

**CARLA CORRADI PERINI**

**INFLUÊNCIA DO ESTADO NUTRICIONAL NA FUNÇÃO  
LEUCOCITÁRIA DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA  
RENAL CRÔNICA EM HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – área de Análises Clínicas, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort Santos

**CURITIBA**

**2003**

## ***NOTA BIOGRÁFICA***

A autora graduou-se em Nutrição pela Universidade Federal do Paraná em 1999, tendo iniciado como nutricionista do Serviço de Hemodiálise da Clínica de Doenças Renais, na qual permanece até hoje. Em 2001, iniciou sua carreira como professora do Curso de Nutrição da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, onde assumiu o Programa de Aprendizagem Capacitação Prática em Nutrição Clínica, pelo qual é responsável até o momento. No ano de 2002, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Análises Clínicas, onde desenvolveu uma pesquisa sobre a influência do estado nutricional na expressão de moléculas de adesão e função dos leucócitos de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise, cujos resultados estão contidos nesta dissertação.

# **DEDICATÓRIA**

*Ao meu marido, Ronald.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e pela Sua presença em todos os momentos.

Ao meu marido Ronald, pelo amor, compreensão, apoio e participação constantes neste trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort Santos, pela paciência, dedicação, apoio e amizade, essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e familiares, em especial aos meus pais Enzo e Amélia Corradi, pelo estímulo e apoio na conquista dos meus objetivos.

A Fundação Pró-Renal e ao Dr. Miguel Carlos Riella, pelo apoio financeiro.

Aos pacientes da Clínica de Doenças Renais, sem os quais este trabalho não teria sentido em ser realizado; aos colegas de trabalho, pelo incansável estímulo e apoio durante a realização deste trabalho e à equipe de enfermagem, pelo auxílio na obtenção de material.

Às funcionárias da UFPR, Irene, Geni e Clarí, pela contribuição na organização do laboratório para as experimentações.

Ao professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes, do Departamento de Fisiologia/UFPR, que tornou possível a utilização do citômetro de fluxo e à estatística Stela Adami Vayego, pelo estudo estatístico constante nesta obra.

A Dra. Ilaria Bellantuono, pelos ensinamentos e auxílio em relação à citometria de fluxo e por propiciar-me novos horizontes para a pesquisa.

Às funcionárias do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas/UFPR, Farmacêuticas Margaret Ono, Elvira Missako Doi e Rosana I. S. I. Cattaneo, pelo auxílio com as dosagens de proteína C-reativa e escolha dos anticorpos monoclonais, respectivamente.

A todos os professores da UFPR, em especial aos professores Cid Aimbiré de Moraes Santos, Maria Suely Soares, Rogério Luiz Kopp, por suas colaborações que tornaram possível a realização desse trabalho.

Aos amigos Kettelin, Waldemar, Lílian, Fabiana, Danilo, Júlio, Mayra e Marília e colegas da Pós-graduação, pelas alegrias e tristezas compartilhadas durante os dois últimos anos.

## ***EPÍGRAFE***

*"A imaginação é mais poderosa do que o conhecimento. Ela amplia a visão, dilata a mente, desafia o impossível. Sem a imaginação o pensamento estagna".*

## SUMÁRIO

<b>NOTA BIOGRÁFICA</b> .....	ii
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>EPÍGRAFE</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
	2
1.1. A desnutrição e as respostas de defesa.....	
1.2. Insuficiência renal crônica e hemodiálise.....	3
1.3. Desnutrição em pacientes com IRC em HD.....	4
1.4. A inflamação em pacientes com IRC em HD.....	6
1.5. A inflamação e a resposta inflamatória.....	8
1.6. Insuficiência renal crônica, hemodiálise e citocinas.....	12
1.7. Fibronectina, moléculas de adesão e resposta inflamatória.....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1. SOLUÇÕES.....	24
3.1.1. Meios líquidos.....	24
3.1.1.1. Solução salina tamponada com fosfatos.....	24
3.1.1.2. PBS suplementado com albumina soro bovina.....	24
3.1.1.3. Solução hemolisante de Gey.....	24
3.1.1.4. Solução hemolisante <i>FACS™ Lysing Solution</i> .....	25

