PCS são encontrados em pacientes em estágios mais avançados da doença renal crônica (LIABEUF et al., 2010a). O efeito pró-inflamatório causado pelo PCS, pode ser avaliado pelo aumento da formação de radicais livres produzidos por leucócitos, contribuindo para o dano vascular nos pacientes com DRC (SCHEPERS et al. (2007). MEIJERS et al. (2009) demonstraram ainda que o PCS induz o desprendimento de micropartículas endoteliais, mesmo na ausência de dano endotelial, sugerindo que esta toxina pode estar envolvida na disfunção endotelial, e significativamente correlacionado com a patogênese da aterosclerose em pacientes em estágio avançado de doença renal (WANG et al., 2010). Sugere-se ainda que PCS, por ser um composto fenólico pequeno com propriedades lipofílicas, facilmente penetre a membrana celular e desorganize a sua função e conseqüentemente das células como um todo (ZHU et al., 2012), além de prejudicar a reatividade e remodelação vascular (GROSS et al., 2015) e também acelerar o desenvolvimento de disfunção cardíaca associada à DRC, intensificando a apoptose de cardiomiócitos (HAN et al., 2015).

A toxina IS ( $C_8H_7NO_4S$ ) é um indol com peso molecular de 213,21 Da. Assim como o PCS, o IS é formado a partir da metabolização das proteínas da dieta, no qual o aminoácido triptofano é metabolizado em indol ( $C_8H_7N$ ) pela microbiota intestinal (LEE; LEE, 2010). Estudos *in vivo* também demonstraram que o IS está correlacionado com a disfunção vascular associado a DRC (SIX et al., 2015), promove a calcificação aórtica em ratos hipertensos (ADIJIANG et al., 2008) e acelera a senescência de células musculares lisas (MUTELIEFU et al., 2012). O IS induz ao estresse oxidativo nas células tubulares, células mesangiais, osteoblastos, células musculares lisas vasculares e células endoteliais (NIWA, 2010a). De acordo com MOZAR (2012), o tratamento de células tubulares proximais com IS diminui a viabilidade celular e por isso, promove progressão da insuficiência renal crônica através da indução da produção de radicais livres pelas células tubulares renais (MOZAR et al., 2012). O estresse oxidativo e o efeito antiproliferativo causados pelo IS podem ser atribuídos a

disfunção mitocondrial, podendo ser tratados com antioxidantes (LEE et al., 2015). Estudos com células tubulares proximais demonstraram que o IS aumenta a produção de EROS e ativa os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e p53 (SHIMIZU et al., 2013). Ainda, IS pode contribuir para a disfunção do endotélio cerebral em pacientes com DRC pelo aumento do stress oxidativo (STINGHEN et al., 2014).

A toxina fosfato inorgânico (Pi) ou fósforo é predominantemente encontrada em alimentos com grande quantidade de proteína, como carne, peixe e produtos lácteos (KALANTAR-ZADEH et al., 2010). Muitos processos celulares requerem fósforo, como na síntese e metabolismo de ácidos nucleicos, metabolismo energético, sinalização celular, integridade da membrana, função muscular, atividade enzimática, metabolismo lipídico e mineralização óssea. No soro, o fósforo existe principalmente como Pi (URIBARRI, 2007), sendo considerado uma toxina vascular, pois seus níveis elevados têm sido correlacionados com efeitos vasculares adversos, e a manutenção dos níveis séricos de Pi dentro da faixa normal têm sido correlacionados com a redução do risco e mortalidade cardiovascular (SHROFF, 2013). Estudos envolvendo pacientes em hemodiálise, demonstrou que a maioria dos pacientes possuía níveis de Pi séricos acima de 6,5 mg/dL (valor de referência 2,5-4,5 mg/dL), o que aumenta o risco de morte nesta população (BLOCK et al., 1998). No início da DRC, pode ocorrer uma sobrecarga de Pi, entretanto a hiperfosfatemia só é evidente quando a TFG é inferior a 30 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> (LEVIN et al., 2007). Vários estudos observacionais demonstraram uma associação entre a hiperfosfatemia e a mortalidade por DCV em pacientes em estágios avançados de DRC (KESTENBAUM et al., 2005; SIX et al., 2012). Observou-se também, que pacientes com níveis elevados de fósforo sérico apresentaram maior massa do ventrículo esquerdo e risco aumentado de insuficiência cardíaca (DHINGRA et al., 2010). Em estudos experimentais verificou-se que em casos de hiperfosfatemia, há alteração na angiogênese, na morfologia, na migração de células endoteliais e na formação do tubo capilar (DI MARCO et al., 2012). Ainda, o aumento de Pi induz apoptose de células musculares lisas e endoteliais (DI MARCO et al., 2008; RAHABI-LAYACHI et al., 2014).

## 2.2 DOENÇA CARDIOVASCULAR (DCV) RELACIONADA A DRC

Na uremia, alterações estruturais do sistema cardiovascular são consequências dos distúrbios metabólicos, alterações de pressão e/ou sobrecarga do fluxo sanguíneo. O termo disfunção endotelial tem sido usado para se referir a várias condições patológicas, incluindo alterações anticoagulantes e propriedades anti-inflamatórias do endotélio, deficiência na modulação do crescimento vascular e desregulação no remodelamento vascular (CAI; HARRISON, 2000). O endotélio possui várias funções, como anti-inflamatória, anticoagulante e vasodilatadora, responsáveis por manter a homeostase, atuando ativamente nas propriedades geométricas e estruturais de artérias de grande calibre. Alterações na função endotelial podem estar associadas com desregulação do remodelamento arterial (PANNIER et al., 2000). No entanto, na hipertensão arterial pode ocorrer um agravamento desse quadro, gerando um desequilíbrio na produção e liberação dos fatores contráteis e relaxantes dos vasos, como o óxido nítrico (NO), que pode levar a um comprometimento no vasorelaxamento endotélio dependente (CHRISOBOLIS et al., 2011) e aumentando o tônus vascular, além de contribuir para o aumento da permeabilidade vascular, da coagulação intravascular e da proliferação de células musculares lisas (HELENA et al., 2001).

A agressão constante do endotélio a partir da interação entre toxinas urêmicas e células endoteliais, com alteração do fenótipo celular, pode refletir, ao menos em parte, os níveis plasmáticos elevados de marcadores de inflamação vascular. Na DRC, vários marcadores de risco cardiovascular têm sido amplamente estudados, tais como as quimiocinas MCP-1 e IL-8 e as moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 (SULIMAN et al., 2006). De fato, já foi demonstrado que os níveis séricos desses biomarcadores estão aumentados em estágios mais avançados da DRC, pois a exposição das células endoteliais ao soro urêmico resulta em expressões aumentadas de MCP-1, IL-8 e VCAM-1s, o que sugere uma ligação entre a ativação vascular, a inflamação sistêmica e a toxicidade urêmica (MACIEL et al., 2016b; STINGHEN et al., 2009).

A quimiocina *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1 ou CCL2) é produzida por vários tipos de células, como fibroblastos, células microgliais, astrócitos, monócitos e células musculares lisas e endoteliais (MELGAREJO et al., 2009). Sua principal

função e fazer a quimiotaxia dos monócitos para áreas de injúria na camada íntima do vaso durante os primeiros estágios do processo aterogênico (NIU et al., 2008; NIU; KOLATTUKUDY, 2009). Clinicamente, pacientes pós infarto agudo do miocárdio (IAM) apresentam níveis plasmáticos elevados de MCP-1, associados a inflamação e eventos cardiovasculares em estágios mais avançados da DRC (IKEDA et al., 2002; MARTINOVIC et al., 2005; PAPAYIANNI; ALEXOPOULOS, 2002). Ainda, MCP-1 contribui para o aumento da permeabilidade endotelial em células cerebrais (STAMATOVIC, 2003).

A interleucina 8 (IL-8 ou CXCL-8) é uma quimiocina expressa por vários tipos de células incluindo monócitos, neutrófilos, fibroblastos e células endoteliais, tendo como principal característica a quimiotaxia de neutrófilos para o local da lesão, induzindo sua adesão e transmigração através do endotélio (CAMPBELL; MAXWELL; WAUGH, 2013). Além disso, a IL-8 estimula outras células a realizar fagocitose e induz à reorganização do citoesqueleto, alterações nos níveis de cálcio intracelular, ativação de integrinas, exocitose de proteínas granulares e do *burst* respiratório (JUNDI; GREENE, 2015). Estudos demonstram uma correlação entre IL-8 e a angiogênese tumoral, metástase e mau prognóstico em diversos tipos de câncer (TANG et al., 2012). A uremia pode estar associada a danos vasculares intensos, por consequência dos níveis circulantes aumentados de IL-8, o que sugere uma correlação entre disfunção endotelial e reparo tecidual (RIBEIRO et al., 2014).

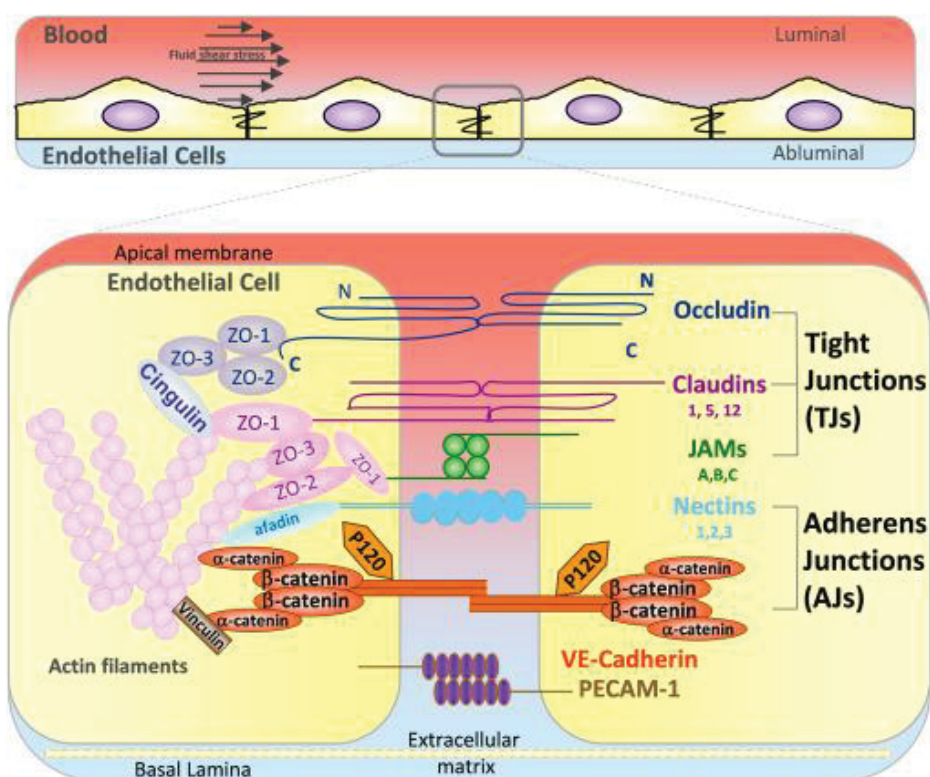
A molécula de adesão *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) liga-se à integrina  $\alpha 4\beta 1$ , que é constitutivamente expressa em linfócitos, eosinófilos e monócitos e tem função no rolamento das células na diapedese, promovendo a adesão e acúmulo de monócitos no desenvolvimento da placa aterosclerótica (HUO; HAFEZI-MOGHADAM; LEY, 2000; SULIMAN et al., 2006). *In vitro* demonstrou-se que VCAM-1 é um importante marcador de ativação endotelial (VIDEM; ALBRIGTSEN, 2008) e que, juntamente com o estresse oxidativo, são indicadores precoces da aterosclerose e outras doenças inflamatórias (MARUI et al., 1993). Um mecanismo regulatório envolvido na produção de MCP-1 e VCAM-1 por células endoteliais e monócitos pode estar associado a disfunção endotelial causada pela uremia no início da aterosclerose (REMPEL et al., 2015).

A molécula de adesão *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) participa especificamente no tráfico de células inflamatórias, nas funções efetoras de leucócitos, na adesão de células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T. O aumento da expressão de ICAM-1 em uma variedade de tipos celulares tem sido atribuído à estimulação por citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (HUBBARD; ROTHLEIN, 2000). Nas placas ateroscleróticas coronárias humanas, foi observada a expressão elevada de VCAM-1 e ICAM-1 e o aumento do número de macrófagos e células T na camada íntima do vaso, em regiões de neovascularização da placa, presente na aterosclerose (O'BRIEN et al., 1996).

### 2.3 JUNÇÕES CELULARES E PERMEABILIDADE VASCULAR

Uma das funções mais específicas da camada endotelial é atuar como uma barreira seletiva entre o sangue/linfa e tecido. As junções do endotélio controlam diferentes funções essenciais para a homeostase, pois a permeabilidade dos solutos no plasma é controlada (BATES; HARPER, 2002; BAZZONI; DEJANA, 2004). Estudos recentes têm mostrado que além da adesão célula-célula, as junções podem transferir sinais intracelulares que regulam a inibição induzida por contato do crescimento celular, apoptose, expressão de genes e formação de novos vasos. Por conseguinte, as condições que perturbam as junções endoteliais podem não apenas aumentar a permeabilidade vascular abrindo lacunas intercelulares, mas também alterar as respostas das células endoteliais ao seu ambiente e às células circundantes (LAMPUGNANI; DEJANA, 2007). Para manter a junção célula a célula do endotélio, as células endoteliais expressam três principais tipos de junções celulares: 1 – *adherens junctions* (AJs), 2 – *tight junctions* (TJs) e 3 – *gap junctions* (GJs) (CERUTTI; RIDLEY, 2017; NITTA et al., 2003) (FIGURA 2).

**FIGURA 2 - PRINCIPAIS JUNÇÕES INTERCELULARES ENDOTELIAIS: ADHERENS JUNCTIONS (AJs) E TIGHT JUNCTIONS (TJs)**



**NOTA – Junções intercelulares: Adherens Junctions (AJs) e Tight Junctions (TJs).** Nas AJs, a adesão é promovida principalmente pela VE-caderina. Nas TJs, a adesão é mediada por claudinas, ocludinas, membros da família de moléculas de adesão juncional (JAM). FONTE: CERUTTI; RIDLEY, 2017.

1 – AJs: têm papel importante na inibição de contato do crescimento das células endoteliais, permeabilidade entre células, leucócitos e solutos circulantes. Nas AJs, a adesão é promovida principalmente pelas caderinas, de forma cálcio-dependente. As células endoteliais expressam níveis relativamente elevados de duas caderinas: uma caderina neuronal (N-caderina) e uma caderina denominada VE-caderina (BAZZONI; DEJANA, 2004).

2 – TJs: têm como principal finalidade funcional proporcionar uma barreira e um isolamento dentro da membrana, regulando a permeabilidade e manutenção da polaridade celular. Além disso, são necessários para uma correta organização de novos vasos na angiogênese (LAMPUGNANI; DEJANA, 2007). As TJ contêm pelo menos 40 proteínas diferentes, tais como claudinas e ocludinas, como ZO-1, ZO-2, ZO-3, as quais

são proteínas transmembranares que formam adesões intercelulares homofílicas e heterofílicas. As proteínas ZO são proteínas que recrutam vários tipos de proteínas na superfície citoplasmática da junção, contribuindo assim para a chamada "placa de junção" (ANDERSON et al., 1988).

3 – GJs: são estruturas de comunicação, canais intercelulares que permitem a passagem de difusão direta e solutos de pequeno peso molecular entre as células adjacentes e estão intimamente relacionadas com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (GOODENOUGH; GOLIGER; PAUL, 1996; LAMPUGNANI; DEJANA, 2007).

A organização das junções endoteliais varia ao longo da árvore vascular em função das necessidades específicas de cada órgão. No cérebro, onde é exigido um estrito controle de permeabilidade entre o sangue e o sistema nervoso, as junções são bem desenvolvidas e ricas em TJ. Em contraste, as vênulas pós-capilares, que permitem o tráfico de células e proteínas do plasma circulante, demonstram as TJs desorganizadas. Estas características morfológicas também podem explicar a alta sensibilidade de vênulas pós-capilares para agentes de aumento de permeabilidade, como a histamina e bradicinina. Em contraste, o endotélio das artérias de grande calibre, que controla rigidamente a permeabilidade, tem um sistema bem desenvolvido de TJ. Ainda, o endotélio linfático exhibe estruturas juncionais específicas, os quais são especializados em controlar a passagem de linfócitos para diferentes compartimentos. No quadro de uremia, todas essas proteínas de junções celulares podem ter suas funções prejudicadas, o que pode favorecer a lesão endotelial e progressiva doença cardiovascular (BAZZONI; DEJANA, 2004). Em animais com DRC, foi encontrado menor expressão de proteínas de junção no epitélio intestinal (VAZIRI; YUAN; NORRIS, 2013).

A caderina endotelial vascular (VE), também chamada 7B4 e caderina 5 (CDH5) é um membro da família de caderinas, que são AJs, presentes no endotélio vascular. As caderinas são proteínas transmembranosas dependentes de cálcio, que se ligam entre si de uma forma homofílica (entre células do mesmo tipo). A VE-caderina, semelhante a muitos outros membros da família das caderinas, está ligada através da sua cauda citoplasmática às proteínas p120,  $\beta$ -catenina e plakoglobina. Outro aspecto

importante no controle da permeabilidade pela VE-caderina, é a sua associação com o citoesqueleto de actina (SCHULTE et al., 2011). As caderinas desempenham um papel na formação e manutenção da arquitetura de tecidos. A VE-caderina tem desempenhado um papel importante na vasculogênese e na angiogênese. *In vitro* e *in vivo*, percebe-se que VE-caderina é necessária para a integridade endotelial em vasos quiescentes e para a organização correta de novos vasos. Em células endoteliais, o VEGF (fator de crescimento endotelial) induz uma rápida e transitória fosforilação da tirosina de VE-caderina. Estes eventos moleculares são acompanhados do aumento da permeabilidade vascular e diminuição da associação de VE-caderina ao citoesqueleto. A tirosina kinase Src está associada à fosforilação de VE-caderina no domínio citoplasmático Y685 da tirosina (GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013). Estudos *in vivo* em camundongos, demonstrou a importância da VE-caderina na manutenção da integridade vascular, uma vez que a administração de anticorpos anti VE-caderina conduziu os animais a um aumento significativo no aumento da permeabilidade, fragilidade capilar e hemorragias (CORADA et al., 1999).

A proteína *Zonula occludens-1* (ZO-1) é uma proteína de membrana periférica com uma massa molecular de 220 kD que foi identificada pela primeira vez como um componente TJs de células epiteliais e endoteliais (ANDERSON et al., 1988; STEVENSON et al., 1986). As proteínas ZO se associam à caderinas em células sem TJs e com GJs, interagindo diretamente com conexinas (ITOH et al., 1997). A ZO-1 é essencial na organização espacial endotelial e regulação da força de tração que atua nas AJs (TORNAVACA et al., 2015). Estudos têm demonstrado que as células deficientes em ZO-1 são ainda capazes de formar TJs normais e apresentam permeabilidade normal. Entretanto, observa-se um atraso no recrutamento de outras proteínas das TJs, incluindo ocludinas e claudinas, indicando que ZO-1 tem um papel importante na regulação das outras proteínas participantes das TJs (UMEDA et al., 2004). Demonstrou-se ainda que a deficiência de ZO-1 em camundongos demonstrou a indução de defeitos estruturais nos vasos sanguíneos no saco vitelino (KATSUNO et al., 2008).

No presente estudo, pretendemos investigar o efeito da uremia (PCS, IS, Pi e soro urêmico) nas proteínas de junções celulares (VE-caderina e ZO-1) em endotélio

sistêmico, correlacionando com os estágios da DRC e suas implicações nas DCV, a fim de elucidar melhor a relação da uremia com alterações na permeabilidade vascular e na lesão endotelial.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

– Avaliar o impacto da toxicidade urêmica (PCS, IS, Pi e *pools* urêmicos) na disfunção endotelial e correlação com a permeabilidade vascular sistêmica.

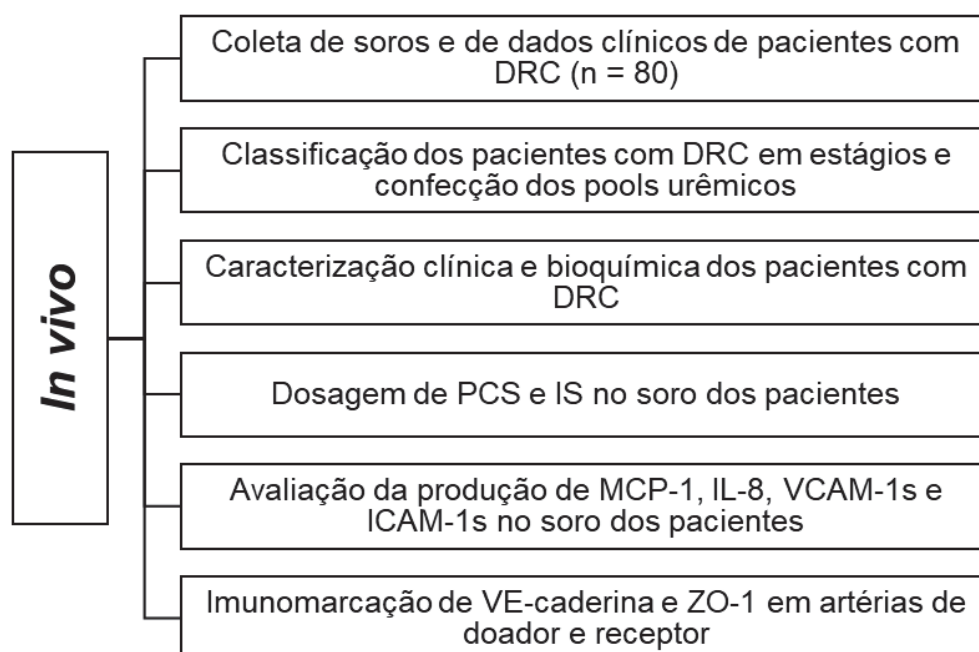
#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar no soro dos pacientes com DRC os níveis das toxinas urêmicas PCS, IS e Pi e marcadores de inflamação vascular (MCP-1, IL-8, ICAM-1s e VCAM-1s) e correlacioná-los com as taxas de filtração glomerular (TFG);
- Avaliar o impacto do ambiente urêmico na alteração da morfologia e fenótipo endotelial;
- Avaliar *in vitro* a viabilidade e permeabilidade celular após tratamento de células endoteliais humanas com PCS, IS, Pi e com diferentes condições de uremia;
- Avaliar a expressão gênica e proteica de VE-caderina e ZO-1 após os tratamentos das células endoteliais com PCS, IS, Pi e diferentes condições de uremia;
- Compreender em qual estágio da DRC inicia-se o rompimento das junções intercelulares através do tratamento das células com PC, IS, Pi e diferentes condições de uremia.

