

1. INTRODUÇÃO

Em contraste com o elevado grau de desenvolvimento tecnológico conquistado pelo homem, particularmente em relação à produção de alimentos, há ainda um grande número de indivíduos que apresenta deficiência alimentar ou alguma forma de desnutrição, sendo esta, na maioria das vezes, decorrente de problemas políticos, econômicos e sociais (Banerji, 1988). Quando estes problemas se associam a uma doença crônica e às suas conseqüências sobre o estado geral do indivíduo, ampliam-se os efeitos devastadores da desnutrição.

A desnutrição pode ter origem na deficiência ou ausência de qualquer nutriente e sua instalação e gravidade dependem da causa, intensidade e duração da carência. Como causa primária tem-se a dieta inadequada e, secundariamente, absorção deficiente, aumento da utilização de nutrientes ou ainda, excreção e/ou perda excessiva destes (Ferro-Luzzi e Spadoni, 1978).

A desnutrição calórico-protéica, ou desnutrição energético-protéica, é definida como uma “condição patológica diversa relacionada com a perda, em várias proporções, de proteínas e calorias” (WHO, 1973). Geralmente é causada pela depleção protéica combinada com vários graus de deficiência energética e, freqüentemente associada a processos infecciosos. Pode também, estar relacionada a um contexto de múltiplas deficiências e estresse prolongado (Ferro-Luzzi e Spadoni, 1978).

Na desnutrição, observam-se alterações nos metabolismos protéico, de lipídios e de carboidratos. Normalmente, há um balanço nitrogenado negativo, com modificações no padrão plasmático de aminoácidos, privilegiando a síntese de determinados componentes em detrimento de outros em alguns órgãos e tecidos às custas de proteína muscular (Ferro-Luzzi e Spadoni, 1978). No metabolismo de carboidratos, observa-se geralmente uma redução na atividade das dissacaridases da mucosa intestinal, acompanhada de hipoglicemia, alteração dos níveis de insulina e glucagon e aumento da gliconeogênese (Waterlow e Alleyne, 1971). Níveis séricos diminuídos de lipídios e esteatose hepática também são relatados (Redmond *et al.*, 1991).

Situações de desnutrição envolvem deficiências não somente de proteínas e calorias, mas também de minerais e vitaminas (Beisel, 1984; Descombes *et al.*, 1993), o que pode conduzir a modificações hormonais. As anormalidades nos hormônios circulantes podem ser ocasionadas por alterações na sua síntese, na velocidade de secreção, de depuração ou mesmo de sua ligação a proteínas. Estas variações provavelmente representam modificações adaptativas do organismo decorrentes do estado nutricional (Becker, 1983).

1.1. A desnutrição e as respostas de defesa

A desnutrição *per se* modifica os mecanismos de defesa do organismo, pois compromete os órgãos hematopoiéticos e linfóides responsáveis pela produção, manutenção e função das células que medeiam esses processos (Chandra, 1991).

Uma das características do sistema hematopoiético é o seu alto poder proliferativo, onde um número muito limitado de células primordiais, residentes na medula óssea de adultos, possui a habilidade de produzir todos os diferentes tipos celulares presentes no sangue periférico. Enquanto eritrócitos e plaquetas atuam no transporte de gases e na manutenção da homeostasia, respectivamente, a coleção de leucócitos circulantes possui papel fundamental nos mecanismos de defesa, específicos ou não (Lee *et al.*, 1999).

Para a contínua reposição e manutenção dessas células na circulação, a medula óssea possui pelo menos três compartimentos que abrigam células hematopoiéticas em diferentes estágios de maturação. Desses, o compartimento de reserva é aquele que é capaz de prover o número de células necessário em uma situação de emergência, pois se constitui de células maduras e funcionais, além das células em estágios finais de maturação (Lee *et al.*, 1999). A entrada de leucócitos no sangue periférico só ocorre fisiologicamente após a célula atingir certo grau de maturação (Quesenberry e Colvin, 2001) e, uma vez na circulação, essas células, especialmente os granulócitos, distribuem-se axialmente formando o chamado *pool* marginal – constituído de leucócitos situados mais próximos à margem do vaso, e o *pool*

circulante, constituído de leucócitos localizados mais centralmente no vaso (Quesenberry e Colvin, 2001). Entretanto, há um intercâmbio dinâmico e balanceado entre as células pertencentes a esses dois *pools*.