3.1.1.5. Solução de paraformaldeído.....	25
3.1.1.6. Solução de fibronectina.....	25
3.1.1.7. Solução de tripsina.....	25
3.1.1.8. Solução de soro fetal bovino.....	25
3.1.1.9. Meio RPMI 1640.....	25
<b>3.2. POPULAÇÃO ESTUDADA.....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Avaliação nutricional.....	26
3.2.1.1. Avaliação Subjetiva Global modificada.....	26
3.2.1.2. Antropometria.....	27
3.2.1.3. Exames laboratoriais.....	27
<b>3.3. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4. SEPARAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS HUMANOS..</b>	<b>27</b>
<b>3.5. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES.....</b>	<b>28</b>
<b>3.6. PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.7. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NA SUPERFÍCIE DOS LEUCÓCITOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8. ADESÃO CELULAR À FIBRONECTINA IMOBILIZADA.....</b>	<b>29</b>
3.8.1. Preparo das placas.....	29
3.8.2. Ensaio de adesão à fibronectina.....	29
<b>3.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA C-REATIVA (PCR) SÉRICA.....</b>	<b>30</b>
<b>3.10. DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>31</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
4.1. Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em leucócitos por citometria de fluxo.....	34
4.2. Adesão de leucócitos à fibronectina imobilizada.....	45
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>77</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Etapas de uma resposta inflamatória aguda.....	10
<b>Figura 2.</b> Interrelação entre uremia, desnutrição, inflamação, comorbidades, e citocinas em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.....	15
<b>Figura 3.</b> Estrutura básica da molécula de fibronectina e seus epítomos de interação.....	17
<b>Figura 4.</b> Microscópio invertido.....	30
<b>Figura 5.</b> Estratégia de seleção das diferentes populações de leucócitos para avaliação da expressão de moléculas de adesão por citometria de fluxo.....	35
<b>Figura 6.</b> Estratégia para análise da expressão de moléculas de adesão em monócitos por citometria de fluxo.....	37
<b>Figura 7.</b> Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nas diferentes populações de leucócitos de indivíduos saudáveis.....	38
<b>Figura 8.</b> Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nas diferentes populações de leucócitos de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) desnutridos em hemodiálise (HD).....	39
<b>Figura 9.</b> Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nas diferentes populações de leucócitos de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) eutróficos em hemodiálise (HD).....	40
<b>Figura 10.</b> Expressão de LFA-1 em leucócitos detectada por citometria de fluxo.....	41
<b>Figura 11.</b> Expressão de VLA-4 em leucócitos detectada por citometria de fluxo.....	43
<b>Figura 12.</b> Expressão de VLA-5 em leucócitos detectada por citometria de fluxo.....	44
<b>Figura 13.</b> Análise citológica de citocentrifugados das frações de granulócitos de pacientes eutróficos e desnutridos em hemodiálise.....	46



**Figura 14.** Adesão de leucócitos mononucleares a diferentes substratos... 48

**Figura 15.** Adesão de leucócitos granulócitos a diferentes substratos..... 49

### ***LISTA DE TABELAS***

**Tabela 1.** Manifestações sistêmicas principais da insuficiência renal crônica e uremia..... 7

**Tabela 2.** Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise e dos indivíduos saudáveis incluídos neste trabalho..... 33

**Tabela 3.** Tipos celulares das frações de granulócitos e mononucleares obtidas de pacientes desnutridos e eutróficos com insuficiência renal crônica em hemodiálise incluídos neste estudo..... 45