## 4 METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR) sob o parecer CEP/SD-PB nº 980959 na data de 11/03/2015 (APÊNDICE II) e CEP/PUC-PR nº 557 na data de 26/06/2005 (APÊNDICE III), respectivamente.

### ESTUDO *IN VIVO*



#### 4.1 PACIENTES

Foram incluídos no estudo 80 pacientes diagnosticados com DRC, em diferentes estágios, em tratamento no Ambulatório de Nefrologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), atendidos pelo Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho, nefrologista do ambulatório. Os pacientes incluídos no estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE II), prontificando-se a

participar de estudos elucidativos da DRC. Os critérios de inclusão aplicados foram idade entre 18 e 80 anos, presença de DRC e aceite na participação do estudo. Os critérios de exclusão foram sinais clínicos de inflamação aguda ou doença infecciosa, malignidade, terapia de reposição da função renal prévia ou atual, doença autoimune, neoplasias, disfunção hepática, uso de drogas imunossupressoras no momento ou nos últimos três meses.

#### 4.2 COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue total dos pacientes foram coletadas (aproximadamente 20 mL), no período de maio a agosto de 2015, no Ambulatório de Nefrologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), no período da tarde (13:00 as 17:00 h) em tubos secos sem anticoagulantes e com ativadores de coágulo. As amostras foram mantidas em gelo e processadas no período de 2 h até a centrifugação a 1500 g (RCF) por 10 min, a fim de se obter os soros, e posteriormente estocadas a -80°C até o momento das análises.

#### 4.3 ESTADIAMENTO DOS PACIENTES PARA CONFECÇÃO DE POOLS URÊMICOS

A taxa de filtração glomerular (TFG) dos pacientes foi estimada pela fórmula do estudo CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) (LEVEY et al., 2009), onde:

$$\text{TFG} = 141 \times \min(\text{Cre}/\kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{Cre}/\kappa, 1)^{-1.209} \times 0,993^{\text{Idade}} \times 1,018 [\text{se mulher}] \times 1,159 [\text{se negro}]$$

Sendo:

Cre = creatinina sérica;  $\kappa$  = 0,7 para mulheres e 0,9 para homens;  $\alpha$  = 0,329 para mulheres e 0,411 para homens; min = indica o mínimo de Cre/ $\kappa$  ou 1; max = indica o máximo de Cre/ $\kappa$  ou 1.

Os pacientes e soros foram classificados em estágios 1, 2, 3a, 3b, 4 e 5 da DRC (INKER et al., 2014) de acordo com suas respectivas TFG, seguindo as recomendações da *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) (FIGURA 3) para confecção dos *pools* urêmicos e para caracterização clínica e bioquímica.

**FIGURA 3 – ESTADIAMENTO DA DRC DE ACORDO COM A TFG**

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	Dano renal sem alteração da função renal	≥ 90
2	Dano renal com alteração leve da função renal	89 a 60
3a	Perda leve a moderada da função renal	59 a 44
3b	Perda moderada a grave da função renal	44 a 30
4	Perda grave da função renal	29 a 15
5	Insuficiência renal	≤ 15

FONTE: KDIGO (2013).

Para o preparo de *pools* urêmicos, os quais foram utilizados nos tratamentos celulares, os soros foram agrupados da seguinte forma: GI (DRC leve ou estágio 1, n = 7); GII (DRC moderada ou estágios 2 e 3, n = 42); GIII (função renal severamente diminuída ou estágios 4 e 5, n = 31). As alíquotas de soro de cada paciente foram utilizadas para compor os 3 *pools* (GI, GII e GIII) de acordo com cada estágio da DRC, conforme descrito acima (INKER et al., 2014; STINGHEN et al., 2009).

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS PACIENTES

No recrutamento os pacientes foram caracterizados de acordo com idade, gênero, raça, tabagismo, etilismo, presença de *Diabetes mellitus* e de hipertensão arterial. As dosagens de ácido úrico, albumina, cálcio, creatinina, fósforo, sódio, potássio, ureia foram realizados por método colorimétrico (Vitros 5,1 Fusion, Ortho Clinical Diagnostics, Nova Jérsei, EUA) e as dosagens de Proteína C Reativa de alta

sensibilidade (PCR-US) por ensaio imunoturbidimétrico (AU680, Beckman Counter, Califórnia, EUA).

#### 4.5 DOSAGEM DE PCS E IS NO SORO DOS PACIENTES

As dosagens de PCS e IS no soro dos pacientes foram quantificadas por HPLC como previamente descritas (STOCKLER-PINTO et al., 2017). Basicamente, as amostras foram diluídas (100  $\mu$ L de soro com 360  $\mu$ L de água ultrapura) e aquecidas a 95°C por 30 min para desnaturação de proteínas e resfriadas em gelo (8-4°C) por 10 min (MEERT et al., 2012). As amostras foram então centrifugadas (14.000 x g, 4°C, 20 min) e o sobrenadante foi ultrafiltrado com uma membrana de 30 kDa (Amicon Ultra, Millipore). Os tubos foram novamente centrifugados a 8.400 x g, 4°C, durante 30 min. O ultrafiltrado (10  $\mu$ L) foi injetado no HPLC. As determinações cromatográficas foram realizadas com um sistema Shimadzu Prominence equipado com uma injeção Rheodyne (modelo 7125), uma bomba quaternária (Shimadzu LC-20AD), controlada pelo software LC Solution e um detector de fluorescência (Shimadzu RF-20A). As toxinas foram separadas por uma coluna Luna C8 5 $\mu$ m, 100Å, 150x4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos da América), eluída com 50 mM de formiato de amônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pH = 3,0 e metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) variando entre 35% a 70%, com 0,7 mL/min de vazão. Durante a corrida, os comprimentos de onda de fluorescência variaram: PCS:  $\lambda_{exc}$  = 265 nm e  $\lambda_{em}$  = 290 nm (MEERT et al., 2012), IS:  $\lambda_{exc}$  = 283 nm e  $\lambda_{em}$  = 380 nm (CALAF et al., 2011; DE LOOR et al., 2009). As curvas de calibração dos padrões foram realizadas para quantificar cada toxina.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1, IL-8, VCAM-1s e ICAM-1s NO SORO DOS PACIENTES

No soro dos pacientes (n=80) foram dosadas as quimiocinas MCP-1 e IL-8 e as frações solúveis das moléculas de adesão VCAM-1s e ICAM-1s, através de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). As concentrações utilizadas de anticorpos de captura,

detecção e recombinante foram sugeridas pelo fabricante (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA). Para MCP-1 os limites de detecção mínimo e máximo do anticorpo recombinante (279-MC) foram 15,62 a 1000 pg/mL, as concentrações de uso do anticorpo de captura (MAB679) foi de 2 µg/mL e de detecção (BAF279) foi 50 ng/mL (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA). Para IL-8 os limites de detecção mínimo e máximo do anticorpo recombinante (208-IL) foram 15,62 a 1000 pg/mL, as concentrações de uso do anticorpo de captura (MAB208) foi de 1 µg/mL e de detecção (BAF208) foi 20 ng/mL (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA). Para VCAM-1s os limites de detecção mínimo e máximo do anticorpo recombinante (809-VR) foram 0,78 a 50 ng/mL, as concentrações de uso do anticorpo de captura (MAB809) foi de 2 µg/mL e de detecção (BAF809) foi 50 ng/mL (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA). Para ICAM-1s os limites de detecção mínimo e máximo do anticorpo recombinante (ADP4) foram 0,19 a 12,5 ng/mL, as concentrações de uso do anticorpo de captura (MAB720) foi de 4 µg/mL e de detecção (BAF720) foi 50 µg/mL (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA). A leitura das absorvâncias foi realizada no leitor Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltda., Männedorf, Switzerland) em 450 nm e filtro de referência de 570 nm (STINGHEN, 2009). Foram realizados três experimentos em triplicata para cada quimiocina e molécula de adesão testada.

#### 4.7 AMOSTRAS DE ARTÉRIAS DE RECEPTORES E DOADORES

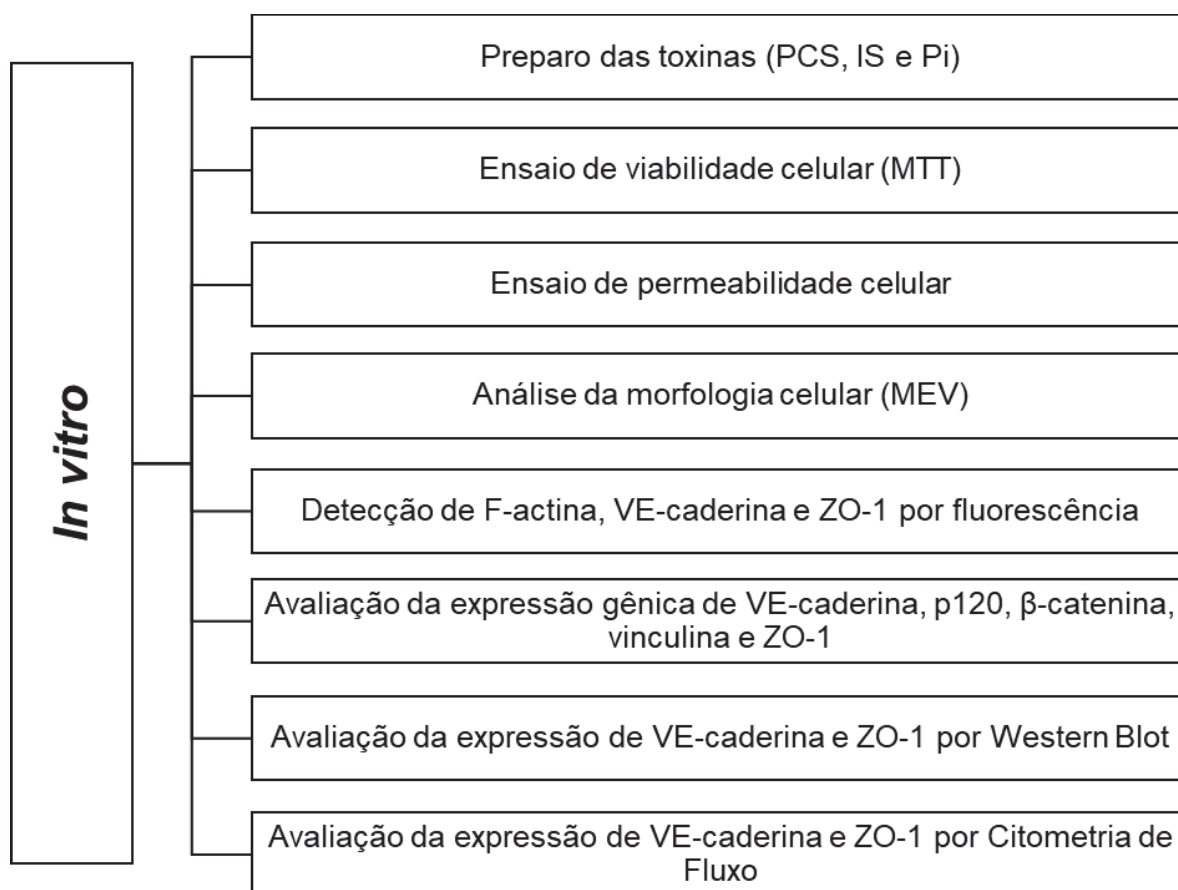
Outro grupo de pacientes foram incluídos para avaliar expressões de proteínas de junção intercelular em tecido de artérias. Para isso, foram incluídos no estudo 13 pacientes em estágio 5 de DRC (receptores de transplante renal) e 10 pacientes sem DRC (doadores de rim), utilizados como controles. Durante o transplante, segmentos ilíacos externos e artérias renais foram coletados de pacientes com DRC e controles, respectivamente. Os critérios de exclusão foram tabagismo, diabetes, doença inflamatória sistêmica e história ou sintomas de DCV antes do transplante. Os pacientes incluídos no estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE III).

#### 4.8 ENSAIO DE IMUNOMARCAÇÃO PARA DETECÇÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 EM ARTÉRIAS ILÍACAS E RENAIIS

Durante o transplante, segmentos ilíacos externos e artérias renais foram coletados de 5 pacientes com DRC e 13 doadores (controles) e imediatamente fixados em 5 mL de formalina a 10%. Após 12 h, os espécimes foram embebidos em parafina e secções de 5 µm foram preparadas (GUILGEN et al., 2011). Para a imunohistoquímica, foi realizada desparafinação do material com xilol à temperatura ambiente (19-23°C), álcool etílico absoluto, álcool etílico a 80% e bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 5% (diluído em metanol). Para a recuperação do antígeno, as lâminas foram imersas em Imuno Retrifer (Dako, Califórnia, EUA) a 99°C por 25 min. Em seguida, os segmentos foram deixados para resfriar à temperatura ambiente (19-23°C). As lâminas foram então lavadas em água destilada e deixadas em tampão TBS-Tris (pH 7,3), evitando-se a secagem da amostra. A imunomarcção da VE-caderina e ZO-1 foi detectada através do kit Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System (Spring Bioscience, Califórnia, EUA). Os anticorpos primários foram diluídos da seguinte forma: *Mouse Anti-Human VE-Cadherin Monoclonal* (MAB9381) (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA) a 2,5 µg/mL (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA) e *Rabbit Anti ZO-1* (Mid) (40-2200) (Invitrogen, Califórnia, EUA) a 2,0 µg/mL, incubados em câmara úmida (2-8°C) por 12 h. As lâminas foram lavadas em TBS (Tris buffered saline) pH 7,3 e mantidas durante 15 min. As amostras foram lavadas novamente e incubadas com *Spring Reveal Complement* (anticorpo secundário anti-camundongo) (Spring Bioscience, Califórnia, EUA) por 10 min em temperatura ambiente (19-23°C) e *Spring Reveal Conjugate* (anticorpo secundário anti-coelho conjugado a HRP) (Spring Bioscience, Califórnia, EUA) por 15 min em temperatura ambiente (19-23°C). A reação foi desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), até o aparecimento da coloração marrom. As amostras foram lavadas rapidamente em água destilada e contrastadas com hematoxilina por 5 min, com posterior lavagem em água por 5 min. Em seguida, foram desidratadas com álcool etílico absoluto 96°GL e diafanizadas com xilol. Como controle, o anticorpo primário foi omitido, resultando em coloração negativa. As

imagens foram capturadas por um microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, EUA).

### ESTUDOS *IN VITRO*



#### 4.9 PREPARO DAS TOXINAS URÊMICAS

Para sintetizar a toxina PCS, *p*-cresol (PC) foi sulfatado e caracterizado por *High performance liquid chromatography* (HPLC) de acordo com NEUBERG & FEIGENBAUM (1941), modificado (FAVRETTO et al., 2017). O IS e Pi foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sendo o Pi proveniente do fosfato de sódio monobásico anidro (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 20 mM. Para o tratamento das células, PCS e IS foram diluídos em *Phosphate Saline Buffer* (PBS), de modo que as concentrações

utilizadas foram: concentrações normais (PCSn: 2,87 mg/L e ISn: 0,6 mg/L), concentrações mínima urêmica (PCSu: 15,60 mg/L e ISu: 53 mg/L) e máxima urêmica (PCSm: 47,20 mg/L e ISm: 236 mg/L), de acordo com o *European Uremic Toxin* (EuToX, <http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>). O Pi foi diluído em PBS a 3 mM (Pi3) e 4 mM (Pi4) (SIX et al., 2012).

#### 4.10 CULTIVO CELULAR

Como modelo experimental foi utilizado a linhagem de células endoteliais humanas EA.hy926 (ATCC CRL 2922, Virginia, EUA) (EDGEELL; MCDONALD; GRAHAM, 1983) cultivadas com 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/estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco, Grand Island, EUA). As células foram mantidas em cultivo a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até confluência. Posteriormente as células foram tratadas com as toxinas urêmicas (PCS, IS e Pi) nas concentrações previamente descritas como normal (n), urêmica (u) e máxima urêmica (m) e Pi 3 e 4 mM (Pi4). Além disso, a fim de mimetizar o mesmo ambiente encontrado em pacientes com DRC, foram adicionados no meio de cultura 10% dos *pools* urêmicos (GI, GII e GIII).

#### 4.11 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR

Para análise de viabilidade celular foram plaqueadas 10.000 células/poço em placa de 96 poços. As células foram mantidas em cultura com o meio DMEM (Gibco, Grand Island, EUA), 10% SFB (Gibco, Grand Island, EUA) e antimicrobianos (1% da solução de penicilina (10000 IU/mL) e estreptomicina (10 mg/mL) (Gibco, Grand Island, EUA) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 90% de confluência. As células foram incubadas com PCS, IS e Pi nas concentrações acima descritas por 24 h. Após esse período, foi acrescentado ao cultivo uma solução a 5 mg/mL de 3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por mais 3 h para a incorporação do sal e consequente formação dos cristais de formazan.

Posteriormente, todo o meio foi retirado e os cristais foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A absorbância foi lida a 570 nm no leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Bio-Rad, Califórnia, EUA) (MOSMANN, 1983). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata (n = 9).

#### 4.12 ENSAIO DE PERMEABILIDADE CELULAR

Foram plaqueadas 200.000 células por poço em placa de 24 poços com 100 µL de meio de cultura DMEM (Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 10% SFB na parte superior do *transwell* (*insert*) Código #3413 (Corning Incorporated, Nova Iorque, EUA) e 600 µL na parte inferior. A placa com os *inserts* foi mantida a 37°C por aproximadamente 72 h, até a confluência. Posteriormente as células foram tratadas com meio DMEM suplementado com 10% SFB (usado como controle negativo), PCSm, ISm, Pi3 e *pools* urêmicos (GI, II e III 10%) por 24 h. Após, os tratamentos foram retirados e as células foram lavadas com meio de cultura *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM) sem vermelho de fenol (Gibco, Grand Island, EUA), retirando toda a cor do meio de tratamento a fim de não interferir com a fluorescência. Posteriormente, na parte superior dos *inserts* foi adicionado 100 uL de solução de FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (2,5 mg/mL) e em cada poço 250 µL de PBS. A placa então foi mantida por 20 min a temperatura ambiente (19-23°C), na ausência de luz. Para a leitura de fluorescência, foram transferidos 150 µL de FITC-Dextran (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), que supostamente passou pela monocamada de células, para uma microplaca de 96 poços escura/preta. A leitura foi realizada no Tecan Infinite® 200 PRO (Tecan Group Ltda., Männedorf, Switzerland) em 485 nm de excitação e 535 nm de emissão e os dados analisados em Tecan i-control software Version 1.5.14.0 (Tecan Group Ltda., Männedorf, Switzerland) (MA; WANG, 2008). As membranas dos *inserts* foram coradas com cristal violeta por 15 min para posterior visualização por microscopia de luz (40X). Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata (n = 12).

#### 4.13 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Com a finalidade de verificar possíveis alterações morfológicas e ultra estruturais induzidas pela exposição das células endoteliais às toxinas PCS, IS, Pi e aos *pools* urêmicos (GI, II e III), foi empregado a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram plaqueadas 100.000 células em lamínulas circulares (13 mm de diâmetro), em placas de 24 poços e mantidas em cultura por 24 h. Posteriormente foram tratadas com as PCS, IS, Pi nas concentrações máximas urêmicas (PCSm, ISm, Pi3) e *pools* urêmicos (GI, II e III) por 24 h. O meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com tampão salino fosfato (PBS), fixadas com Solução de Karnovski (glutaraldeído 2%, paraformaldeído (PFA) 4%, CaCl<sub>2</sub> 0,1M, pH 7,4) por 1 h. Posteriormente foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4) por 1 h. Após a fixação, as células foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e duas vezes com 100%), por um período de 10 min em cada concentração. A seguir, as células foram submetidas ao ponto crítico no aparelho CPD 010 (Critical Point Dryer) 030-Balzers, metalizadas com ouro no aparelho (SCD 030-Balzers) e analisadas no microscópio eletrônico de varredura (Tescan-Vega3-LMU-Scanning electron microscope, Kohoutovice, Czech Republic) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (GUIMARÃES et al., 2009). As imagens foram capturadas nos aumentos de 1.000X, 3.000X, 6.000X e 15.000X. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (n = 6).

#### 4.14 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA PARA DETECÇÃO DE MICROFILAMENTOS DE F-ACTINA

Foram plaqueadas 100.000 células sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços. Em seguida essas células foram tratadas com PCS, IS, Pi nas concentrações máximas urêmicas (PCSm, ISm, Pi3) e *pools* urêmicos (GI, II e III) por

24 h. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% por 20 min, lavadas 2X com PBS e mantidas a 4°C até posterior utilização. Para detecção dos microfilamentos de F-actina, as células foram incubadas por 30 min com sondas ActinGreen ReadyProbes (Invitrogen, Califórnia, EUA) e DAPI (Invitrogen, Massachusetts, EUA). As lamínulas foram seladas com esmalte incolor isento de formol e observadas em microscópio de fluorescência confocal Nikon A1RSiMP+ (Nikon Instruments, Tóquio, Japão). Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata (n = 4).