Os diferentes níveis do processo de hematopoiese são influenciados pela ação de fatores de crescimento e citocinas, de hormônios, de mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória e, obviamente, pelo estado nutricional (Peters *et al.*, 1972; Keenan *et al.*, 1982; Blatt *et al.*, 2003), pois o tecido hematopoiético, assim como todos aqueles que exibem alta taxa de renovação e proliferação celulares, apresenta elevada exigência de nutrientes.

A resistência do hospedeiro a infecções, desde a proliferação, diferenciação e o recrutamento de células sangüíneas dos diferentes compartimentos hematopoiéticos para a circulação e desta para os tecidos, assim como o desempenho funcional dessas células como a fagocitose, por exemplo, dependem primariamente da habilidade dessas células em aderir a substratos protéicos presentes no estroma medular, na superfície celular ou no endotélio vascular, mediante interação com proteínas componentes da matriz extracelular, particularmente colágeno e fibronectina, dentre outras, por meio de diferentes moléculas de adesão e, em seguida, de responder funcionalmente ao estímulo desencadeador, como será exposto nos itens que se seguem.

1.2. Insuficiência renal crônica e hemodiálise

A insuficiência renal crônica (IRC) caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível das funções secretórias, de filtração e excreção, dentre outras, dos rins (Martins e Riella, 2001). No seu estágio final, seus portadores necessitam de uma terapia de substituição renal, sendo a hemodiálise (HD) uma das mais comuns. Neste procedimento, uma circulação extracorpórea faz-se necessário para que a filtração seja realizada. Para tanto, utiliza-se filtros ou hemodialisadores constituídos de material biocompatível, com dois compartimentos, sendo um para o sangue e o outro para a solução de diálise (dialisato), os quais são separados por uma membrana semipermeável. Dessa forma, o sangue entra em contato não apenas com esta membrana, mas

também com o dialisato para que, por difusão e osmose, metabólitos indesejáveis (como uréia e creatinina, por exemplo), eletrólitos e líquidos excessivos no sangue do indivíduo sejam excretados, amenizando os sintomas por eles causados. Entretanto, a HD causa efeitos indesejáveis aos indivíduos a ela submetidos, sobretudo com relação ao estado nutricional, como a perda de nutrientes e o catabolismo aumentado. Perda de glicose e aminoácidos ocorre, principalmente, devido à composição do dialisato e ao fato de que as membranas de diálise não possuem capacidade de filtração seletiva como os rins. Por outro lado, o contato do sangue com as membranas de diálise e com o dialisato pode proporcionar um estado inflamatório crônico, contribuindo para o catabolismo aumentado (Martins e Riella, 2001).

1.3. Desnutrição em pacientes com IRC em HD

A desnutrição é considerada comum em pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise (Riella, 2000; Stenvinkel, 2001). Evidências de desnutrição calórico-protéica têm sido demonstradas em vários estudos (Markmann, 1988; Bilbrey e Cohen, 1989; Cianciaruso *et al.*, 1995), com aproximadamente 6-8% dos pacientes avaliados sofrendo de desnutrição grave contra 33% portadores de desnutrição leve a moderada, sendo a ingestão deficiente de energia e proteínas sua maior causa (Jacob *et al.*, 1990). Um dos maiores e mais completos estudos multicêntricos sobre desnutrição em pacientes em HD revelou que 23% dos pacientes estudados apresentavam ingestão calórico-protéica insuficiente causada, principalmente, pela anorexia (Schoenfeld *et al.*, 1983; Alvestrand, 1990; Jacob *et al.*, 1990). Esta pode ser decorrente da toxicidade urêmica, dos efeitos debilitantes da doença crônica, da depressão emocional e das enfermidades associadas, como as infecções, que podem tanto reduzir o apetite como aumentar o catabolismo do paciente (Kopple, 1988).