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS***

Atm	atmosfera
$\beta_1$	beta <sub>1</sub>
$\beta_2$	beta <sub>2</sub>
BSA	soro albumina bovina
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CF	citometria de fluxo
CLT	contagem de linfócitos totais
CSF	fatores estimulantes de colônias
DGEA	seqüência peptídica asparagina-glicina-ácido glutâmico-alanina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EDTA-K <sub>3</sub>	etilenodiaminotetracetato tripotássico
EILDV	seqüência peptídica ácido glutâmico-isoleucina-leucina-asparagina-valina
ELAM-1	denominação alternativa para E-seletina
EPM	erro padrão da média
E-seletina	seletina expressa em células endoteliais
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FN	fibronectina
FSC	<i>forward side scatter</i>
<i>g</i>	aceleração da gravidade
g	gramas
GF	fatores de crescimento
GM-CSF	fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
GNC	granulócitos
HD	hemodiálise
HDD	grupo de pacientes desnutridos em hemodiálise
HDDini	grupo de pacientes desnutridos em hemodiálise no início da diálise
HDDfim	grupo de pacientes desnutridos em hemodiálise no final da diálise
HDE	grupo de pacientes eutróficos em hemodiálise
HDEini	grupo de pacientes eutróficos em hemodiálise no início da diálise
HDEfim	grupo de pacientes eutróficos em hemodiálise no final da diálise
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule 1
IL	<i>interleucina</i>
IFN	<i>interferons</i>
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4

IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IMC	índice de massa corporal
IRC	insuficiência renal crônica
KCl	cloreto de potássio
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	fosfato monobásico de potássio
Kt/V	índice de adequacidade de diálise
LFA-1	leukocyte function associated antigen 1
LIN	<i>linfócitos</i>
L-seletina	<i>seletina expressa em leucócitos</i>
MA	<i>molécula de adesão</i>
Mac-1	<i>CD11b/CD18</i>
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MIF	migration inhibitory factor
$\text{MgCl}_2$	<i>cloreto de magnésio</i>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	sulfato de magnésio heptahidratado
Min	minuto
mmol	milimolar
M/F	masculino/feminino
MNC	células mononucleares
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetros
mmol/l	milimolar por litro
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{m}$	micrometro
MON	monócitos
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	fosfato dissódico
NaOH	hidróxido de sódio
$\text{NH}_4\text{Cl}$	cloreto de amônio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	fosfato monossódico di-hidratado
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , solução salina tamponada com fosfatos
PCR	proteína C reativa
PE	ficoeritrina
pH	potencial hidrogênioônico
PMN	polimorfonucleares
PS/CA	polissulfona/acetato de celulose
P-seletina	seletina expressa em plaquetas
PUC/PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
p/v	peso por volume
$R_1$	região correspondente aos linfócitos
$R_2$	região correspondente aos monócitos
$R_3$	região correspondente aos granulócitos
RGD	seqüência peptídica arginina-glicina-ácido aspártico

RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SGA	avaliação subjetiva global
SGAm	avaliação subjetiva global modificada
SFB	soro fetal bovino
SSC	<i>side light scatter</i>
T.A.	temperatura ambiente
TGF	<i>tumor growth factor</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i> , fator de necrose tumoral-alfa
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA	<i>very late antigen</i>
VLA-4	very late antigen 4
VLA-5	very late antigen 5
v/v	<i>volume por volume</i>

## **RESUMO**

Perda progressiva e irreversível da função renal é a condição física que leva muitos pacientes com insuficiência renal crônica a recorrerem à hemodiálise (HD) como recurso terapêutico. Além da função renal precária, esses pacientes geralmente apresentam-se imunocomprometidos e com um estado inflamatório crônico, caracterizado pelo aumento de citocinas inflamatórias na circulação, as quais estimulam células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, ligantes para as integrinas leucocitárias LFA-1 e VLA-4, respectivamente.

A desnutrição continua sendo um achado comum nesses pacientes, está associada à diminuição do peso corporal, depleção de tecido adiposo e perda de massa muscular, bem como à diminuição dos níveis plasmáticos de albumina, transferrina, pré-albumina e outras proteínas viscerais.

A desnutrição, assim como a inflamação, está associada ao aumento da morbidade e da mortalidade dos pacientes em HD. Não se tem conhecimento até o momento, de estudos correlacionando o estado nutricional dos pacientes em HD crônica com a expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes ou com a qualidade funcional dessas células.