#### 4.15 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VE-CADERINA, ZO-1, P120, $\beta$ -CATENINA E VINCULINA

O RNA total foi isolado das células lisadas por Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA), como previamente descrito (CHOMCZYŃSKI; SACCHI, 1987). A pureza e a concentração do RNA foram verificadas pela razão da absorbância mensurada a 260 nm e 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose. As moléculas de RNAm foram convertidas em DNA complementar (cDNA), utilizando o Kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) e 1000 ng do RNA total da amostra. O cDNA foi submetido à análise por RT-PCR para verificar a presença ou ausência da expressão do gene e posteriormente a RT-qPCR para obtenção da quantificação mais precisa de genes alvos. Para a RT-PCR, o cDNA foi amplificado com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes alvos utilizando o kit de PCR Taq Polymerase Recombinant (Invitrogen, Califórnia, EUA). O produto da PCR foi amplificado em gel de poliacrilamida 8% e corado com nitrato de prata. Para a RT-qPCR, o cDNA foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizando o EvaGreen Master Mix S (Applied Biological Materials, Richmond, Canadá) no termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Inc., Mortlake NSW, Australia). A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , seguindo parâmetros anteriormente preconizados (BUSTIN et al., 2009; HUGGETT et al., 2013). A sequência dos oligonucleotídeos

iniciadores dos genes alvos e do gene normalizador *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase* (HPRT) estão descritos na TABELA 1 (CHENG; CHANG; LEUNG, 2013; FIGUEIRA et al., 2009; KONDAPALLI; FLOZAK; ALBUQUERQUE, 2004; MAYANAGI et al., 2008; STEIN et al., 2011; STEWART et al., 2012). Foram realizados quatro experimentos independentes em duplicata (n = 8).

**TABELA 1 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES**

Genes alvos	Iniciadores	Amplicon
<i>VE-cadherin</i>	5'-CAGCCCAAAGTGTGTGAGAA-3' (F) 5'-CGGTCAAACCTGCCCATACTT-3' (R)	185 pb
<i>ZO-1</i>	5'-GCGGTCAGAGCCTTCTGATC-3' (F) 5'-CATGCTTTACAGGAGTTGAGACAG-3' (R)	122 pb
<i>p120</i>	5'-GATGCTGTCAAGTCCAATGCAG-3' (F) 5'-AGTACTGGGATGCCCTTGAGC-3' (R)	101 pb
<i>β-catenin</i>	5'-GTGCTATCTGTCTGCTCTAGTA-3' (F) 5'-CTCCTGTTTAGTTGCAGCATC-3' (R)	154 pb
<i>Vinculin</i>	5'-TCAGATGAGGTGACTCGGTTGG-3' (F) 5'-GGGTGCTTATGGTTGGGATTTCG-3' (R)	109 pb
<i>HPRT</i>	5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' (F) 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' (R)	101 pb

F: forward; R: reverse. Gene normalizador: HPRT 101 pb.

#### 4.16 IMUNOMARCAÇÕES POR WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DE VE-CADERINA E ZO-1

As células foram cultivadas em frascos de cultivo T75 a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e tratadas durante 24 h com PCS e IS nas concentrações urêmicas máximas, Pi a 3 mM e *pools* urêmicos (GI, GII e GIII). Em seguida as células foram lavadas com PBS gelado (4°C) e lisadas em 100 µL de tampão RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM b-glicerofosfato, 1 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% de NP-40, 1% de desoxicolato de sódio e leupeptina a 1 µg/mL). Os lisados celulares foram centrifugados durante 30 min à 14.000 g e os sobrenadantes foram recolhidos. Para a quantificação de proteínas foi realizado o protocolo BioRad Assay para microplacas de 96 wells. A leitura foi realizada a 595 nm no leitor de microplaca BioRad 680 (BioRad, Califórnia, EUA). Aproximadamente 30 µg de proteínas celulares totais foram diluídas em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 0,3

M pH 6,8, 50% v/v de glicerol, 10% m/v de SDS e 5% v/v de 2-mercaptoetanol) e sepadas em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio a 10%, transferidas eletroforéticamente para membranas de PVDF (Polyvinylidene difluoride) (Invitrogen, Califórnia, EUA). As membranas foram bloqueadas com caseína 3% e 0.3% de Tween 20 (East Yorkshire, Inglaterra) diluído em PBS por 1 h à temperatura ambiente (19-23°C). Após a lavagem com TBST, as membranas foram incubadas por 12 h a 4°C em agitação suave com anticorpo *Mouse Anti-Human VE-Cadherin Monoclonal* (MAB9381) (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA) diluído a 1,0 µg/mL em solução de bloqueio (caseína 0,3%) ou *Rabbit Anti ZO-1* (Mid) (40-2200) (Invitrogen, Califórnia, EUA) diluído a 2,0 µg/mL em solução de bloqueio (caseína 0.3%). Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se os anticorpos secundários marcados com peroxidase (HRP) conjugados com anti-mouse IgG (0,01 mg/mL) e anti-rabbit IgG (0,8 mg/mL), respectivamente (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), incubados à temperatura ambiente por 2 h e visualizados por quimiluminescência ECL (GE Health care Life Sciences do Brasil Ltda, São Paulo). A intensidade das bandas foi analisada utilizando o Software Image Studio Lite (Lincoln EUA), versão 5.0. Foram realizados quatro experimentos em duplicata (n = 8).

#### 4.17 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA IMUNOMARCAÇÃO DE VE-CADERINA E ZO-1

Foram plaqueadas 100.000 células sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços. Em seguida essas células foram tratadas com PCS, IS, Pi nas concentrações máximas urêmicas (PCSm, ISm), Pi a 3 mM e *pools* urêmicos (GI, II e III) por 24 h. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% por 20 min e mantidas a 4-8°C até posterior utilização. As células foram então incubadas com PBS contendo glicina 0,1% (para bloquear os radicais aldeídicos) por 1 minuto e incubadas com PBS + BSA 1% + saponina 0,01% por 1 hora a temperatura ambiente (19-23°C). Posteriormente as células foram incubadas com anticorpo *Mouse Anti-Human VE-Cadherin Monoclonal* (MAB9381) (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA) diluído a 0,5 µg/mL em PBS + BSA

1% + saponina 0,01% por 12 h. As lamínulas foram então lavadas novamente com PBS por 2 vezes e procedeu-se a incubação com anticorpo *NorthernLights™ 557conjugated Anti-Mouse IgG Secondary* (vermelho; NL007) (R&D Systems, Inc., Minnesota, EUA) diluído com PBS a 1 mg/mL ao abrigo da luz. Outras células foram incubadas com anticorpo *Rabbit Anti ZO-1 (Mid)* (40-2200) (Invitrogen, Califórnia, EUA) diluído a 2,5 µg/mL em PBS + BSA 1% + saponina 0,01% por 12 h. As lamínulas foram então lavadas novamente com PBS por 2 vezes e procedeu-se a incubação com anticorpo Alexa Fluor 488 (verde; A-21206) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) diluído com PBS a 1 mg/mL ao abrigo da luz. As células foram lavadas 3 vezes com PBS e as lamínulas foram então montadas em lâminas histológicas, com Fluoromount G com DAPI (3 ng/mL-4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidrocloride) (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), o que evidencia o núcleo da célula em azul. As lamínulas foram seladas com esmalte incolor isento de formol e observadas em microscópio de fluorescência confocal Nikon A1RSiMP+ (Nikon Instruments, Tóquio, Japão). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (n = 6).

#### 4.18 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO (FACS) PARA VE-CADERINA E ZO-1

As células foram tratadas em frascos de cultivo T75 e desprendidas dos frascos com EDTA 2 Mm, com o auxílio de *scraper*. Foram contadas aproximadamente 1.000.000 de células por microtubo e fixadas com PFA 2% por 20 min. Foram realizadas imunomarcações de VE-caderina ou ZO-1 conforme descrito acima no ensaio de imunofluorescência. As amostras foram lidas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences, Califórnia, EUA), utilizando o software CellQuest (BD Biosciences, Califórnia, EUA) e os lasers e canais de detecção apropriados para cada fluoróforo. No citômetro foram adquiridos 20.000 eventos de cada amostra e os dados foram analisados utilizando o programa Flowing Software 2. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata (n = 6).

#### 4.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo amostral primeiramente foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Os dados foram analisados pelos 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. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando  $P < 0,05$ . Os valores foram expressos com as médias e  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados com auxílio do pacote estatístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A TFG (CKD-EPI) média da população estudada (n = 80) foi de 44,47 mL/min/1,73m<sup>2</sup> (variando de 7,20 a 157,30 mL/min/1,73m<sup>2</sup>). As características clínicas e bioquímicas da população estudada estão descritas abaixo na TABELA 2.

**TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOQUÍMICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA**

Parâmetros analisados	
Pacientes (n)	80
Fatores de risco tradicionais	
Média de idade ± EPM, anos	62,7 ± 1,3
Gênero, masculino, %	61,0
Raça, caucasianos, %	86,0
Tabagismo, %	44,0
Etilismo, %	20,0
<i>Diabetes mellitus</i> , %	45,0
Hipertensão arterial, %	91,0
Dislipidemia, %	56,0
DCV, %	45,0
Caracterização bioquímica	
Ácido úrico, mg/dL	7,0
Albumina, g/dL	4,2
Cálcio, mg/dL	8,6
Creatinina, mg/dL	2,3
Glicose, mg/dL	116,0
PCR-US, mg/L	6,2
Potássio, mmol/L	5,0
Sódio, mmol/L	141,0
Ureia, mg/dL	77,0
PCS (mg/L)	20,5
IS (mg/L)	4,6
Pi (mg/dL)	4,4

DCV: Doença Cardiovascular; PCR-US: Proteína C reativa de ultrasensível; PCS: *p*-cresil sulfato; IS: indoxil sulfato; Pi: fosfato inorgânico.

Os pacientes foram classificados em estágios 1, 2, 3a, 3b, 4 e 5 da DRC, de acordo com suas respectivas TFG (KDIGO), para confecção dos *pool/s* urêmicos e caracterização clínica e bioquímica. Dos 80 pacientes, 8,75 % (n = 7) foram classificados como DCR leve (estágio 1), 52,50 % (n = 42) em DRC moderada (estágio 2 e 3) e 38,75 % (n = 31) em DRC severa (estágio 4 e 5). A maior parte dos tabagistas

(46,2%) e etilistas (60%) eram pacientes com DRC em estágios severos (estágios 4 e 5), classificados como GIII (DRC severa). Em relação a *Diabetes mellitus*, 47% foram classificados como GIII, 20,6% como GII (DRC moderada) e 32,4 como GI (DRC leve). Em relação a hipertensão arterial, 39,7% foram classificados como GIII, 34,9% como GII e 25,4% como GI. Os níveis séricos de ácido úrico, creatinina, PCR-US e ureia foram mais elevados nos pacientes com DRC em estágios severos (estágios 4 e 5), classificados como GIII. Os níveis séricos das toxinas urêmicas PCS, IS e Pi foram mais elevados nos pacientes com DRC em estágios severos (estágios 4 e 5), classificados como GIII: PCS (33,9 mg/L), IS (9,6 mg/L) e Pi (5,0 mg/L) (TABELA 3).

**TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS POOLS URÊMICOS**

Parâmetros analisados	GI (n = 7) DRC leve	GII (n = 42) DRC moderada	GIII (n = 31) DRC severa
Fatores de risco tradicionais			
Tabagismo, %	52,0	36,0	45,0
Alcoolismo, %	22,0	12,0	26,0
<i>Diabetes mellitus</i> , %	43,0	32,0	58,0
Hipertensão arterial, %	78,0	100,0	94,0
Dislipidemia, %	57,0	56,0	58,0
DCV, %	43,0	36,0	55,0
Caracterização Bioquímica			
Ácido úrico (mg/dL)	6,1	7,0	7,7
Albumina (g/dL)	4,5	4,2	4,0
Calcio (mg/dL)	9,7	7,7	8,6
Creatinina (mg/dL)	1,0	1,6	3,7
Glicose (mg/dL)	137,1	95,3	120,8
PCR-US (mg/L)	5,1	5,9	7,4
Potássio (mmol/L)	5,0	5,0	5,0
Sódio (mmol/L)	141,0	142,0	139,0
Ureia (mg/dL)	42,3	63,9	114,0
Toxinas urêmicas			
PCS (mg/L)	11,1	15,4	33,9
IS (mg/L)	1,5	2,1	9,6
Pi (mg/dL)	4,1	4,1	5,0

DCV: Doença Cardiovascular; PCR-US: Proteína C reativa ultrasensível; PCS: *p*-cresil sulfato; IS: indoxil sulfato; Pi: fosfato inorgânico.

Do total de pacientes, 84% faziam uso contínuo de anti-hipertensivos, 44% de anticoagulantes, 55% de diuréticos, 40% de antidiabéticos, 49% de estatinas e apenas 6% de quelantes de fosfato. A distribuição do uso de medicamentos por grupo está descrita na TABELA 4.

**TABELA 4 - USO CONTÍNUO DE MEDICAMENTOS DE ACORDO COM OS GRUPOS URÊMICOS**

Parâmetros analisados	GI (n = 7)	GII (n = 42)	GIII (n = 31)
	DRC leve	DRC moderada	DRC severa
<b>Medicação</b>			
Bloqueadores alfa-adrenérgicos, %	4,3	3,8	25,8
Bloqueadores beta-adrenérgicos, %	30,4	53,8	48,4
Inibidores da ECA, %	39,1	38,5	45,2
Bloqueadores de canais de cálcio, %	17,4	23,1	38,7
Bloqueadores do receptor da angiotensina, %	26,1	38,5	32,3
Anticoagulantes, %	39,1	42,3	48,4
Diuréticos, %	30,4	61,5	67,7
Antidiabéticos, %	43,5	30,8	45,2
Inibidores da HMG-CoA redutase, %	47,8	46,2	51,6
Quelantes de fosfato, %	0,0	0,0	16,1

ECA: enzima conversora da angiotensina; HMG-CoA redutase: 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase.

Foram realizadas as dosagens dos biomarcadores de inflamação (MCP-1, IL-8, VCAM-1s, ICAM-1s e PCR-US) no soro dos pacientes por ELISA. Houve correlação significativa ente MCP-1 vs VCAM-1s ( $P < 0,01$ ;  $\rho = 0,277$ ), MCP-1 vs TFG ( $P < 0,001$ ;  $\rho = -0,289$ ) e VCAM-1s vs TFG ( $P < 0,0001$ ;  $\rho = -0,414$ ) (TABELA 5).

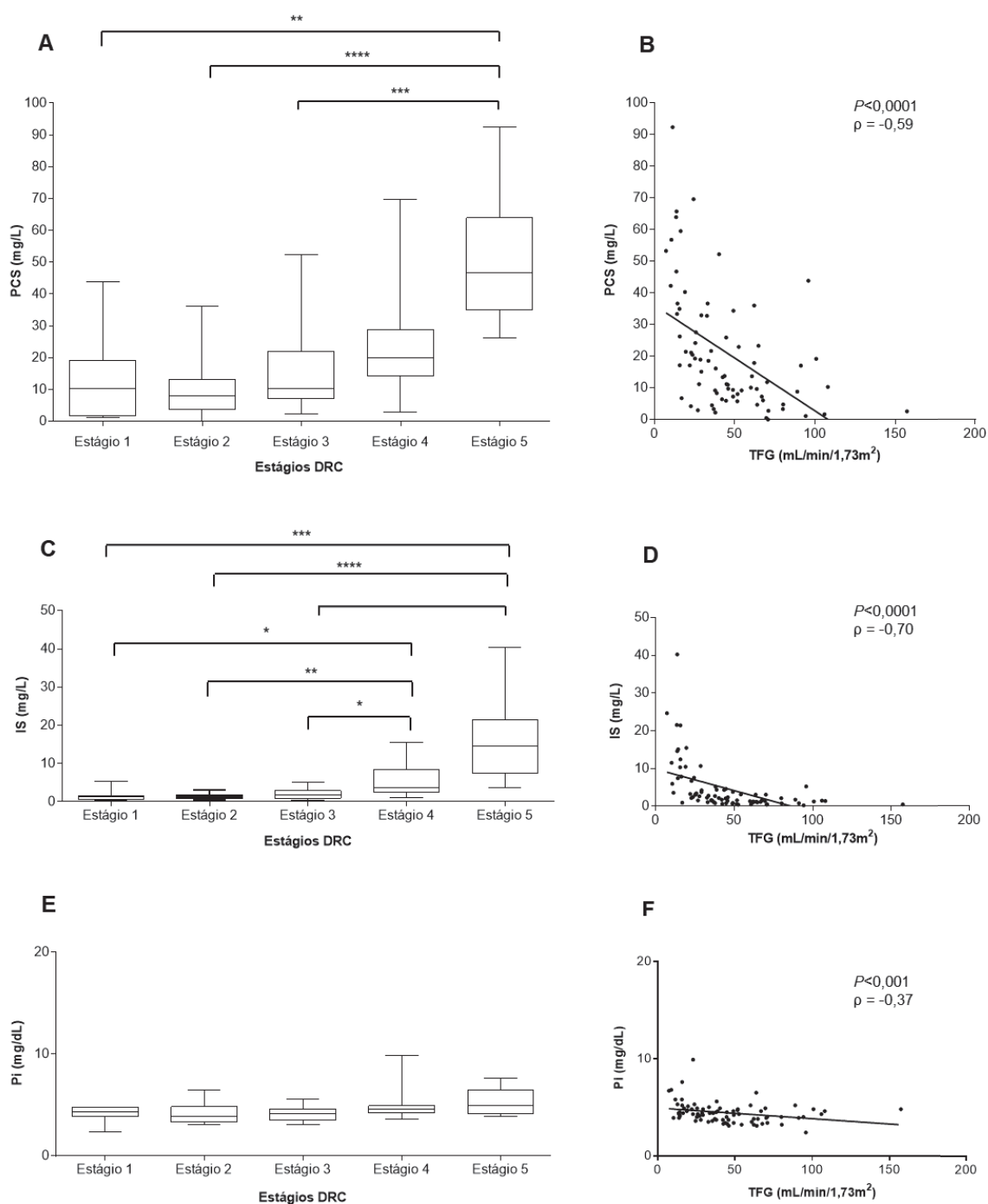
**TABELA 5 – CORRELAÇÃO DE QUIMIOCINAS (MCP-1 E IL-8), MOLÉCULAS DE ADESÃO SOLÚVEIS (ICAM-1s E VCAM-1s) e PCR-US**

	MCP-1		IL-8		ICAM-1s		VCAM-1s		PCR-US	
	$\rho$	$P$	$\rho$	$P$	$\rho$	$P$	$\rho$	$P$	$\rho$	$P$
MCP-1	-		NS		NS		0,28	<0,01	NS	
IL-8	NS		-		NS		NS		NS	
ICAM-1s	NS		NS		-		0,54	<0,01	NS	
VCAM-1s	0,28	<0,01	NS		0,54	<0,01	-		NS	
PCR-US	NS		NS		NS		NS		-	
TFG	-0,29	<0,001	NS		NS		-0,41	<0,0001	-0,29	<0,01

NS: não significativo; MCP-1: *monocyte chemotactic protein-1*; IL-8: *interleukin-8*; VCAM-1s: *vascular cell adhesion protein-1* solúvel, ICAM-1s: *intercellular adhesion molecule 1* solúvel; PCR-US: proteína C reativa ultrasensível; TFG: taxa de filtração glomerular.

## 5.2 DISTRIBUICAO DOS NIVEIS SÉRICOS DE TOXINAS URÊMICAS E CORRELAÇÃO COM A TFG

Foram realizadas as dosagens das toxinas PCS e IS por HPLC e Pi por método colorimétrico. Houve correlação significativa entre a TFG com PCS ( $P < 0,0001$ ;  $\rho = -0,5934$ ), TFG com IS ( $P < 0,0001$ ;  $\rho = -0,6994$ ) e TFG com Pi ( $P < 0,001$ ;  $\rho = -0,3675$ ) (FIGURA 4).

**FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DAS TOXINAS E CORRELAÇÃO COM A TFG**

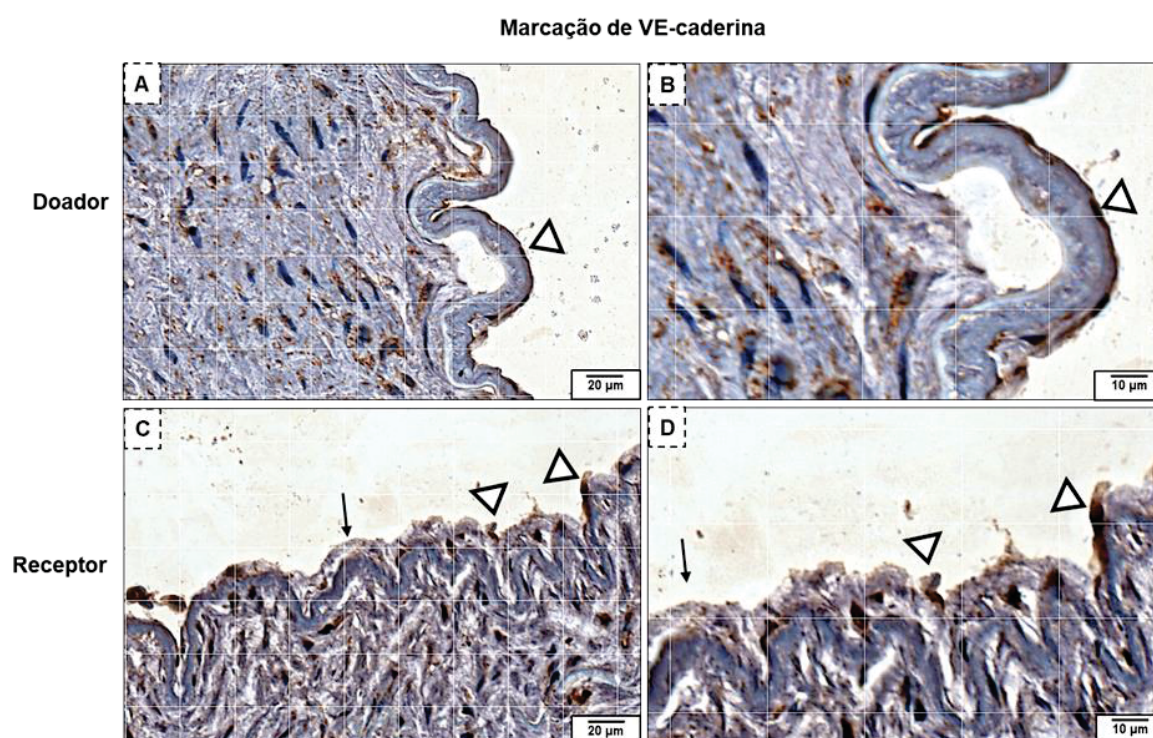
**NOTA – Distribuição das concentrações de PCS, IS e Pi em relação aos estágios da DRC e correlação de PCS, IS e Pi com as TFG.** A. *Box plots* demonstrando distribuição de níveis séricos de PCS de acordo com os estágios de DRC. B. Relação entre níveis séricos de PCS e TFG em pacientes com DRC ( $P < 0,0001$ ;  $\rho = -0,5984$ ). C. *Box plots* demonstrando distribuição de níveis séricos de IS de acordo com os estágios de DRC. D. Relação entre níveis séricos de IS e TFG em pacientes com DRC ( $P < 0,0001$ ;  $\rho = -0,6994$ ). E. *Box plots* demonstrando distribuição de níveis séricos de Pi de acordo

com os estágios de DRC. F. Relação entre níveis séricos de Pi e TFG em pacientes com DRC ( $P < 0,001$ ;  $\rho = -0,3675$ ).

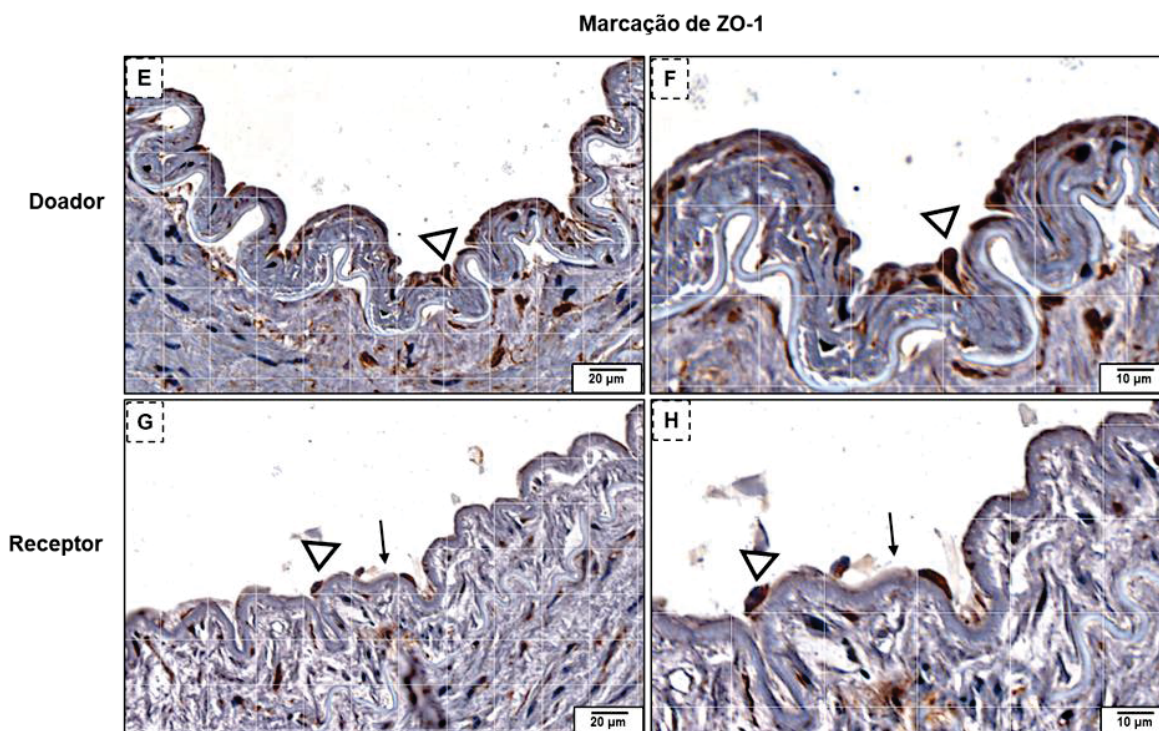
### 5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 EM ARTÉRIAS ILÍACAS E RENAIAS

As proteínas VE-caderina e ZO-1 foram imunomarcadas nas artérias dos doadores (controle) e receptores. Nas artérias de doadores foi observado um endotélio íntegro e contínuo, com forte marcação para VE-caderina e ZO-1. Por outro lado, foi observado nas artérias de pacientes receptores (DRC em estágios severos), falhas no endotélio, características de lesão endotelial e dano estrutural (FIGURA 5).

**FIGURA 5 – EXPRESSÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 EM ARTÉRIAS ILÍACAS E RENAIAS**



**NOTA - Expressão da VE-caderina em artérias ilíacas e renais.** Artéria de doador (A e B) e receptor (C e D). A ponta da seta indica monocamada inteira de células endoteliais e a seta preta indica falhas na monocamada endotelial. A e C - aumento de 20X e B e D - aumento de 40X.

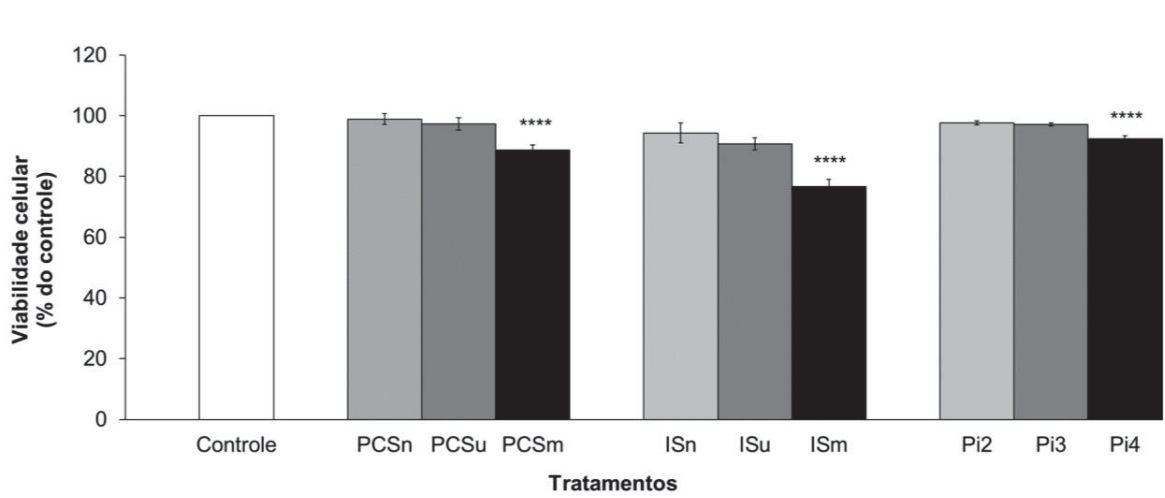


**NOTA - Expressão de ZO-1 em artérias ilíacas e renais.** Artéria de doador (E e F) e receptor (G e H). A ponta da seta indica monocamada inteira de células endoteliais e a seta preta indica falhas na monocamada endotelial. E e G - aumento de 20X e F e H - aumento de 40X.

## ESTUDO *IN VITRO*

### 5.4 VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular das células endoteliais foi avaliada após tratamento com as toxinas urêmicas PCS e IS concentrações normais, urêmicas e máxima urêmica e Pi 2 mM, 3 mM e 4 mM. Para tanto, as células foram tratadas com MTT por 24 h a 37°C, sendo a leitura da absorbância determinada a 570 nm. A viabilidade das células tratadas somente com o meio de cultura (controle) foi considerada como 100%. Houve diminuição da viabilidade celular de modo significativo somente nas células tratadas PCS e IS nas concentrações máximas urêmicas e com Pi 4mM ( $P < 0,0001$ ) em relação ao controle (FIGURA 6). Não houve diminuição da viabilidade celular de modo significativo nas células tratadas com os *pools* urêmicos (GI, II e III) em relação ao controle.

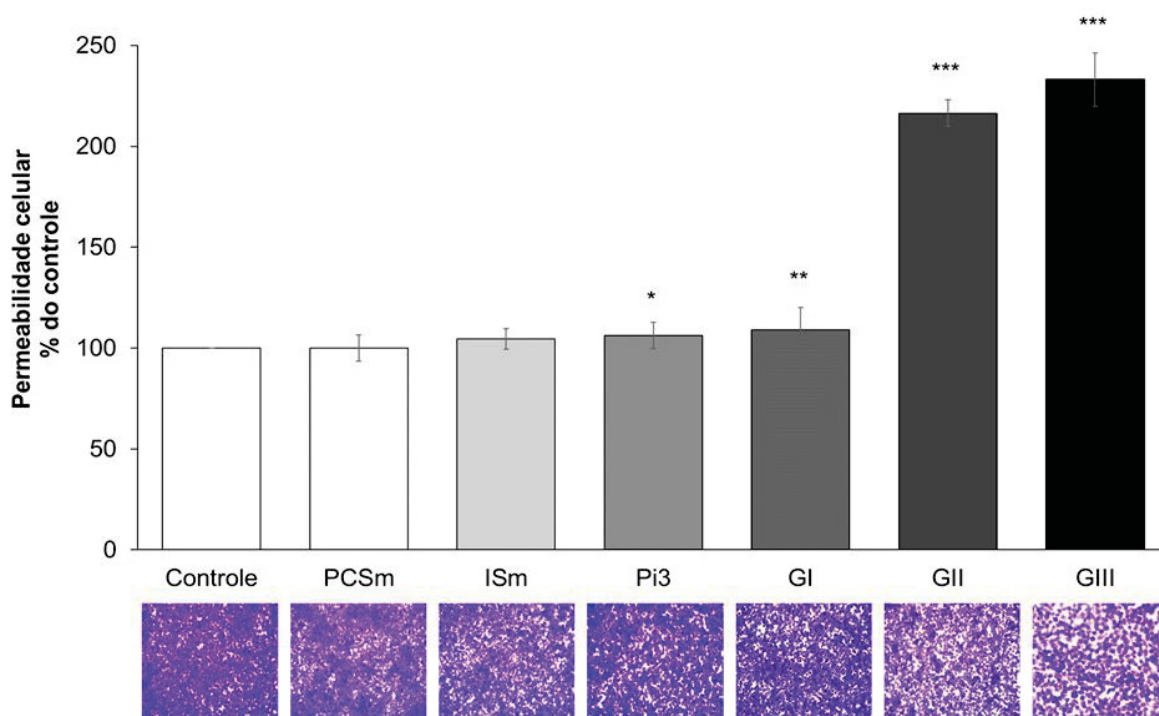
**FIGURA 6 – EFEITO DAS TOXINAS UREMICAS PCS, IS E Pi NA VIABILIDADE CELULAR**

**NOTA – Análise da viabilidade celular após tratamento com PCS, IS e Pi.** PCSn, ISn: concentrações normais; PCSu, ISu: concentrações mínimas urêmicas; PCSm, ISm: concentrações máximas urêmicas e Pi 2 mM, 3 mM e 4 mM. \*\*\*\* $P < 0,0001$  controle vs PCSm; controle vs ISm e controle vs Pi4.

## 5.5 PERMEABILIDADE CELULAR

A permeabilidade celular foi avaliada após tratamento das células com as toxinas nas suas concentrações máximas urêmicas (PCSm, ISm), com Pi3 e *pools* urêmicos (GI, II e III). A quantidade de FITC que transpassou a membrana do *transwell* é diretamente proporcional ao aumento dos espaços intercelulares, ou seja, da permeabilidade celular. A membrana do *transwell* foi corada com cristal violeta e observada por microscopia de luz, para avaliar os espaços intercelulares. Houve um aumento significativo da permeabilidade celular das células tratadas com Pi3 ( $P < 0,05$ ), GI ( $P < 0,01$ ) e GII e III ( $P < 0,001$ ), em relação ao controle (células tratadas somente com o meio de cultura), porém não houve correlação significativa no tratamento com PCSm e ISm (FIGURA 7).

**FIGURA 7 – EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS E POOLS URÊMICOS NA PERMEABILIDADE CELULAR**



**NOTA – Efeito das toxinas urêmicas (PCS, IS e Pi) e pools urêmicos na permeabilidade celular.** Controle: células tratadas somente com o meio de cultura. \* $P < 0,05$  controle vs. Pi; \*\* $P < 0,01$  controle vs. GI; \*\*\* $P < 0,001$  controle vs. GII e GIII.

## 5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL POR MEV

As células controle e expostas aos diferentes tratamentos (PCSm, ISm e Pi3) e pools urêmicos (GI, II e III) foram fixadas, desidratadas, submetidas ao ponto crítico e metalização, para posterior análise por MEV (FIGURA 8). Nas imagens 8A, 8B, 8C e 8D observa-se um padrão morfológico e ultra estrutural de células endoteliais humanas mantidas somente com meio de cultura, as quais foram utilizadas como controle. Foi avaliado na imagem panorâmica (imagem 8A) que essas células apresentam diferentes padrões morfológicos, estando em confluência. As células encontram-se espalhadas e aderidas ao substrato, respeitam a inibição de contato, formando uma monocamada, característica de endotélio. Observam-se ainda, poucas células arredondadas e material particulado por sob o cultivo celular, semelhantes a debris celulares. Em maior magnitude (imagens 8B, 8C e 8D) observa-se que essas células

mantêm contato íntimo de adesão intercelular e emitem prolongamentos membranares de percepção, característicos de filopódios. Na superfície do corpo celular, observa-se material particulado semelhante a produtos de secreção, bem como debris celulares. No controle positivo (imagens 8E, 8F, 8G e 8H) células tratadas com DMSO 4% as células se mantiveram aderidas ao substrato, em menor número, estando subconfluentes. Ainda, as células apresentaram comprometimento de sua integridade morfológica, com nítidas perfurações e rompimentos de sua membrana plasmática. Observa-se ainda, nas imagens de maior magnitude, perfurações nesta membrana, bem como inúmeros debris celulares na superfície do corpo celular e substrato. Estas células perdem a capacidade de se manter em monocamada, diminuem seu grau de espraiamento celular e adesão ao substrato (lamínula), apresentando morfologias distintas de uma célula endotelial. O DMSO induziu danos morfológicos e ultra estruturais, com perda de viabilidade celular, características de células inviáveis.

Nas imagens 8I, 8J, 8K e 8L observam-se células expostas ao PCSm. Na imagem de menor magnitude (imagem 8I) há um maior número de células arredondadas e algumas destas, quando espraiadas, parecem diminuir o tamanho do corpo celular. As células apresentam-se aderidas e espraiadas sob o substrato, mantendo as áreas de confluência celular. Nas imagens de maior magnitude (imagens 8J, 8K e 8L), observam-se alguns pontos em que as células perderam coesividade (adesão intercelular). É possível observar debris celulares e projeções membranares. Na imagem 8K, observa-se detalhe da área de confluência celular, em que um grupo de células mantém inibição de contato, adesão intercelular. Morfologicamente estas células mantiveram padrão semelhante ao do controle e somente algumas células apresentaram perda de adesão intercelular.

Nas imagens 8M, 8N, 8O e 8P observam-se células expostas ao ISm. Na imagem panorâmica, observa-se de forma evidente, um maior espaçamento entre as células, com poucas áreas de confluência celular. Algumas dessas células mudaram seu padrão morfológico e passaram a apresentar uma morfologia de células alongadas, com longas expansões afiladas do corpo celular. Esta população de células apresenta-se menos aderidas ao substrato, são células que nitidamente perderam a capacidade de espraiamento celular. Além disso, há um maior número de células

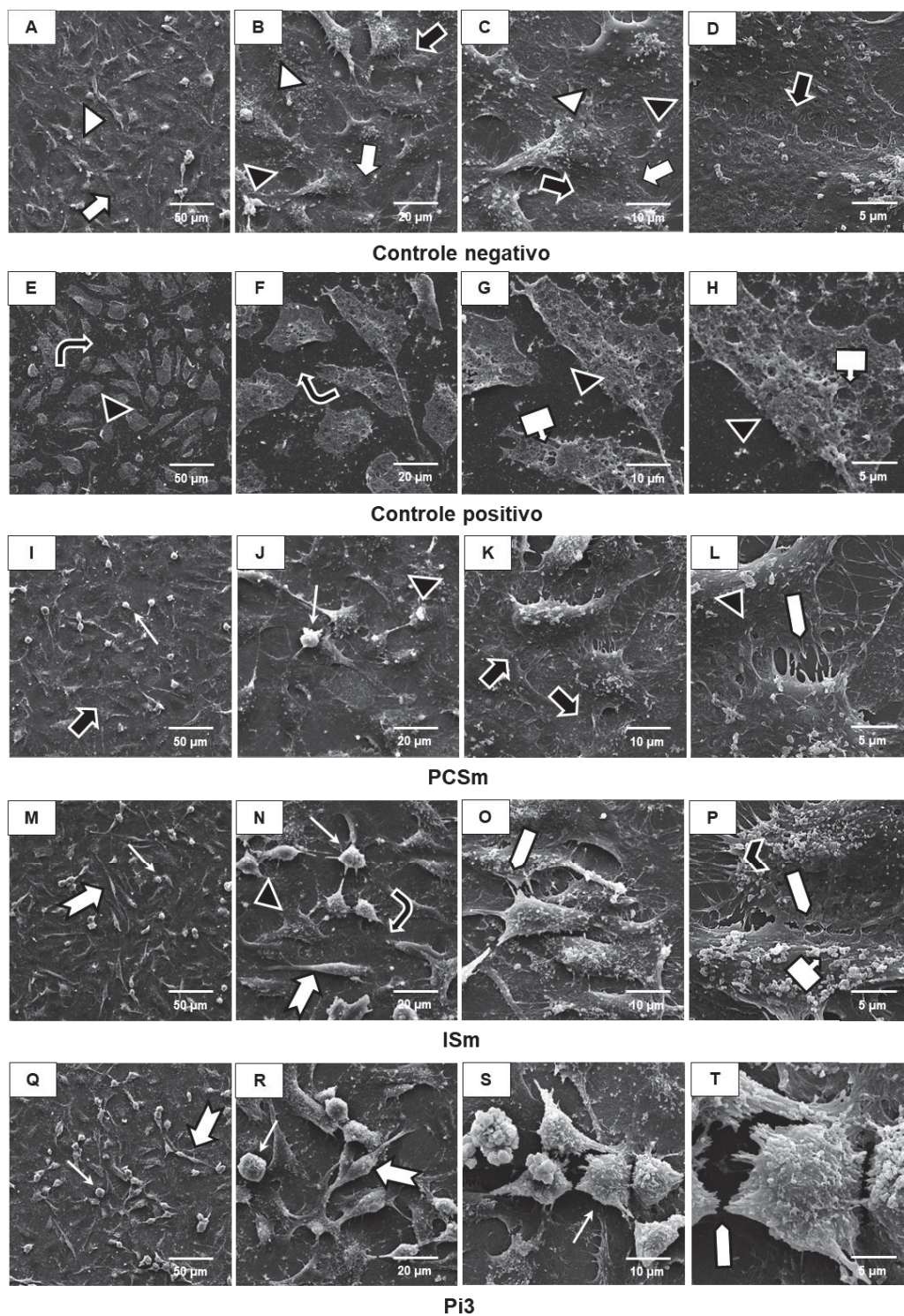
arredondadas, isoladas ou mantendo adesão celular, característica de células em proliferação ou mecanismo de morte. Um terceiro padrão morfológico de células aderidas, espreiadas, mantendo adesão intercelular semelhante ao padrão descrito para células controle, também pode ser observado, em menor número. Nas imagens de maior magnitude (imagens 8N, 8O e 8P), fica evidente os achados descritos na imagem panorâmica (imagem 8M), com células arredondadas, perda de adesividade intercelular e células alongadas. Observou-se ainda, maior número de expansões de percepção bordeando todo o corpo celular, os filopódios. Na imagem O, observam-se células com menor expansão do corpo celular, com característica de perda de adesão intercelular, material particulado e também vesicular. Na imagem 8P, observa-se comprometimento de membrana plasmática, com perfurações.

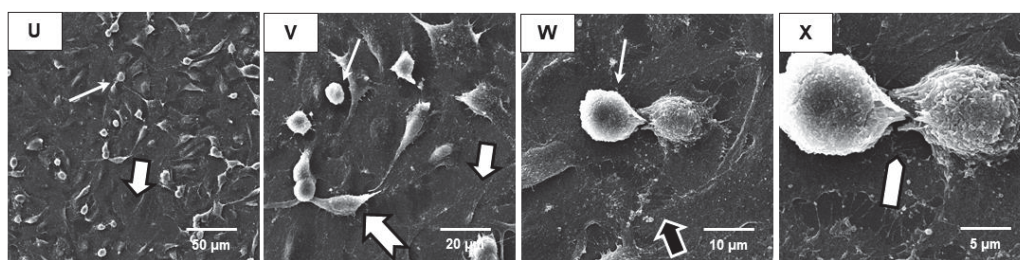
Nas imagens 8Q, 8R, 8S e 8T observam-se células expostas ao Pi3. Percebe-se que há uma população de células que perderam a capacidade de adesão e espreiamento celular, mantendo-se arredondadas, sugerindo sofrimento celular. Além disso, observam-se células com menor tamanho, com morfologia alongada, emitindo expansões afiladas do corpo celular, perda de adesividade ao substrato, bem como adesão intercelular. Em maior magnitude, nas imagens 8R, 8S e 8T, observa-se que mesmo as células mais aderidas e espreiadas ao substrato, as que se mantem mais justapostas, perderam a adesão intercelular. Estas células emitiram projeções membranares por sob o cultivo e sob o corpo celular, com debris celulares e material particulado, com menor adesão intercelular quando comparadas ao controle.

Dentre as três toxinas testadas, o Pi foi a toxina que induziu maior perda de adesão intercelular e alteração do padrão morfológico e ultra estrutural das células. As células expostas ao GI, nas imagens 8U, 8V, 8W e 8X, apresentaram padrão morfológico e ultra estrutural muito semelhante ao controle (imagem 8A). São células aderidas, espreiadas, estão em confluência, formando uma monocamada, mantendo inibição de contato. Nas imagens de maior magnitude (imagens 8V, 8W e 8X), elas mantiveram coesão intercelular. Observou-se ainda um grupo de células alongadas (afiladas). Somente quando comparadas ao controle, e fica nítido um maior número de células arredondadas.