Neste trabalho, investigou-se a influência do estado nutricional desses pacientes na expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5, moléculas de adesão mediadoras de várias funções leucocitárias por citometria de fluxo e estudou-se, em particular, sua capacidade de adesão à fibronectina, uma das principais proteínas da matriz extracelular.

Os resultados aqui apresentados demonstram que o estado nutricional não influencia os níveis de expressão de LFA-1 e VLA-4 em pacientes renais crônicos em hemodiálise e que seus valores muito se aproximam daqueles obtidos numa população sadia e que, de fato, o processo dialítico colabora no aumento de sua expressão. Em contraste, a expressão de VLA-5, particularmente em granulócitos, mostrou-se significativamente elevada em pacientes desnutridos quando comparados a um grupo controle composto de indivíduos sadios, e a um grupo de pacientes com estado nutricional adequado, em especial após o processo dialítico.

Entretanto, a função de adesão desses mesmos leucócitos revelou-se francamente comprometida, revelada pela significativa queda na sua capacidade de interagir com a fibronectina.

Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados aqui apresentados e as informações deles derivadas revelaram alguns dos mecanismos contribuintes do estado inflamatório crônico presente em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise e podem servir como uma base preliminar de dados que sustente futuros investimentos experimentais. Além disso, espera-se que este estudo incentive mudanças na prática clínica e dietoterápica, visando melhorar as condições de vida desses pacientes.

**Palavras chaves:** doença renal crônica, hemodiálise, desnutrição, inflamação, moléculas de adesão, fibronectina.

## **ABSTRACT**

*Progressive and irreversible deterioration of renal function is a common feature of chronic renal disease patients and frequent haemodialysis (HD) is undertaken as a treatment for their health improvement. Apart from the precarious renal condition, these patients are usually immunocompromised and associated with a chronic inflammatory condition, characterised by high levels of serum inflammatory cytokines, which stimulate the endothelial cells to over express cell adhesion molecules such as ICAM-1 e VCAM-1, ligands for the leukocyte integrins LFA-1 and VLA-4, respectively.*

***Malnutrition is a common finding in these patients as shown by their low anthropometric indices, skinfold thickness, and low body mass index as well as low serum levels of albumin, transferrin, pre-albumin and other visceral proteins.***

*Malnutrition, along with inflammation, corroborates for the morbidity and high incidence of mortality in HD patients. So far, no studies have been undertaken to demonstrate whether a correlation between the nutritional status of these patients and the levels of cell adhesion molecule expression on their peripheral leukocytes or their functional capabilities exists.*

*With this aim, in this work we have investigated the influence of the HD patients' nutritional status on the expression of LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on peripheral leukocytes, cell adhesion molecules known to mediate several leukocyte functions, using flow cytometry. Also, we have evaluated the functionality of these cells in adhering to immobilised fibronectina, one of the most important extracellular matrix proteins.*

*The data herein presented showed that there is no influence of the nutritional status of HD chronic renal disease patients on the leukocyte expression of LFA-1 and VLA-4, which were found to be close to the levels presented by healthy people leukocytes. Also, the dialysis process influences their expression.*

*On the other hand, the expression of VLA-5, particularly on granulocytes, has shown to be significantly higher in undernourished HD patients when compared with those from healthy controls or with those of HD patients presenting adequate nutritional status, especially after haemodialysis. However, the adhesion capacity of these cells is somehow compromised as revealed by its significant lower ability to interact with immobilised fibronectin.*

*Although further studies are needed, the results and suggestions presented in this work have shed some light into the possible mechanisms involving the inflammatory conditions of these patients and may be used as a database to support further experimental work. Moreover, we hope that this*

*study will collaborate to the improvement of the disease treatment and changes in clinical and nutritional practices of the HD patients in the (not distant) future.*

**Key words:** *chronic renal disease, haemodialysis, malnutrition, inflammation, cell adhesion molecules, fibronectin.*