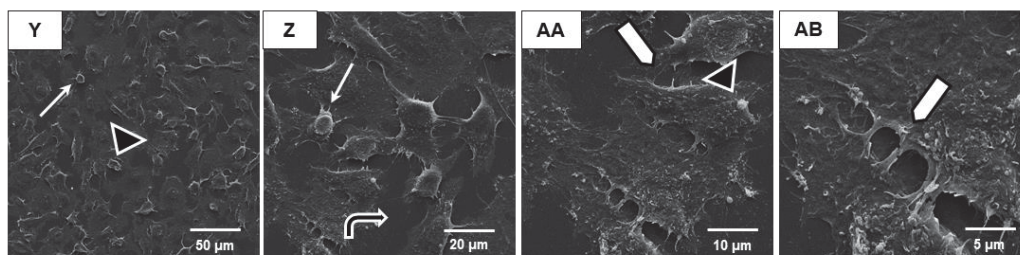
As imagens 8Y, 8Z, 8AA e 8AB correspondem a células expostas ao GII e as imagens 8AC, 8AD, 8AE e 8AF correspondem a células expostas ao GIII. Foi possível observar que ambos os tratamentos induziram um padrão morfológico distinto do controle, apresentando características semelhantes entre si, além de um menor número de células, sendo a maioria destas arredondadas e menos espreiadas ao substrato, ou seja, estão somente adsorvidas a este. As células estavam subconfluentes, a parte central do corpo manteve íntimo contato com o substrato, mas a borda do corpo celular perdeu adesão a este (adsorção). São células que estavam migrando e se desprendendo do substrato. Morfologicamente, foram observadas células com características de citotoxicidade, especialmente para o GIII, mantendo poucas áreas de contato intercelular. Essas células, pela morfologia e ultraestrutura, provavelmente estão com perda de viabilidade celular e em sofrimento.

**FIGURA 8 – ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DAS JUNÇÕES INTERCELULARES EM CELULAS ENDOTELIAIS HUMANAS APOS TRATAMENTO COM TOXINAS UREMICAS E POOLS UREMICOS**

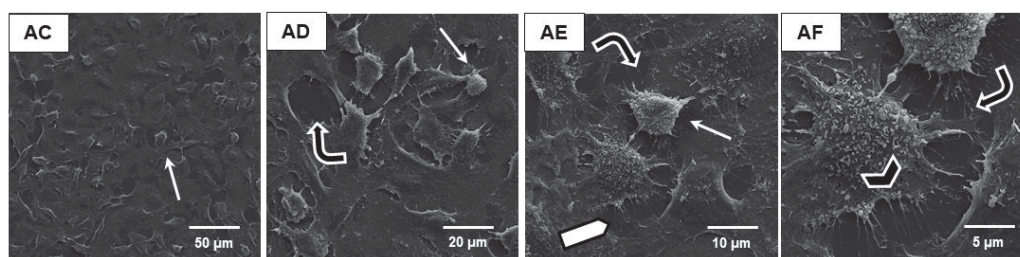




GI



GII



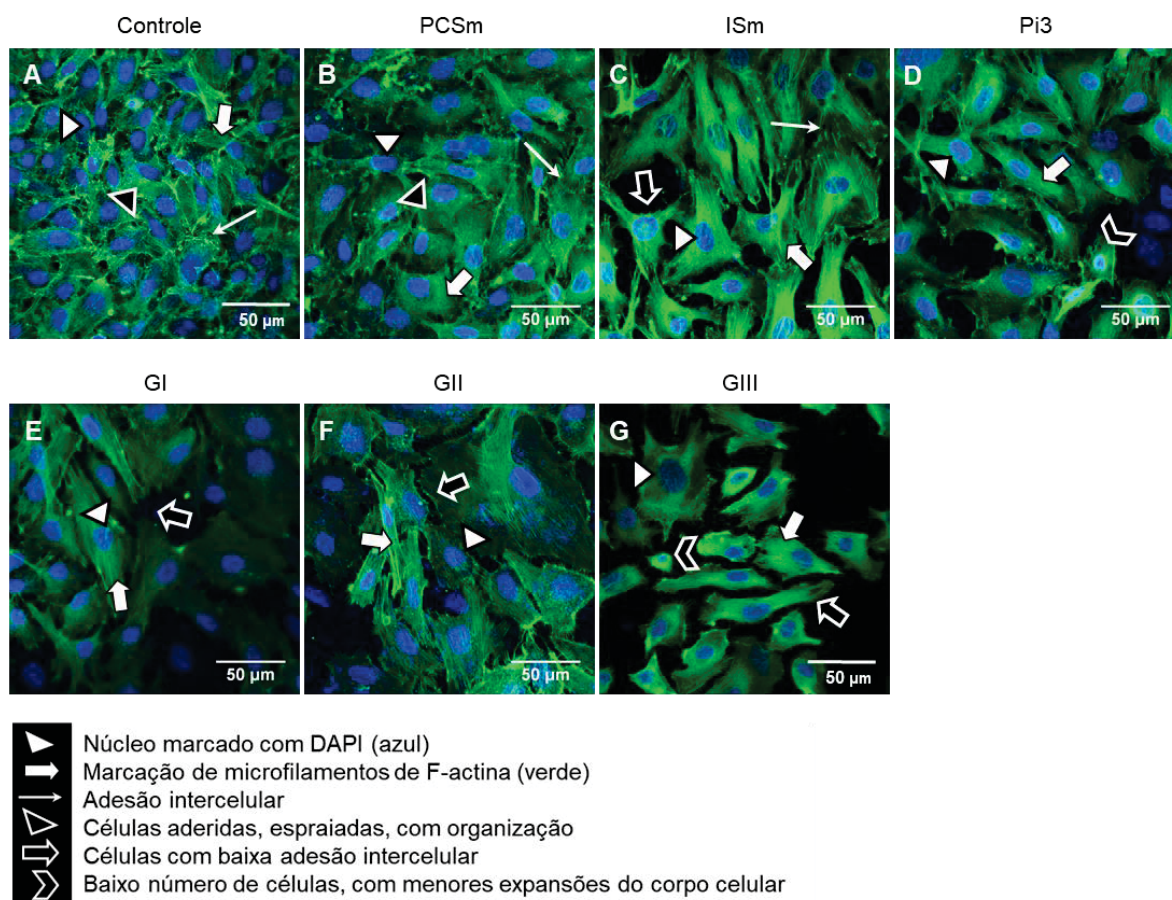
GIII

	Esta cabeça de seta identifica um padrão morfológico de células em confluência
	Esta seta identifica células espalhadas e aderidas ao substrato, formando uma monocamada
	Esta seta identifica células arredondadas
	Esta cabeça de seta indica material particulado, semelhantes a debris celulares
	Esta seta indica adesão intercelular
	Esta cabeça de seta identifica prolongamentos membranares de percepção (filopódios)
	Esta seta identifica menor número de células (subconfluentes)
	Esta seta identifica perfurações e rompimentos da membrana plasmática
	Esta seta identifica células perdendo coesividade (adesão intercelular)
	Esta seta identifica células afiladas (mais alongadas)

**NOTA – Análise morfológica e ultraestrutural por MEV de células endoteliais humanas.** A, B, C e D - Controle (células tratadas com o meio de cultura). E, F, G e H - Células tratadas com DMSO 4%. I, J, K e L - células tratadas com PCSm. M, N, O e P - Células tratadas com ISm. Q, R, S e T - Células tratadas com Pi3. U, V, W e X - Células tratadas com GI. Y, Z, AA e AB - Células tratadas com GII. AC, AD, AE e AF - Células tratadas com GIII. A, E, I, M, Q, U, Y e AC - aumento de 1.000X. B, F, J, N, R, V, Z, AD - aumento de 3.000X. C, G, K, O, S, W, AA e AE - aumento de 6.000X. D, H, L, P, T, X, AB e AF - aumento de 15.000X.

## 5.7 EXPRESSAO DE MICROFILAMENTOS DE F-ACTINA

Na FIGURA 9 empregou-se a microscopia confocal a laser para detecção de microfilamentos de actina, onde observa-se o núcleo corado com DAPI (azul) e microfilamentos de actina evidenciados pela presença de uma sonda faloidina (verde) em todas as imagens. Na imagem 9A, nas células controle (mantidas somente em meio de cultura) justapostas e núcleo central, além de microfilamentos formando fibras de estresse por todo a extensão do corpo celular. Pode-se observar ainda que há uma grande quantidade de células mantendo padrão de organização com adesão intercelular. Na imagem 9B, as células foram tratadas com PCSm. Observa-se o mesmo padrão apresentado para as células controle (imagem 9A), com células aderidas, espaiadas, em confluência e justapostas, com núcleo central, e com organização do citoesqueleto de actina, mantendo adesão intercelular. Na imagem 9C, células tratadas com ISm, pode-se observar células menos justapostas, havendo maior espaço intercelular, onde as células estão mais alongadas, com maior expansão do comprimento do corpo celular. A proporção entre núcleo e citoplasma está diferente quando comparado ao controle (imagem 9A). Esse tratamento organiza os microfilamentos de actina em maior comprimento e extensão, tornando as células mais alongadas ou afiladas, emitindo projeções irregulares do corpo celular. A imagem 9D evidencia células expostas ao Pim, onde há um menor número de células, com menor expansão do corpo celular, menos justapostas, com morfologias distintas, característico de células em sofrimento. Um padrão semelhante pode ser observado após tratamento das células com o GIII (imagem 9G). As imagens 9E e 9F evidenciam células tratadas com os GI e GII, respectivamente, onde ambas apresentam padrão morfológico semelhantes entre si, onde observa-se as células parcialmente confluentes, sem uma íntima justaposição, e apresentam morfologias distintas, estando aderidas e espaiadas por sob o substrato. As imagens 9D e 9G (Pim e GIII, respectivamente), foram os tratamentos que evidenciaram maior comprometimento no grau de adesão, com espaiamento e justaposição das células.

**FIGURA 9 – MARCAÇÃO DE F-ACTINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS**

**NOTA – Análise da expressão de F-actina por marcação de sonda.** Células controle (somente tratadas com meio de cultura) (A), PCSm (B), ISm (C), Pi3 (D), GI (E), GII (F) e GIII (G) por 24 h. Todas as imagens estão no aumento de 60X.

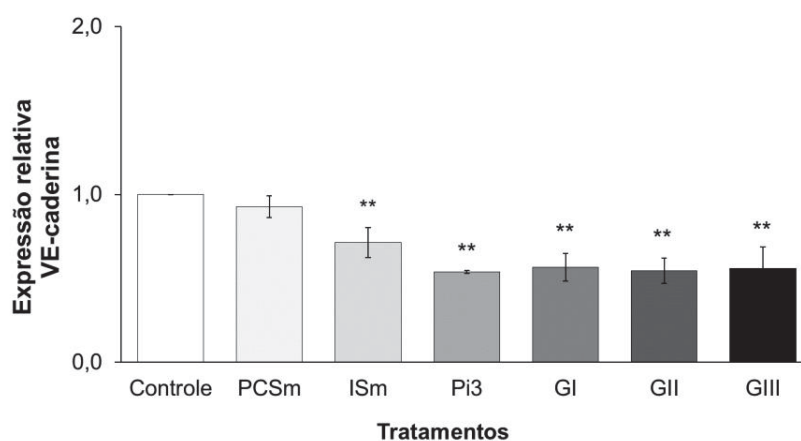
## 5.8 EXPRESSÃO GÊNICA DE VE-CADERINA, ZO-1, P120, β-CATENINA E VINCULINA

Após extração do RNA total e análise da sua concentração e pureza, o RNA foi convertido a cDNA, o qual foi submetido a RT-PCR e posteriormente ao RT-qPCR, juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores, utilizando o HPRT como gene normalizador.

Na expressão gênica de VE-caderina, houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) em células tratadas com as toxinas ISm, Pi3 e com os *pools* urêmicos (GI, II e III) quando

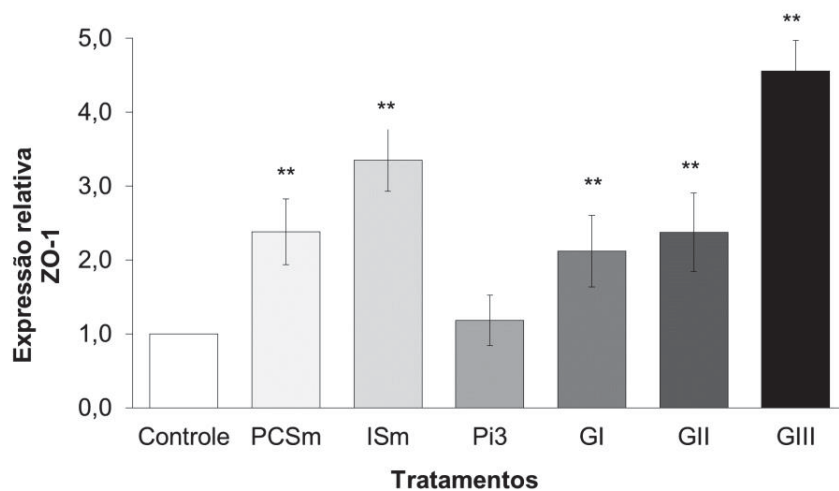
comparados ao controle. Não houve diferença significativa nas células tratadas com PCSm (FIGURA 10).

**FIGURA 10 - EFEITO DAS TOXINAS E POOLS URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE VE-CADERINA**



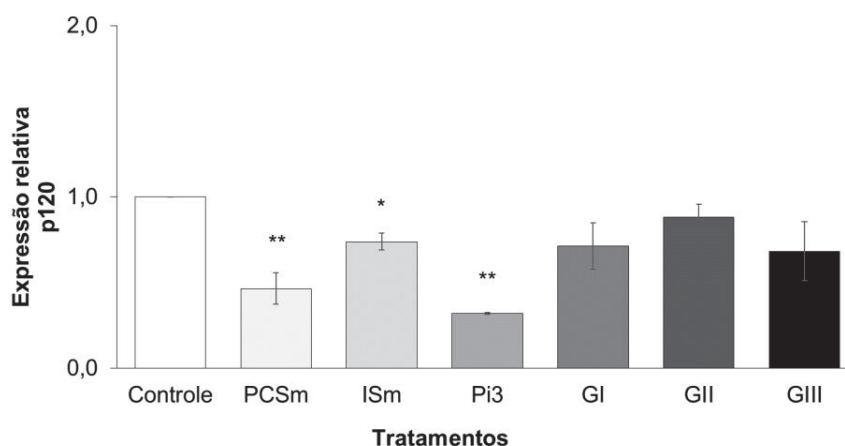
**NOTA – Expressão gênica de VE-caderina.** Foi utilizado o gene HPRT como normalizador. A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Controle: células tratadas somente com o meio de cultura. \*\* $P < 0,01$  controle vs ISm, Pi3, GI, GII e GIII.

Na expressão gênica de ZO-1, houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) nas células tratadas com as toxinas PCSm, ISm e com os *pools* urêmicos (GI, II e III) quando comparados ao controle. Não houve diferença significativa nas células tratadas com Pi3 (FIGURA 11).

**FIGURA 11** - EFEITO DAS TOXINAS E *POOLS* URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ZO-1

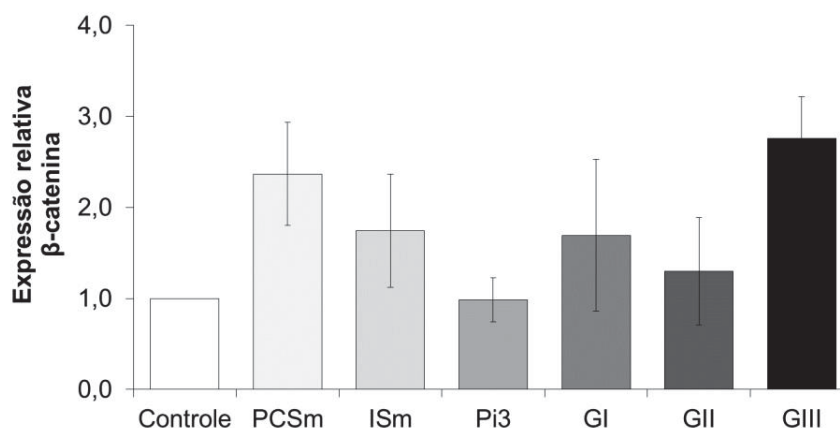
**NOTA – Expressão gênica de ZO-1.** Foi utilizado o gene HPRT como normalizador. A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Controle: células tratadas somente com o meio de cultura. \*\* $P < 0,01$  controle vs PCSm, ISm, GI, GII e GIII.

Na expressão gênica de p120, houve diferença significativa nas células tratadas com as toxinas PCSm e Pi3 ( $P < 0,01$ ) e ISm ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao controle. Não houve diferença significativa nas células tratadas com os *pools* urêmicos (GI, II e III) (FIGURA 12).

**FIGURA 12 - EFEITO DAS TOXINAS E POOLS URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE P120**

**NOTA – Expressão gênica de p120.** Foi utilizado o gene HPRT como normalizador. A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Controle: células tratadas somente com meio de cultura. \* $P < 0,05$  controle vs ISm; \*\* $P < 0,01$  controle vs PCSm e Pi3.

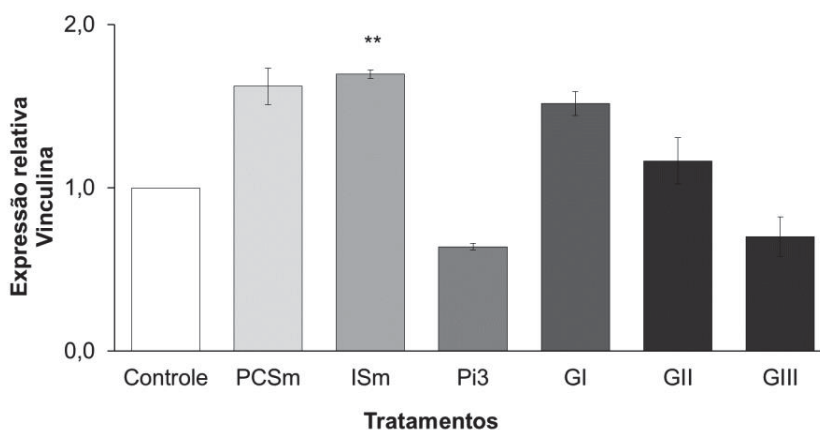
Na expressão gênica de  $\beta$ -catenina, não houve diferença com nenhum dos tratamentos empregados em relação ao controle (FIGURA 13).

**FIGURA 13 - EFEITO DAS TOXINAS E POOLS URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE  $\beta$ -CATENINA**

**NOTA – Expressão gênica de  $\beta$ -catenina.** Foi utilizado o gene HPRT como normalizador. A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Controle: células tratadas somente com meio de cultura. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

Na expressão gênica de vinculina, houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) somente nas células tratadas com ISm (FIGURA 14).

**FIGURA 14 - EFEITO DAS TOXINAS E POOLS URÊMICOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE VINCULINA**

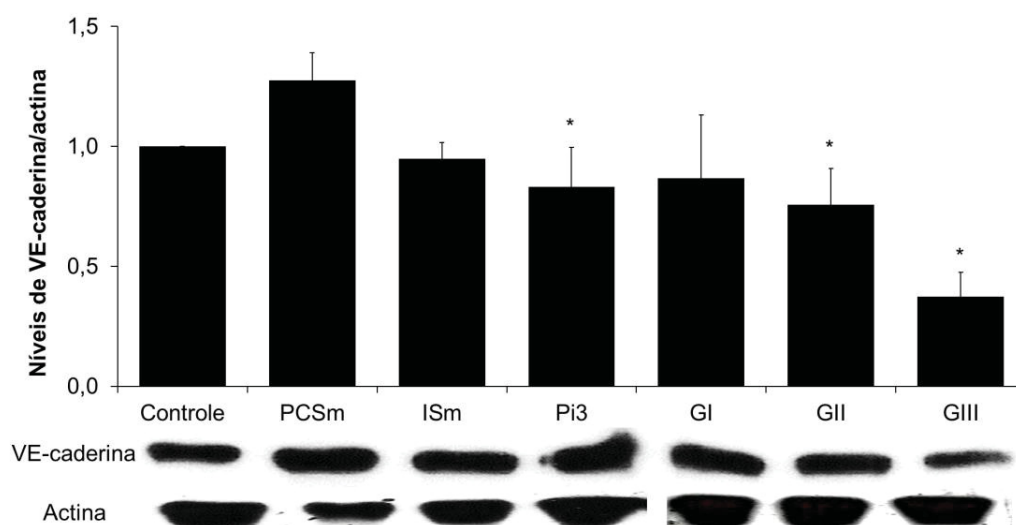


**NOTA – Expressão gênica de vinculina.** Foi utilizado o gene HPRT como normalizador. A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Controle: células tratadas somente com meio de cultura. \* $P < 0,05$  controle vs ISm; \*\* $P < 0,01$  controle vs PCSm e Pi3.

## 5.9 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VE-CADERINA

Para estudar o papel do ambiente urêmico na ruptura de AJ, as células endoteliais foram tratadas com toxinas em concentrações máximas urêmicas (PCSm e ISm), Pi a 3 mM e 10% de *pools* urêmicos (GI, GII e GIII). Houve diminuição significativa na expressão de células tratadas com Pi, GII e GIII ( $P < 0,05$ ) (FIGURA 15).

**FIGURA 15 – EXPRESSÃO DA PROTEÍNA VE-CADERINA**

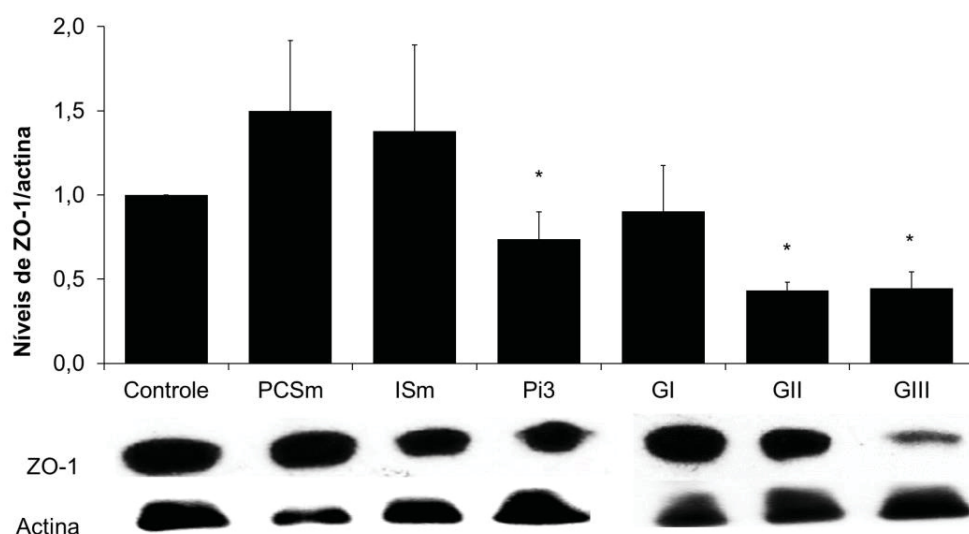


**NOTA – Expressão da proteína VE-caderina.** A intensidade de marcação da banda foi avaliada por western blot e quantificada por Software Image Studio Lite 5.0. Foi utilizado como controle a proteína actina. Foram realizados 3 experimentos independentes; \* $P < 0,05$ .

#### 5.10 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ZO-1

Para estudar o papel do ambiente urêmico na expressão da proteína ZO-1, as células endoteliais foram tratadas com toxinas em concentrações máximas urêmicas (PCSm e ISm), Pi a 3 mM e *pools* urêmicos a 10% (GI, GII e GIII). A expressão da proteína ZO-1 diminuiu significativamente ( $P < 0,05$ ) em células tratadas com Pi3, GII e GIII ( $P < 0,05$ ) (FIGURA 16), diferente da expressão gênica, sugerindo uma regulação pós-transcricional de ZO-1.

**FIGURA 16 - EXPRESSÃO DA PROTEINA ZO-1**

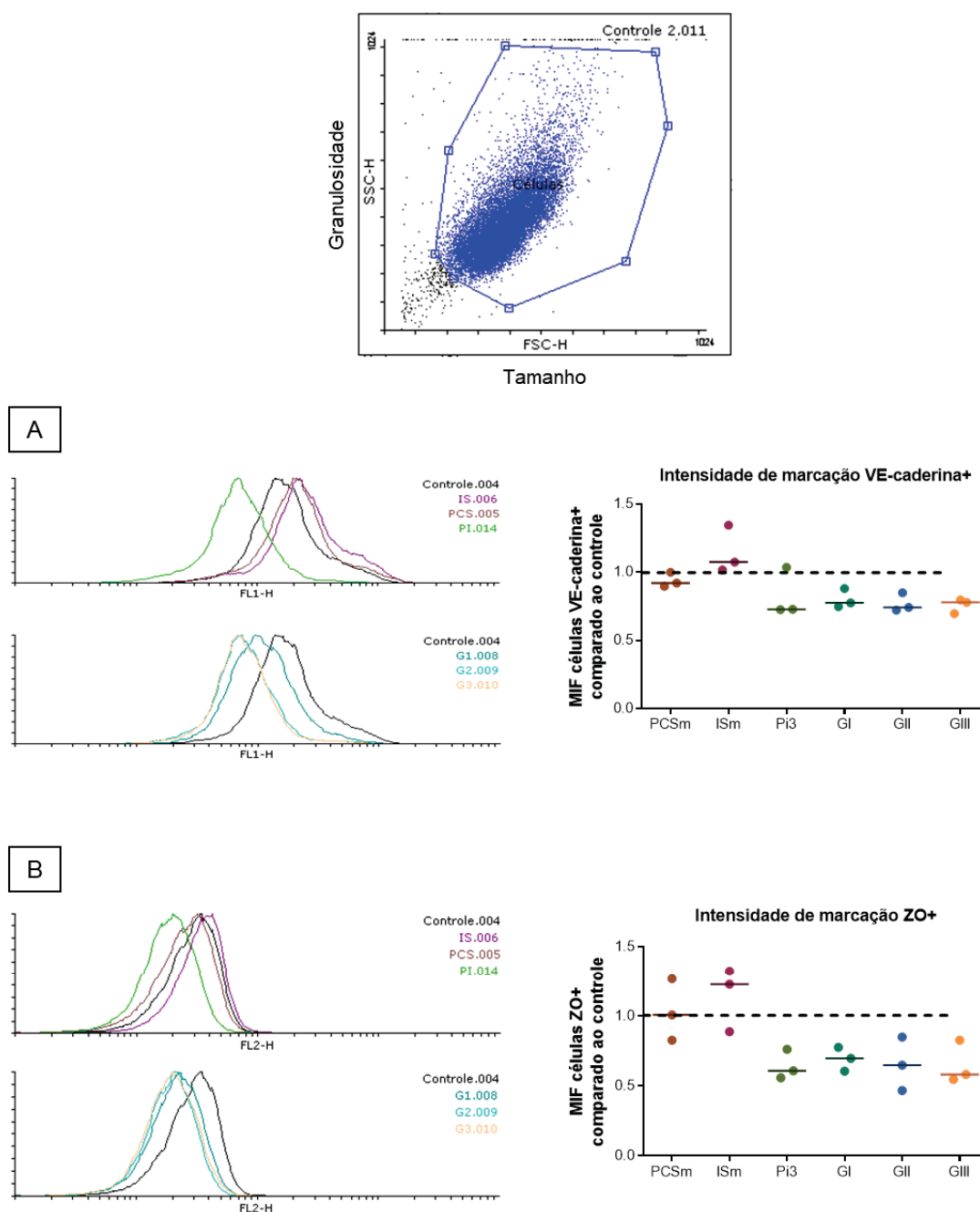


**NOTA – Expressão da proteína ZO-1.** A intensidade de marcação da banda foi avaliada por western blot e quantificada por Software Image Studio Lite 5.0. Foi utilizado como controle a proteína actina. Foram realizados 3 experimentos independentes; \* $P < 0,05$ .

### 5.11 EXPRESSÃO DE VE-CADERINA E ZO-1 POR FACS

Após tratadas e fixadas, as células endoteliais foram submetidas a imunomarcação para VE-caderina e ZO-1. Essa marcação foi mensurada por FACS (*Fluorescence activated cell sorter*). A intensidade de marcação de VE-caderina e ZO-1 foi reduzida somente nas células tratadas com Pi3 e com os *pools* urêmicos (GI, GII e GIII) (FIGURA 17).

FIGURA 17 - EXPRESSAO DE VE-CADERINA E ZO-1 POR FACS

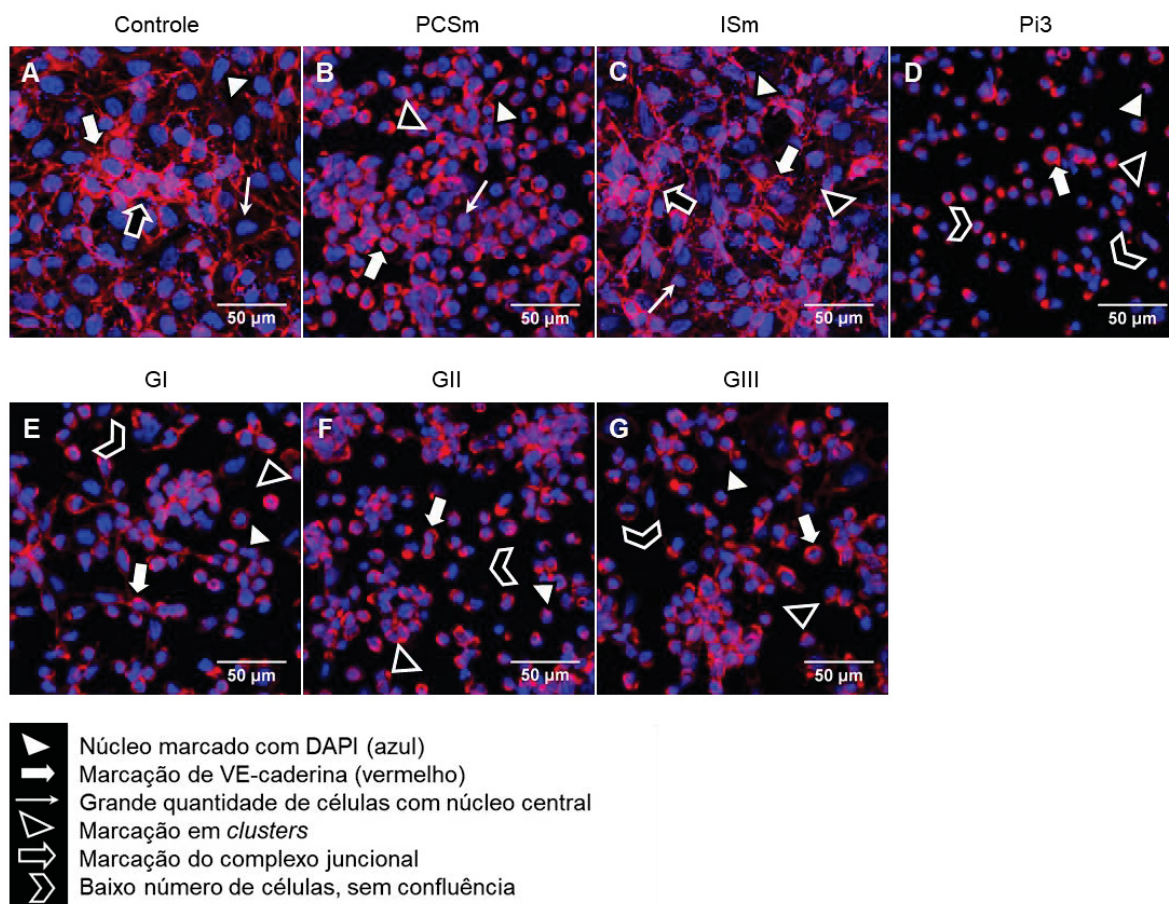


**NOTA -** Imunomarcção de células endoteliais humanas tratadas com as toxinas urêmicas (PCS, IS e Pi) e *pools* urêmicos, para detecção de VE-caderina e ZO-1. Células imunomarcadas para VE-caderina (A) ou ZO-1 (B). A intensidade de fluorescência foi avaliada por FACS e quantificada utilizando o software Flowing 2. Os pontos representam a intensidade de fluorescência mediana (MFI) em comparação com cada controle experimental (linhas tracejadas). As barras representam a média de todos os valores para cada grupo. Foram realizados 3 experimentos independentes.

## 5.12 IMUNOMARCAÇÃO DE VE-CADERINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Na FIGURA 18 empregou-se microscopia confocal a laser para detecção da VE-caderina. Pode-se observar núcleo corado com DAPI (azul) e VE-caderina (vermelho) em todas as imagens. Na imagem 18A (células controles mantidas somente com o meio de cultura), observa-se grande quantidade de células em confluência, núcleo central e evidente. O padrão de marcação apresentado em algumas áreas apresenta-se de forma pontual (*clusters*) e um predomínio de marcação na superfície celular no limite entre adesão célula-célula, indicando padrão de marcação característico de complexo juncional, havendo uma maior marcação nas áreas de confluência. O mesmo padrão de marcação observado no controle, foi observado nas células tratadas com ISm (imagem 18C), da mesma forma a marcação apresenta-se mais intensa nas áreas de confluência celular. A imagem 18B, células tratadas com PCSm, também evidencia marcação positiva para VE-caderina, com padrão de marcação em *clusters*. Pode-se concluir que nas células controle, bem como nas tratadas com PCSm e ISm observam-se um grande número de células em confluência, semelhantes ao controle. Na imagem 18D, células tratadas com Pi, observa-se nitidamente um menor número de células por campo, inexistência de confluência celular, núcleos de menor tamanho (picnóticos), com características de células em sofrimento, marcação reduzida para VE-caderina e quando presente, somente em áreas restritas (*clusters*). Nas imagens 18E, 18F e 18G, observam-se células tratadas com GI, GII e GIII respectivamente, vê-se um padrão de marcação semelhantes entre si, na forma de *clusters*, lembrando o mesmo padrão de marcação das células tratadas com PCSm. O tratamento com Pi foi o que mais induziu sofrimento e lesão celular, levando a formação de núcleos picnóticos, menor número de células e reduzida marcação pontual para VE-caderina.

**FIGURA 18 – EXPRESSÃO POR IMUNOMARCAÇÃO DE VE-CADERINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS**



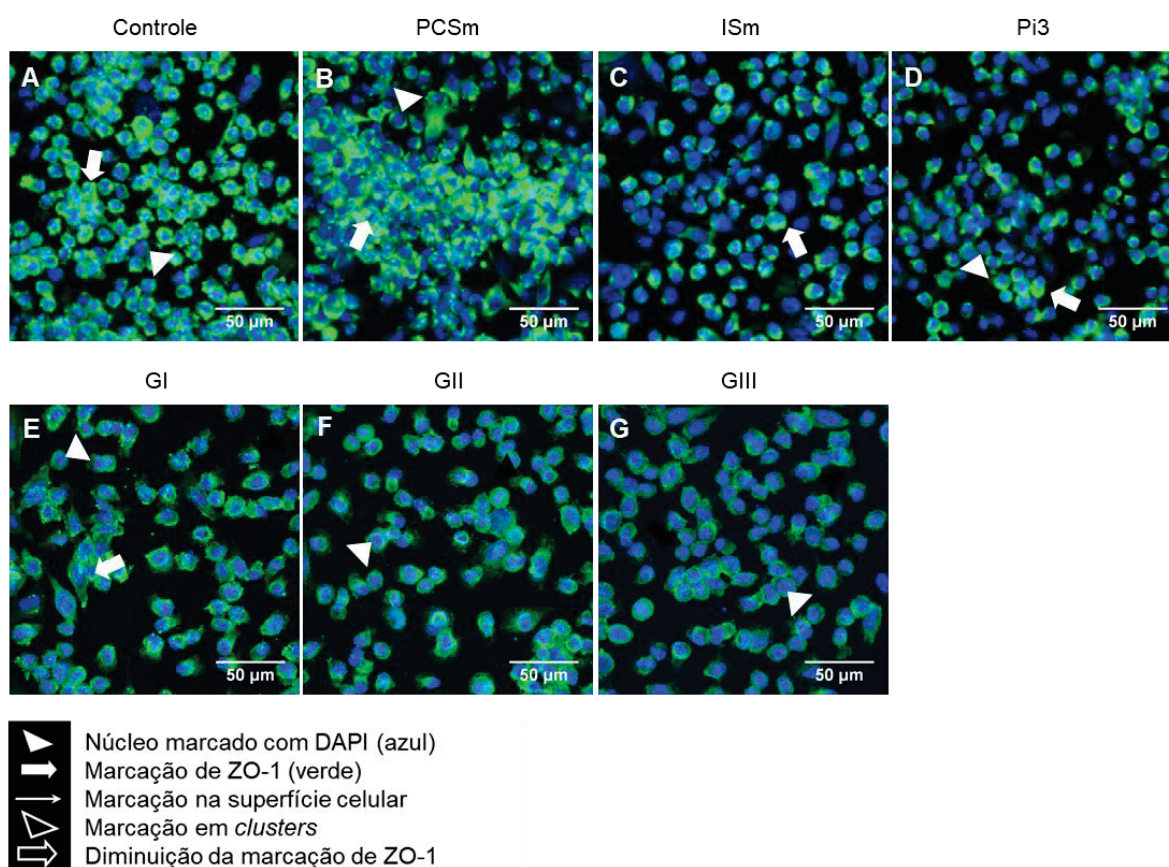
**NOTA – Análise da expressão de VE-caderina por imunofluorescência.** Células controle (tratadas com meio de cultura somente) (A), PCSm (B), ISm (C), Pi3 (D), GI (E), GII (F) and GIII (G) por 24 h. Todas as imagens estão no aumento de 60X.

### 5.13 IMUNOMARCAÇÃO DE ZO-1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Na FIGURA 19 empregou-se microscopia confocal a laser para detecção de ZO-1. Pode-se observar núcleo corado com DAPI (azul) e ZO-1 com anticorpo anti-ZO-1 (verde). Nas imagens 19A (células controles) e 19C (ISm), observa-se semelhança no padrão e na quantidade de marcação para ZO-1. Na imagem 19B, células expostas ao PCSm, o padrão apresenta-se semelhante ao controle, porém com maior intensidade de marcação. O padrão de marcação para células tratadas com

PCSm e ISm quando comparado ao do controle, apresenta predomínio de padrão de marcação de superfície em algumas áreas de forma mais agregadas (*clusters*). A diminuição da marcação está evidente nos tratamentos com Pi3 (imagem 19D) para os tratamentos com os *pools* GI (imagem 19E), GII (imagem 19F), GIII (imagem 19G), sendo semelhantes entre si. Observa-se nessa imagem que o tratamento com PCSm, seguido do ISm e posteriormente o controle parecem demonstrar maior intensidade de marcação de ZO-1, quando comparados com os demais tratamentos.

**FIGURA 19 – EXPRESSÃO POR IMUNOMARCAÇÃO DE ZO-1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS**



**NOTA – Análise da expressão de ZO-1 por imunofluorescência.** Células controle (somente tratadas com meio de cultura) (A), PCSm (B), ISm (C), Pi3 (D), GI (E), GII (F) e GIII (G) por 24 h. Todas as imagens estão no aumento de 60X.

## 6 DISCUSSÃO

O impacto do ambiente urêmico no endotélio sistêmico está intimamente relacionado à disfunção endotelial e ao aumento da permeabilidade vascular, o que predispõe a doenças cardiovasculares (CVD) em pacientes com DRC (AZNAR-SALATTI et al., 1995; PANNIER et al., 2000; STINGHEN et al., 2009; VANHOLDER et al., 2005). Os níveis séricos de biomarcadores inflamatórios estão aumentados na DRC mais avançada e estão fortemente associados à inflamação vascular, bem como ao aumento da permeabilidade celular pela diminuição da expressão proteica das junções intercelulares (LAMPUGNANI; DEJANA, 2007; PENG et al., 2012a, 2012b). Para entender melhor esse mecanismo, avaliamos o papel de toxinas urêmicas e soro urêmico na morfologia e fenótipo de células endoteliais, expressões gênicas e proteicas que compõem as AJs (VE-caderina) e TJs (ZO-1).

A população incluída neste estudo foi composta por 80 pacientes em diferentes estágios da DRC, predominantemente idosos, homens e caucasianos, com características clínicas típicas de DRC. Os níveis séricos de biomarcadores inflamatórios sistêmicos e vasculares encontrados, tais como PCR-US, MCP-1, IL-8, ICAM-1s e VCAM-1s, estão de acordo com estudos similares, que mostram que a inflamação está fortemente correlacionada com a DRC (HAUSER et al., 2010; MACIEL et al., 2016a; STINGHEN et al., 2009). Nós observamos uma correlação significativa entre MCP-1, VCAM-1s e PCR-US com TFG e hipertensão, corroborando com estudos prévios (AZNAR-SALATTI et al., 1995). De fato, esses biomarcadores vasculares e inflamatórios, como PCR-US, MCP-1 e VCAM-1 são altamente expressos em pacientes com DRC, estando intimamente associados à disfunção endotelial e DCV, (PAPAYIANNI et al., 2002; SELZMAN et al., 2002; STINGHEN et al., 2009) bem como comprometimento da íntima/média, recentemente demonstrado pelo nosso grupo (GREGÓRIO et al., 2018; REMPEL et al., 2015; STINGHEN et al., 2009).

Corroborando com estudos prévios, nossos dados demonstraram níveis séricos de PCS, IS e Pi mais elevados em pacientes com DRC severa em comparação aos estágios inicial e moderado da DRC (LIABEUF et al., 2010b). De fato, demonstrou-se que níveis séricos elevados de PCS induzem a liberação de micropartículas endoteliais (MEIJERS et al., 2009b), ativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) por

leucócitos (SCHEPERS et al., 2007) e induz remodelamento vascular (GROSS et al., 2015). PCS possui ações pró-inflamatórias e citotóxicas nas células epiteliais tubulares proximais humanas (POVEDA et al., 2014) e promove resistência à insulina associada à DRC (KOPPE et al., 2013). Estudos clínicos associados a altos níveis séricos de PCS com nefropatia diabética e DCV (CHIU et al., 2010), além de PCS, têm sido considerados preditores de mortalidade em pacientes em diferentes estágios da DRC (BAMMENS et al., 2006; LIABEUF et al., 2010a). Da mesma forma, altos níveis séricos de IS participam do processo de lesão endotelial e desencadeiam a produção de moléculas pró-inflamatórias e EROs, que por sua vez inibem o reparo endotelial (DOU et al., 2004). Além disso, IS induz a contração do citoesqueleto das células endoteliais e diminui a expressão de AJs (PENG et al., 2012a). Estudos demonstraram que IS é progressivamente aumentado conforme a progressão da DRC (BARRETO et al., 2009) e pode contribuir para a disfunção do endotélio cerebral em pacientes com DRC devido ao aumento do estresse oxidativo (STINGHEN et al., 2014). Estudos *in vivo* também mostraram que IS está correlacionado com a disfunção vascular associada à DRC (SIX et al., 2015) e que promove a calcificação aórtica em ratos hipertensos (ADIJIANG et al., 2008), o que acelera a senescência celular (MUTELIEFU et al., 2012).

Por outro lado, embora tenhamos encontrado altos níveis séricos de Pi na DRC severa, não houve diferença significativa entre os grupos urêmicos. Uma explicação é que a hiperfosfatemia é prevenida até os últimos estágios da DRC pelo paratormônio (PTH) (COZZOLINO et al., 2009) e pelo fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) (WOLF, 2009), que por sua vez suprimem a reabsorção renal de fosfato e aumentam a excreção renal de fosfato nesses pacientes (ROMÁN-GARCÍA; CARRILLO-LÓPEZ; CANNATA-ANDÍA, 2009). A hiperfosfatemia na DRC apresenta inúmeros efeitos em sistemas biológicos que resultam em calcificação arterial (DRUEKE; MASSY, 2012) e manutenção dos níveis séricos de Pi dentro dos limites da normalidade, reduzindo o risco cardiovascular e a mortalidade (SHROFF, 2013). A literatura confirma o envolvimento do Pi como elemento central na progressão da DCV, uma vez que o aumento dos níveis séricos de Pi está correlacionado com risco aumentado de hipertrofia ventricular esquerda e insuficiência cardíaca (CANCELA et al., 2012; FOLEY et al., 2009). Além disso, mudanças nas concentrações de Pi

extracelular podem modular diretamente a função vascular e modular a resposta do músculo liso (SIX et al., 2012).

Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a avaliar o efeito de toxinas urêmicas e soro urêmico nas junções celulares em células endoteliais umbilicais humanas. As principais conclusões do presente estudo são: (I) A uremia afeta a adesão celular e perturba a homeostase do fenótipo das células endoteliais; (II) O ambiente urêmico modifica o citoesqueleto das células endoteliais e a expressão da proteína F-actina; (III) O ambiente urêmico impacta a expressão da proteína de junção aderente VE-caderina, (IV) O ambiente urêmico compromete a junção estreita e modula diferentemente a expressão de genes e proteínas de ZO-1.

Como um teste preliminar, foi realizado um ensaio de permeabilidade celular para avaliar o efeito das toxinas ou soros urêmicos na monocamada de células endoteliais. Nós demonstramos através do ensaio de permeabilidade que houve um aumento significativo na permeabilidade celular, sugerindo ruptura de junção, principalmente em células tratadas com Pi3 e *pools* urêmicos em diferentes níveis de uremia. Na verdade, o soro urêmico pode perturbar mais intensamente as junções célula-célula, o que pode ser justificado pelo fato do soro urêmico ser composto por mais de 150 toxinas (EUTox, 2018), atuando em conjunto, muitas vezes sinergicamente, o que danifica o endotélio sistêmico e conseqüentemente aumenta a intensidade do processo inflamatório (STINGHEN et al., 2014). De fato, PENG et al. (2012) demonstraram que após o tratamento com IS, a permeabilidade das células endoteliais pulmonares aumentou, através do remodelamento do citoesqueleto e da contração celular, o que resultou na ruptura das junções intercelulares (PENG et al., 2012a). Corroborando nossos achados preliminares do teste de permeabilidade, através da análise de MEV, foi possível observar que soro urêmico e altos níveis de Pi causam alterações morfológicas endoteliais graves, comprometendo o citoesqueleto do endotélio, demonstrado pela imunomarcagem de F-actina. De fato, foi demonstrado que a uremia desorganiza o citoesqueleto de plaquetas (ESCOLAR et al., 1993) e modula o fenótipo de células da musculatura lisa da aorta (MADSEN et al., 2017; MONROY et al., 2015). A fim de investigar *in vivo* o efeito da morfologia celular do ambiente urêmico na expressão de junções célula-célula (VE-caderina e ZO-1),

realizamos um estudo utilizando doadores de artérias ilíacas e renais (usados como controles) e receptores de artérias, coletados durante o transplante renal. Um endotélio intacto e contínuo com VE-caderina e ZO-1 bem marcados foi observado nas artérias doadoras. Ao contrário, nas artérias receptoras, foram observadas falhas na monocamada do endotélio, características de lesão endotelial e dano estrutural. De fato, a perda da integridade da barreira endotelial ocorre devido à ruptura das junções intercelulares (BAZZONI, 2011; BAZZONI; DEJANA, 2004).

Neste cenário, investigamos a expressão gênica de proteínas que compõe as AJs, como VE-caderina, p120,  $\beta$ -catenina e vinculina. Nossos dados demonstraram uma diminuição significativa na expressão do gene e proteína VE-caderina em células tratadas com IS, Pi e soros urêmicos, destacando a influência da toxicidade urêmica na junção aderente. Da mesma forma, estudos anteriores demonstraram que o silenciamento da VE-caderina ou o bloqueio de seus anticorpos levam à perda da integridade vascular (CROSBY et al., 2005). De fato, foi demonstrado que gene *knockout* VE-caderina foi letal em embriões de camundongos devido a defeitos angiogênicos relacionados à apoptose endotelial (CARMELIET et al., 1999). Os níveis de VE-caderina também podem ser usados como um biomarcador de disfunção endotelial associada à doença arterial coronariana, confirmando o envolvimento dessa proteína com DCV (YAN et al., 2015). Além disso, modificações pós-traducionais afetam a capacidade funcional da VE-caderina, que pode ser modulada por condições patológicas. Entretanto, estudos demonstraram que VEGF, uma proteína associada a biomarcadores inflamatórios em pacientes com DRC (YUAN et al., 2013) é capaz de induzir a fosforilação da VE-caderina, o que leva à sua posterior endocitose e degradação (GIANNOTTA; TRANI; DEJANA, 2013). Além disso, avaliamos a expressão de outras proteínas envolvidas na junção aderente, como p120,  $\beta$ -catenina e vinculina. Contudo, nossos resultados demonstraram que a expressão destas proteínas é afetada somente em células tratadas com as toxinas, mas não na presença de soros urêmicos, a nível de expressão gênica.

ZO-1, uma proteína TJs, é importante no processo de adesão intercelular, regulação do citoesqueleto e angiogênese (FANNING et al., 1998; TORNAVACA et al., 2015). Com base nisso, investigamos o efeito do ambiente urêmico na expressão

de ZO-1. Nossos dados demonstraram que a exposição das células endoteliais humanas a PCS, IS (nas concentrações máximas urêmicas) e ao soro urêmico resulta em um aumento significativo da expressão do gene ZO-1. Por outro lado, a expressão da proteína ZO-1 foi diminuída em células tratadas com PI e soros urêmicos. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores *in vivo* e *in vitro* que avaliaram os danos à integridade da barreira intestinal em um modelo de DRC. Os mesmos autores analisaram a expressão de ZO-1 em colonócitos de ratos nefrectomizados e observaram um aumento e uma diminuição nos níveis de mRNA e proteína, respectivamente (VAZIRI et al., 2012a, 2013). Essa diferença entre o gene ZO-1 e a expressão proteica pode ser devido a mecanismos regulatórios pós-transcricionais ou pós-traducionais. Da mesma forma, outros estudos (VAZIRI et al., 2012b; VAZIRI; YUAN; NORRIS, 2013) demonstraram em colonócitos que a ureia e o soro urêmico de pacientes com DRC reduz significativamente a expressão proteica de ZO-1 e de outras proteínas TJs, como as claudinas e ocludinas. Além disso, os autores (VAZIRI et al., 2012b; VAZIRI; YUAN; NORRIS, 2013) também encontraram baixa resistência transepitelial, o que comprova aumento da permeabilidade, corroborando com nossos achados. Além disso, devido ao papel crucial da ZO-1 na composição das junções intercelulares, ZO-1 possui funções reguladoras, incluindo associações com proteínas nucleares. Segundo a literatura, as proteínas da família ZO possuem domínios necessários para a organização estrutural das junções intercelulares e domínios adicionais capazes de funcionar nas vias de transdução de sinal (UMEDA et al., 2006). Portanto, o ambiente urêmico poderia hipoteticamente afetar, ao menos em parte, a capacidade funcional reguladora da ZO-1 (BAUER et al., 2010).

Em resumo, este estudo foi o primeiro a demonstrar *in vivo* e *in vitro* que a uremia afeta severamente as junções célula-célula do endotélio, e quanto mais avançada a DRC, mais comprometimento endotelial. O impacto na expressão das proteínas das junções celulares VE-caderina e ZO-1 é mais significativo nos estágios moderado e grave da DRC e é distinto quando analisado apenas as toxinas urêmicas ou os soros urêmicos, o que sugere diferentes mecanismos para cada toxina e/ou um mecanismo sinérgico. *In vitro*, demonstramos que o gene da VE-caderina e a expressão proteica estão diminuídos na DRC mais avançada. Apesar da expressão

do gene ZO-1 estar aumentada, os níveis de proteína ZO-1 foram diminuídos, sugerindo uma possível regulação pós-transcricional e um papel de ZO-1 como regulador de outras proteínas de junções celulares. Reconhecemos que nosso estudo tem algumas limitações e que mais trabalho será necessário, como avaliar o efeito da uremia na fosforilação da VE-caderina e sua internalização por endocitose, bem como o envolvimento de p120,  $\beta$ -catenina e vinculina, além de elucidar a regulação dos mecanismos da proteína ZO-1. Nosso estudo abre perspectivas para avaliar o envolvimento de inúmeras proteínas de junções intercelulares, a fim de elucidar melhor a relação da uremia com as alterações da permeabilidade vascular e da lesão endotelial.

## 7 CONCLUSÕES

- As toxinas PCS, IS e Pi correlacionaram-se significativamente com a TFG, assim como os biomarcadores inflamatórios MCP-1, VCAM-1 e PCR;
- O ambiente urêmico impacta severamente a morfologia e fenótipo endotelial, sendo este efeito mais significativo nos estágios mais avançados de DRC, o que foi comprovado *in vivo* e *in vitro* através da imunomarcagem de artérias e MEV respectivamente;
- A uremia (representada por toxinas isoladas ou *pools* urêmicos) altera significativamente a viabilidade e permeabilidade vascular, e este mecanismo patofisiológico é distinto para cada toxina testada ou *pools* urêmicos;
- A uremia diminui a expressão gênica e proteica de VE-caderina, principalmente na presença de Pi e *pools* urêmicos. Entretanto, embora a expressão gênica de ZO-1 seja aumentada, a expressão proteica é diminuída, sugerindo uma regulação pós-transcricional de ZO-1.
- Os estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que o rompimento e comprometimento das junções endoteliais iniciam-se a partir dos estágios moderado e severo da DRC, e da mesma forma, este mecanismo é distinto quanto testado toxinas isoladas ou *pools* urêmicos.

## REFERÊNCIAS

- ADIJIANG, A. et al. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 6, p. 1892–1901, 2008.
- ANDERSON, J. M. et al. Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 4, p. 1141–1149, 1988.
- AZNAR-SALATTI, J. et al. Uraemic medium causes endothelial cell dysfunction characterized by an alteration of the properties of its subendothelial matrix. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 10, n. 12, p. 2199–2204, 1995.
- BAMMENS, B. et al. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 69, n. 6, p. 1081–1087, 2006.
- BARRETO, F. C. et al. Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 11, p. 1551–1558, 2009.
- BATES, D. .; HARPER, S. . Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 4–5, p. 225–237, 2002.
- BAUER, H. et al. The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.
- BAZZONI, G. Pathobiology of junctional adhesion molecules. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 5, p. 1221–1234, 2011.
- BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. **Physiological reviews**, v. 84, n. 3, p. 869–901, 2004.
- BIRUKOVA, A. A. et al. Dual role of vinculin in barrier-disruptive and barrier-enhancing endothelial cell responses. **Cellular Signalling**, v. 28, n. 6, p. 541–551, 2016.
- BLOCK, G. A et al. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 31, n. 4, p. 607–617, 1998.
- BODA-HEGGEMANN, J.; RÉGNIER-VIGOUROUX, A.; FRANKE, W. W. Beyond vessels: Occurrence and regional clustering of vascular endothelial (VE-cadherin-containing junctions in non-endothelial cells. **Cell and Tissue Research**, 2009.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.
- CALAF, R. et al. Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney

disease patients by HPLC assay. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 23, p. 2281–2286, 2011.

CAMPBELL, L. M.; MAXWELL, P. J.; WAUGH, D. J. J. Rationale and means to target pro-inflammatory interleukin-8 (CXCL8) signaling in cancer. **Pharmaceuticals**, 2013.

CANCELA, A. L. et al. Phosphorus is associated with coronary artery disease in patients with preserved renal function. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

CARMELIET, P. et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. **Cell**, v. 98, n. 2, p. 147–157, 1999.

CERUTTI, C.; RIDLEY, A. J. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. **Experimental Cell Research**, 2017.

CHENG, J. C.; CHANG, H. M.; LEUNG, P. C. K. Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibits trophoblast cell invasion by inducing snail-mediated down-regulation of vascular endothelial-cadherin protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 33181–33192, 2013.

CHIU, C.-A. et al. Increased levels of total P-Cresylsulphate and indoxyl sulphate are associated with coronary artery disease in patients with diabetic nephropathy. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 7, n. 4, p. 275–84, 2010.

CHOMCZYŃSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.

CHRISOBOLIS, S. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 16, p. 1733–1745, 2011.

CORADA, M. et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 17, p. 9815–20, 1999.

CORADA, M. et al. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/notch signaling. **Developmental Cell**, v. 18, n. 6, p. 938–949, 2010.

COZZOLINO, M. et al. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. **International Journal of Artificial Organs**, 2009.

CROSBY, C. V. et al. VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2771–2776, 2005.

DE LOOR, H. et al. Sodium octanoate to reverse indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate albumin binding in uremic and normal serum during sample preparation followed by fluorescence liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 22, p. 4684–4688, 2009.

DHINGRA, R. et al. Relations of serum phosphorus levels to echocardiographic left ventricular mass and incidence of heart failure in the community. **European Journal**

**of Heart Failure**, v. 12, p. 812–818, 2010.

DI MARCO, G. S. et al. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 294, n. 6, p. F1381-7, 2008.

DI MARCO, G. S. et al. High phosphate directly affects endothelial function by downregulating annexin II. **Kidney International**, 2012.

DOU, L. et al. P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. **Kidney International**, v. 62, p. 1999–2009, 2002.

DOU, L. et al. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. **Kidney International**, v. 65, n. 2, p. 442–451, 2004.

DRUEKE, T. B.; MASSY, Z. A. Phosphate Binders in CKD: Bad News or Good News? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1277–1280, 2012.

EDGEELL, C. J.; MCDONALD, C. C.; GRAHAM, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 12, p. 3734–3737, 1983.

ESCOLAR, G. et al. Abnormal Cytoskeletal Assembly in Platelets from Uremic Patients. **The American journal of pathology**, v. 143, n. 3, p. 823–31, 1993.

FANNING, A. S. et al. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 45, p. 29745–29753, 1998.

FAVRETTO, G. et al. Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-bound Uremic Toxins by Human Endothelial Cells and MCP-1 expression. **Journal of Vascular Research**, p. In press, 2017.

FEIGENBAUM, J.; NEUBERG, C. A. Simplified Method for the preparation of aromatic sulfuric acid esters. **Notes**, v. 63, n. 1, p. 3529–3530, 1941.

FIGUEIRA, R. C. S. et al. Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC cancer**, v. 9, p. 20, 2009.

FOLEY, R. N. et al. Serum Phosphorus Levels Associate with Coronary Atherosclerosis in Young Adults. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 2, p. 397–404, 2009.

GIANNOTTA, M.; TRANI, M.; DEJANA, E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: Active guardians of vascular integrity. **Developmental Cell**, 2013.

GOODENOUGH, D. A; GOLIGER, J. A; PAUL, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. **Annual review of biochemistry**, v. 65, p. 475–502, 1996.

GREGÓRIO, P. C. et al. Sevelamer reduces endothelial inflammatory response to advanced glycation end products. **Clinical kidney journal**, v. 11, n. 1, p. 89–98, 2018.

GROSS, P. et al. Para-Cresyl Sulfate Acutely Impairs Vascular Reactivity and Induces Vascular Remodeling. **Journal of Cellular Physiology**, n. April 2015, p. n/a-n/a, 2015.

GUILGEN, G. et al. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. **Blood Purification**, v. 32, n. 4, p. 296–302, 2011.

GUIMARÃES, F. S. F. et al. Stimulation of lymphocyte anti-melanoma activity by co-cultured macrophages activated by complex homeopathic medication. **BMC Cancer**, v. 9, p. 293, 2009.

HAN, H. et al. p-Cresyl Sulfate Aggravates Cardiac Dysfunction Associated With Chronic Kidney Disease by Enhancing Apoptosis of Cardiomyocytes. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, p. e001852–e001852, 2015.

HAUSER, A. B. et al. Sevelamer carbonate reduces inflammation and endotoxemia in an animal model of uremia. **Blood Purification**, v. 30, n. 3, p. 153–158, 2010.

HELENA, M. et al. Hipertensão arterial : o endotélio e suas múltiplas funções. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 76–88, 2001.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. **Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades** *Free Radical Biology and Medicine*, 2000.

HUGGETT, J. F. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 2013.

HUO, Y.; HAFEZI-MOGHADAM, A.; LEY, K. Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions. **Circulation Research**, v. 87, n. 2, p. 153–159, 2000.

HUVENEERS, S. et al. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. **Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 5, p. 641–652, 2012.

IKEDA, U. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. **Clinical cardiology**, v. 25, n. 4, p. 143–7, 2002.

INKER, L. A. et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, 2014.

ITOH, M. et al. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. **Journal of Cell Biology**, v. 138, n. 1, p. 181–192, 1997.

JUNDI, K.; GREENE, C. M. Transcription of interleukin-8: How altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. **Biomolecules**, 2015.

KALANTAR-ZADEH, K. et al. Understanding sources of dietary phosphorus in the treatment of patients with chronic kidney disease. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 5, n. 3, p. 519–530, 2010.

KATSUNO, T. et al. Deficiency of Zonula Occludens-1 Causes Embryonic Lethal Phenotype Associated with Defected Yolk Sac Angiogenesis and Apoptosis of Embryonic Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 6, p. 2465–2475, 2008.

KESTENBAUM, B. et al. Serum phosphate levels and mortality risk among people with

chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 16, p. 520–528, 2005.

KONDAPALLI, J.; FLOZAK, A. S.; ALBUQUERQUE, M. L. C. Laminar Shear Stress Differentially Modulates Gene Expression of p120 Catenin, Kaiso Transcription Factor, and Vascular Endothelial Cadherin in Human Coronary Artery Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11417–11424, 2004.

KOPPE, L. et al. p-Cresyl Sulfate Promotes Insulin Resistance Associated with CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 1, p. 88–99, 2013.

KOURTIDIS, A.; NGOK, S. P.; ANASTASIADIS, P. Z. P120 catenin: An essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 116, p. 409–432, 2013.

LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. **Thrombosis Research**, v. 120, 2007.

LEE, J. H.; LEE, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. **FEMS Microbiology Reviews**, 2010.

LEE, W. et al. Indoxyl sulfate-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired biogenesis are partly protected by vitamin C and N-acetylcysteine. **Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

LEVEY, A. S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of internal medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–12, 2009.

LEVIN, A. et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. **Kidney international**, v. 71, p. 31–38, 2007.

LIABEUF, S. et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 4, p. 1183–1191, 2010a.

LIABEUF, S. et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 25, n. 4, p. 1183–91, Apr. 2010b.

MA, C.; WANG, X. F. In vitro assays for the extracellular matrix protein-regulated extravasation process. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 8, 2008.

MACIEL, R. A. et al. p-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF- $\kappa$ B p65 in human vascular smooth muscle cells. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 38, n. 2, 2016a.

MACIEL, R. A. P. et al. p-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF- $\kappa$ B p65 in human vascular smooth muscle cells. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 2, p. 153–60, 2016b.

MADSEN, M. et al. Uremia modulates the phenotype of aortic smooth muscle cells.

**Atherosclerosis**, v. 257, p. 64–70, 2017.

MARTINOVIC, I. et al. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 69, n. 12, p. 1484–9, 2005.

MARUI, N. et al. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 92, n. 4, p. 1866–74, 1993.

MAYANAGI, T. et al. Glucocorticoid receptor-mediated expression of caldesmon regulates cell migration via the reorganization of the actin cytoskeleton. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 31183–31196, 2008.

MEERT, N. et al. Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 6, p. 2388–96, 2012.

MEIJERS, B. K. I. et al. p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate in hemodialysis patients. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, p. 1932–1938, 2009a.

MEIJERS, B. K. I. et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 54, n. 5, p. 891–901, Nov. 2009b.

MEIJERS, B. K. I.; EVENEPOEL, P. The gut-kidney axis: Indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 2011.

MELGAREJO, E. et al. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, n. 5, p. 998–1001, 2009.

MONROY, M. A. et al. Chronic kidney disease alters vascular smooth muscle cell phenotype. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 20, p. 784–795, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOZAR, A. et al. Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 6, p. 2176–2181, 2012.

MUTELIEFU, G. et al. Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress. **AJP: Cell Physiology**, v. 303, n. 2, p. C126–C134, 2012.

NITTA, T. et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. **Journal of Cell Biology**, v. 161, p. 653–660, 2003.

NIU, J. et al. Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCP-IP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14542–14551, 2008.

NIU, J.; KOLATTUKUDY, P. E. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. **Clinical Science**, v. 117, n. 3, p. 95–109, 2009.

NIWA, T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. **Nagoya journal of medical science**, v. 72, p. 1–11, 2010a.

NIWA, T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. **Journal of renal nutrition : the official journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation**, v. 20, p. S2–S6, 2010b.

O'BRIEN, K. D. et al. Neovascular Expression of E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Atherosclerosis and Their Relation to Intimal Leukocyte Content. **Circulation**, v. 93, n. 4, p. 672–682, 1996.

PANNIER, B. et al. Postischemic vasodilation, endothelial activation, and cardiovascular remodeling in end-stage renal disease. **Kidney International. Anais**.2000

PAPAYIANNI, A. et al. Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, n. 3, p. 435–441, 2002.

PAPAYIANNI, A.; ALEXOPOULOS, E. Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular. **Nephrology Dialysis**, p. 435–441, 2002.

PENG, Y. SEN et al. Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 3, p. 1034–1043, 2012a.

PENG, Y. SEN et al. Uremic toxin p-cresol induces disassembly of gap junctions of cardiomyocytes. **Toxicology**, v. 302, n. 1, p. 11–17, 2012b.

POKUTTA, S.; WEIS, W. I. Structure and Mechanism of Cadherins and Catenins in Cell-Cell Contacts. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 237–261, 2007.

POVEDA, J. et al. p-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 29, n. 1, p. 56–64, 2014.

RAHABI-LAYACHI, H. et al. Distinct effects of inorganic phosphate on cell cycle and apoptosis in human vascular smooth muscle cells. **Journal of cellular physiology**, n. November 2013, p. 347–355, 2014.

REMPEL, L. C. T. et al. Effect of PKC- $\beta$  signaling pathway on expression of MCP-1 and VCAM-1 in different cell models in response to advanced glycation end products (AGEs). **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1722–1737, 2015.

RIBEIRO, V. et al. Uremic serum inhibits in vitro expression of chemokine SDF-1: impact of uremic toxicity on endothelial injury. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 123–131, 2014.

ROMÁN-GARCÍA, P.; CARRILLO-LÓPEZ, N.; CANNATA-ANDÍA, J. B. Pathogenesis

of bone and mineral related disorders in chronic kidney disease: Key role of hyperphosphatemia. **Journal of Renal Care**, 2009.

SCHEPERS, E. et al. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 22, n. 2, p. 592–6, Feb. 2007.

SCHULTE, D. et al. Stabilizing the VE-cadherin–catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 20, p. 4157–4170, 2011.

SELZMAN, C. H. et al. Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 283, n. 4, p. H1455-61, Oct. 2002.

SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, 2017.

SHIMIZU, H. et al. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- $\kappa$ B and p53 in proximal tubular cells. **Life Sciences**, v. 92, n. 2, p. 143–148, 2013.

SHROFF, R. Phosphate is a vascular toxin. **Pediatric Nephrology**, 2013.

SIX, I. et al. Effects of phosphate on vascular function under normal conditions and influence of the uraemic state. **Cardiovascular Research**, v. 96, n. 1, p. 130–139, 2012.

SIX, I. et al. Deleterious vascular effects of indoxyl sulfate and reversal by oral adsorbent AST-120. **Atherosclerosis**, v. 243, n. 1, p. 248–256, 2015.

STAMATOVIC, S. M. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 22, p. 4615–4628, 2003.

STEIN, U. et al. Intervening in  $\beta$ -Catenin Signaling by Sulindac Inhibits S100A4-Dependent Colon Cancer Metastasis. **Neoplasia**, v. 13, n. 2, p. 131-IN8, 2011.

STEVENSON, B. R. et al. Identification of ZO-1: A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (Zonula Occludens) in a variety of epithelia. **Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 3, p. 755–766, 1986.

STEWART, C. E. et al. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. **Journal of Allergy**, v. 2012, n. di, p. 1–11, 2012.

STINGHEN, A. et al. Differential Effects of Indoxyl Sulfate and Inorganic Phosphate in a Murine Cerebral Endothelial Cell Line (bEnd.3). **Toxins**, v. 6, p. 1742–1760, 2014.

STINGHEN, A. E. M. et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron - Clinical Practice**, v. 111, 2009.

STOCKLER-PINTO, M. B. et al. From bench to the hemodialysis clinic: protein-bound

uremic toxins modulate NF- $\kappa$ B/Nrf2 expression. **International Urology and Nephrology**, p. 1–8, 2017.

SULIMAN, M. E. et al. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: A predictor of outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 6, p. 1603–1610, 2006.

TANG, K. H. et al. CD133 + liver tumor-initiating cells promote tumor angiogenesis, growth, and self-renewal through neurotensin/interleukin-8/CXCL1 signaling. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 807–820, 2012.

TORNAVACA, O. et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. **Journal of Cell Biology**, v. 208, n. 6, p. 821–838, 2015.

TWISS, F. et al. Vinculin-dependent Cadherin mechanosensing regulates efficient epithelial barrier formation. **Biology Open**, v. 1, n. 11, p. 1128–1140, 2012.

UMEDA, K. et al. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44785–44794, 2004.

UMEDA, K. et al. ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 741–754, 2006.

URIBARRI, J. Phosphorus homeostasis in normal health and in chronic kidney disease patients with special emphasis on dietary phosphorus intake. **Seminars in Dialysis**, v. 20, n. 4, p. 295–301, 2007.

VANHOLDER, R. et al. Uremic toxicity: Present state of the art. **International Journal of Artificial Organs**, 2001.

VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, p. 1934–1943, 2003.

VANHOLDER, R. et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 20, n. 6, p. 1048–56, Jun. 2005.

VANHOLDER, R.; LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, 2008.

VAZIRI, N. D. et al. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. **American Journal of Nephrology**, v. 36, n. 5, p. 438–443, 2012a.

VAZIRI, N. D. et al. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: A likely cause of CKD-associated inflammation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 7, p. 2686–2693, 2012b.

VAZIRI, N. D. et al. Oral activated charcoal adsorbent (AST-120) ameliorates chronic kidney disease-induced intestinal epithelial barrier disruption. **American Journal of Nephrology**, v. 37, n. 6, p. 518–525, 2013.

VAZIRI, N. D.; YUAN, J.; NORRIS, K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. **American Journal of Nephrology**, v. 37, n. 1, p. 1–6, 2013.

VIDEM, V.; ALBRIGTSEN, M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 67, n. 5, p. 523–531, 2008.

WOLF, M. Fibroblast growth factor 23 and the future of phosphorus management. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, 2009.

YAN, Y. et al. Identification of plasma vascular endothelia-cadherin as a biomarker for coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus patients. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 10, p. 19466–19470, 2015.

YUAN, J. et al. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptor 1 (sVEGFR-1) are associated with inflammation and mortality in incident dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 9, p. 2356–2363, 2013.

ZHU, J. et al. P-cresol, but not p-cresylsulphate, disrupts endothelial progenitor cell function in vitro. **Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 27, n. 12, p. 4323–30, 2012.

## APÊNDICES

### APÊNDICE I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo dos mecanismos envolvidos na permeabilidade vascular relacionada a toxicidade urêmica.

**Pesquisador:** Andréa Emília Marques Stingham

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 39393414.9.0000.0102

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia Básica

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA EDUCACAO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 960.959

**Data da Relatoria:** 11/03/2015

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado de Rayana Ariane Pereira Maciel proveniente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, sob orientação da Profª Andrea Emília Marques Stingham e com colaboração de Roberto Pecoits Filho e Felipe de Carvalho Barreto.

Apresenta como coparticipante o Ambulatório de Nefrologia da Escola de Medicina da PUC-PR e o estudo será realizado no período de Janeiro de 2015 a Julho de 2018.

##### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o impacto da toxicidade urêmica (p-cresilsulfato e Indoxil sulfato) na disfunção endotelial e correlação com a permeabilidade vascular sistêmica e cerebral.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora, "os riscos estão relacionados à coleta de sangue venoso, como equimoses e inchaços na área de punção. As medidas para assegurar os cuidados são garrotear o braço do paciente por curto tempo, coletar com cuidado, estancar o sangue e informar ao paciente que não erga peso com o braço que foi coletado"

Como benefícios espera-se contribuir para melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão da doença renal crônica e auxiliar na descoberta de novos alvos terapêuticos para levar a uma maior sobrevida do paciente.

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 280

**Bairro:** 2ª andar

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7250

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 900.959

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Com o desenvolvimento da Doença Renal Crônica (DRC) e conseqüente acúmulo de toxinas urêmicas, como p-cresilsulfato e indoxilsulfato, ocorre uma ativação da resposta inflamatória sistêmica e especialmente vascular. A fim de entender os mecanismos celulares e moleculares no ambiente urêmico, as células serão tratadas com pool urêmico de pacientes em diferentes estágios da DRC. Assim, pode-se compreender em qual estágio da DRC inicia-se o rompimento das junções intercelulares.

Serão utilizadas neste estudo amostras congeladas de plasma de aproximadamente 100 pacientes em tratamento no Ambulatório de Nefrologia da Escola de Medicina da PUC-PR, que serão obtidas durante consulta de rotina. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes serão obtidos pelo Prof. Dr. Felipe Barreto e Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho, nefrologistas do ambulatório. As amostras serão previamente selecionadas e obedecerão a critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos. As amostras de plasma serão estocadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises dos marcadores de ativação endotelial e inflamatório. O mesmo material será utilizado nos estudos *in vitro* devidamente descritos no projeto. As amostras serão transportadas até o Departamento de Patologia Básica da UFPR, onde permanecerão armazenadas até o término no estudo quando serão destruídas. O Laboratório onde será realizado os experimentos (LabNefro) e o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR dispõem de equipamentos de biologia celular e molecular para a realização da pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos foram apresentados. Foi anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD.

**Recomendações:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo

Endereço: Rua Pedro Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7250

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 900.959

reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS).

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

CURITIBA, 11 de Março de 2015

---

Assinado por:  
IDA CRISTINA GUBERT  
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280  
Bairro: 2º andar CEP: 80.060-240  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3380-7259 E-mail: cometica.saude@ufpr.br

## APÊNDICE II

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Andrea Emilia Marques Stingham e Rayana Ariane Pereira Maciel, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o Senhor (a) a participar do estudo intitulado "Estudo dos mecanismos envolvidos na permeabilidade vascular relacionada a toxicidade urêmica", ou seja, avaliaremos o envolvimento da doença cardiovascular nos pacientes com doença renal crônica. Tal pesquisa poderá abrir novas perspectivas quanto ao entendimento da evolução das complicações relacionadas a doença renal crônica.

a) O objetivo desta pesquisa é abrir novas perspectivas quanto ao entendimento da evolução das complicações relacionadas a doença renal crônica.

b) Caso você participe da pesquisa, será necessário, durante a coleta dos exames de rotina, doar aproximadamente 10 mL de sangue periférico de uma veia em um dos braços para utilizá-los em experimentos *in vitro* (em laboratório). A doação será realizada somente uma vez, não tendo que retornar ao Ambulatório exclusivamente para esse fim.

c) Para tanto a coleta será realizada no Ambulatório de Nefrologia da Escola de Medicina da PUC/PR no mesmo momento da coleta dos exames de laboratório de rotina.

d) É possível que o Senhor (a) experimente algum desconforto, principalmente relacionado a coleta de sangue.

e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: presença de equimoses (pequenas manchas roxas na pele) e hipotensão (queda da pressão arterial). Para minimizar esses riscos deve-se estancar o sangue após a coleta e não erguer peso com o braço que foi punccionado e alimentar-se normalmente após a coleta.

f) O principal benefício esperado com essa pesquisa é contribuir para um melhor entendimento da doença renal crônica e futuramente melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

g) As pesquisadoras Andréa E. M. Stingham e Rayana Ariane Pereira Maciel podem ser encontradas na Universidade Federal do Paraná - Centro Politécnico, Jardim das Américas - Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Patologia Básica, Sala 143, das 9:00 às 17:00 hrs ou pelos telefones: (41) 3361-1691, (41) 9636-0782 ou (41) 9994-6859 ou pelos e-mails: andreastingham@ufpr.br ou rayanaarlane@gmail.com, para esclarecer eventuais dúvidas a respeito da pesquisa antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.  
Parecer CEP/SD-PB nº 980359  
na data de 21/03/2013

Rubricas:  
Participante da Pesquisa e/ou responsável legal \_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_  
Orientador \_\_\_\_\_ Orientado \_\_\_\_\_

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240  
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, o qual está assegurado.

i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (Rayana Ariane Pereira Maciel, Andrea Emilia Marques Stinghen, Fellype de Carvalho Barreto e Roberto Pecoits Filho). As amostras de soro serão guardadas na Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Laboratório 143A (LabNefro) e descartadas após o término do estudo (Julho de 2018) e sempre serão identificadas com códigos, a fim de garantir a confidencialidade do paciente.

j) Além da coleta de sangue, os pesquisadores Rayana Ariane Pereira Maciel, Andrea Emilia Marques Stinghen, Fellype de Carvalho Barreto e Roberto Pecoits Filho realizarão coleta de dados em seu prontuário, tais como idade, raça, gênero, peso, altura, dosagens bioquímicas, causa primária da doença renal, tabagismo, dislipidemia, diabetes, hipertensão arterial, histórico de doença cardiovascular e de doença cerebrovascular.

k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: equimoses (pequenas manchas roxas na pele) e hipotensão (queda da pressão arterial) decorrentes do estudo serão tratados no Ambulatório de Nefrologia da Escola de Medicina da PUC/PR.

l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item "e".

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR  
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240  
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Setor de Ciências da  
Saúde/UFPR.  
Protocolo CEP/SD-PB nº 980 959  
na data de 11/03/2015

## APÊNDICE III



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação


Curitiba, 26 de junho de 2005  
Of. 226/05/CEP-PUCPR

Ref. "Modulação fenotípica induzida por soro urêmico em células vasculares".

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 01 de junho do corrente ano aprovou o Projeto intitulado "Modulação fenotípica induzida por soro urêmico em células vasculares", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 577 e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,

  
Profª M. Sc. Ana Cristina Miguez Ribeiro  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.  
Lia Sumie Nakao

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA CONCOMITANTE AO DESENVOLVIMENTO DA TESE

### ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

1. FAVRETTO, G. ; GREGORIO, P. C. ; CUNHA, R. S. ; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA** ; STINGHEN, A. E. M. . 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**, p. 170-179, 2017.
2. **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BOSQUETTI, B. ; REMPEL, L. C. T. ; BECKER-FINCO, A ; PECOITS-FILHO, ROBERTO; SOUZA, W. M. ; STINGHEN, A. E. M. *p*-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF- $\kappa$ B p65 in human vascular smooth muscle cells. **Jornal Brasileiro de Nefrologia (Impresso)**, v. 38, p. 153-160, 2016.
3. FINCO, ALESSANDRA BECKER; MACHADO-DE-ÁVILA, RICARDO ANDREZ; **MACIEL, RAYANA**; DE MOURA, JULIANA; BILLIALD, PHILIPPE; STINGHEN, ANDREA EMILIA MARQUES; ALVARENGA, LARISSA M. Generation and Characterization of Monoclonal Antibody Against Advanced Glycation End Products in Chronic Kidney Disease. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 142-148, 2016.
4. REMPEL, LISIENNY; FINCO, ALESSANDRA; **MACIEL, RAYANA**; BOSQUETTI, BRUNA; ALVARENGA, LARISSA; SOUZA, WESLEY; PECOITS-FILHO, ROBERTO; STINGHEN, ANDRÉA. Effect of PKC- $\beta$  Signaling Pathway on Expression of MCP-1 and VCAM-1 in Different Cell Models in Response to Advanced Glycation End Products (AGEs). **Toxins**, v. 7, p. 1722-1737, 2015.
5. RIBEIRO, VANESSA; BOSQUETTI, BRUNA; GONÇALVES, SIMONE MIKOSZ; BUCHARLES, SÉRGIO GARDANO ELIAS; REMPEL, LISIENNY; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; OLIVEIRA, RODRIGO BUENO DE; PECOITS-FILHO, ROBERTO; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Uremic serum inhibits *in vitro* expression of chemokine SDF-1: impact of uremic toxicity on endothelial injury. **Jornal Brasileiro de Nefrologia (Impresso)**, v. 36, p. 123-131, 2014.

6. SOUZA, W. M.; REMPEL, L. C. T.; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; SANTOS, C. A. M. ; STINGHEN, A. E. M. . Evaluation of uleine in cellular adhesion of murine melanoma (B16F-10) and human gastric carcinoma Cells (KATO III and MKN). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 32, p. 869-874, 2013.

#### TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; CUNHA, R. S. ; BUSATO, V. ; FRANCO, C. R. ; GREGORIO, P. C. ; PECOITS-FILHO, ROBERTO ; MASSY, Z. A. ; BOULLIER, A. ; STINGHEN, A. E. M. . Uremic toxins alter endothelial cell-to-cell junctions' structure. In: 55th ERA-EDTA Congress, 2018, Copenhagen. **Nephrology Dialysis Transplantation**. Oxford: Oxford University Press, 2018. v. 33. p. i472-i473.

2. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BUSATO, V.; PECOITS-FILHO, R.; BARRETO, F. C.; SOUZA, W. M.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Protein Bound Uremic Toxins p-Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate Modulate the Human Endothelial Cells' Transcriptome In: Kidney Week 2017, 2017, New Orleans. **Journal of the American Society of Nephrology (JASN) Abstract Supplement**. , 2017. v.28. p.199 – 199.

3. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BUSATO, V.; SOUZA, W. M.; PECOITS-FILHO, R.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Role of CREB1 in the regulation of expression of OAT1 and OAT3 by human endothelial cells in the presence of protein bound uremic toxins p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate In: 54th ERA-EDTA Congress, 2017, Madri. **Nephrology Dialysis Transplantation**. Oxford: Oxford University Press, 2017. v.32. p.iii439 - - iii439.

4. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BECKER-FINCO, A; PECOITS-FILHO, R.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Efeito de *p*-cresol e *p*-cresil sulfato na expressão de OAT-1 em células RASM In: Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2016, Maceió. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2016. v.38. p.314 – 358.

5. REMPEL, L.C.T.; BECKER-FINCO, A; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BOSQUETTI, BRUNA; ALVARENGA, L.; PECOITS-FILHO, ROBERTO; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Interação de endotélio e monócitos em co-cultura: produção de MCP-1 e VCAM-1 via RAGE e PKC-B em resposta a AGES In: XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia, 2014, Belo Horizonte. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2014. v.36. p.1–2.

6. **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; REMPEL, L. C. T.; BOSQUETTI, B.; BECKER-FINCO, A; SOUZA, W. M.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. *p*-cresol (PC) and *p*-cresyl sulfate (PCS) stimulate chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human vascular smooth muscle cells (VSMC). In: Kidney Week Program Builder 2013, 2013, Atlanta. **Journal of the American Society of Nephrology (JASN)**. Washington: American Society of Nephrology, 2013. v.24. p.11A - 11A.

7. **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; MORENO, A. N.; OLIVEIRA, R. B.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Advanced glycation end products and MCP-1 expression by endothelial cell through PKC- $\beta$  pathway. In: Kidney Week Program Builder 2012, 2012, San Diego. **Journal of the American Society of Nephrology (JASN)**. Washington: Journal of the American Society of Nephrology, 2012. v.23. p.911A - 911A.

#### APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E PALESTRA

1. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; **MACIEL, MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BECKER-FINCO, A; PECOITS-FILHO, ROBERTO; STINGHEN, A. E. M. Efeito de *p*-cresol e *p*-cresil sulfato na expressão de OAT-1 em células RASM, 2016. Cidade: Maceió; Evento: **XXVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia**; Sociedade Brasileira de Nefrologia.

2. CUNHA, R. S.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; **MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BECKER-FINCO, A; PECOITS-FILHO, ROBERTO; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Efeito de *p*-cresol e *p*-cresil sulfato na expressão do transportador de ânion orgânico- 1 (OAT1) em células vasculares musculares lisas de coelho (RASM), 2016. Cidade: Curitiba; Evento: **3ª Mostra Anual de Pesquisa do Setor de**

**Ciências Biológicas da UFPR - Ciência no Espelho**; Universidade Federal do Paraná.

**3. MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BOCHNIE, K. A.; FAVRETTO, G.; GREGORIO, P. C.; STINGHEN, A. E. M. Análise da viabilidade celular em células endoteliais humanas tratadas com toxinas urêmicas, 2015. Cidade: Curitiba; Evento: **Evento de Iniciação Científica do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil**.

**4. REMPEL, L. C. T.; MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; BECKER-FINCO, A; BOSQUETTI, B.; ALVARENGA, L.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Interação de endotélio e monócitos em co-cultura: produção de MCP-1 e VCAM-1 via RAGE e PKC-B em resposta a AGES, 2014. Cidade: Belo Horizonte; Evento: **XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia/VI Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia**; Sociedade Brasileira de Nefrologia.

**5. MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; REMPEL, L. C. T.; SOUZA, W. M.; BECKER-FINCO, A; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. *p*-cresol e *p*-cresil sulfato estimulam a expressão da chemoattractant protein-1 (MCP-1) em células musculares lisas humanas (VSMC) , 2014. Cidade: Belo Horizonte; Evento: **XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia/VI Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia**; Sociedade Brasileira de Nefrologia.

**6. BOSQUETTI, B.; HEIDEMANN, V. R.; GONÇALVES, SIMONE MIKOSZ; BUCCHARLES, SÉRGIO GARDANO ELIAS; REMPEL, L. C. T.; MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; OLIVEIRA, RODRIGO BUENO DE; PECOITS-FILHO, ROBERTO; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Soro urêmico inibe a expressão *in vitro* da quimiocina SDF-1: possível impacto da toxicidade urêmica na lesão endotelial, 2014. Cidade: Belo Horizonte; Evento: **XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia**; Sociedade Brasileira de Nefrologia.

**7. MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA**; REMPEL, L. C. T.; BOSQUETTI, B.; BECKER-FINCO, A; SOUZA, W. M.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. *p*-cresol (PC) and *p*-cresyl sulfate (PCS) stimulate chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human vascular smooth muscle cells (VSMC). 2013. Cidade: Atlanta; Evento: **Kidney Week 2013**; American Society of Nephrology.

**8. MACIEL, RAYANA ARIANE PEREIRA;** MORENO, A. N.; OLIVEIRA, R. B.; STINGHEN, ANDRÉA EMILIA MARQUES. Papel da via PKC-B na expressão endotelial de MCP-1 após exposição a produtos de glicosilação avançada (AGES), 2012. Cidade: São Paulo; Evento: **XXVI Congresso Brasileiro de Nefrologia**.

### **NOTA BIOGRÁFICA**

Rayana Ariane Pereira Maciel, cursou de 2007 a 2010 bacharelado em Biomedicina (Habilitação em Análises Clínicas) no Centro Universitário Autônomo do Brasil (UniBrasil). Durante a graduação foi aluna no Programa de Iniciação Científica (IC), atuando na área de Genética Humana, com ênfase no estudo de Fibrose Cística. De 2011 a 2013 realizou o Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia (PPGMPP) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com o título do trabalho: “Avaliação da toxicidade urêmica (*p*-cresol e seus conjugados) na expressão de MCP-1 via ativação do NF- $\kappa$ B em células musculares lisas humanas”. De 2013 a 2014 trabalhou no Departamento de Qualidade da empresa Kasvi Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios e no Laboratório de Análises Clínicas Sugisawa como analista clínico. Em 2014 iniciou seus trabalhos no doutorado no PPGMPP da UFPR e sua carreira na docência no UniBrasil, local em que atua até os dias atuais lecionando as disciplinas de Microbiologia Humana para o curso de Enfermagem, Microbiologia Básica, Epidemiologia e Saúde Pública, Urinálise e Líquidos Corporais, Controle de Qualidade, Embriologia Humana e Estágio Supervisionado para o curso de Biomedicina.