A anorexia tem, também, sido atribuída às restrições rigorosas de sódio, potássio e líquidos, tornando a dieta desses pacientes pouco palatável e de difícil aderência, assim como o uso prolongado de medicamentos, que pode

competir com a ingestão alimentar e/ou promover a redução do apetite (Martins e Riella, 2001).

Fatores psicológicos vêm sendo apontados como causadores de anorexia nos pacientes em HD, refletido pela alta taxa de resistência em atender às recomendações nutricionais apresentada por essa população, provavelmente porque o tratamento de diálise envolve ajustes em vários aspectos da rotina do indivíduo, levando a mudanças no seu estilo de vida (Chan e Greene, 1994).

Como a anorexia, outros fatores podem interferir na ingestão alimentar desses pacientes. Dentre eles, destacam-se as disfunções gastrointestinais, como náuseas, vômitos, gastrite, diarreia e obstipação, que interferem não apenas na ingestão, mas também na digestão e absorção de nutrientes.

A fadiga pós-diálise, os episódios hipotensivos intradiáliticos e a necessidade freqüente de hospitalização devido a problemas intercorrentes, podem, também, prejudicar a ingestão adequada de nutrientes (Martins e Riella, 2001).

As restrições financeiras e a condição de pobreza, comuns nessa população, contribuem para com a ingestão alimentar deficiente por dificultar diretamente a aquisição de alimentos. Além disso, a presença de deficiências físicas e mentais pode impedir a seleção, compra, preparo e ingestão alimentar. Neste sentido, um exemplo comum nesses pacientes é a má condição da dentição ou mesmo a inexistência de prótese dentária (Martins e Riella, 2001).

Além da ingestão alimentar deficiente apontada, o catabolismo aumentado parece ser outro fator determinante para a desnutrição desses pacientes e está relacionado, principalmente, à perda de nutrientes durante o procedimento hemodialítico (Alvestrand, 1990; Gutierrez *et al.*, 1990; Descombes *et al.*, 1993; Stevenson, 1998), ao estado inflamatório generalizado desses pacientes, assim como às anormalidades endócrinas e enfermidades associadas (Martins e Riella, 2001).

A desnutrição geralmente envolve a diminuição do peso corporal, a depleção de reservas energéticas (tecido adiposo) e a perda de massa muscular, além da diminuição dos níveis plasmáticos de albumina, transferrina

e pré-albumina (Kaysen *et al.*, 2000), as quais têm sido utilizadas como indicadores do estado nutricional (Stenvinkel, 2001).

Alguns destes parâmetros fazem parte da Avaliação Subjetiva Global (SGA), cujo uso é recomendado pelo *National Kidney Foundation – Dialysis Outcomes Quality Initiative* (Kopple, 2001). A SGA é uma técnica que identifica a desnutrição baseando-se não só nas alterações físicas do indivíduo, como perda de peso corporal, ocorrência de depleção de tecido adiposo e muscular, alterações na ingestão alimentar e presença de sintomas gastrintestinais, como também considera as doenças associadas (Tabela 1) e tem se mostrado como um preditor de mortalidade, sendo amplamente adotada devido ao seu baixo custo, fácil realização e aplicabilidade em grandes populações (Baker *et al.*, 1982).

1.4. A inflamação em pacientes com IRC em HD

Como referido anteriormente, pacientes com IRC em HD são portadores de um estado inflamatório crônico, caracterizado por uma reação imediata (ou de fase aguda), onde níveis séricos elevados de proteína C-reativa (PCR), fibrinogênio, α 2-microglobulina, dentre outras proteínas, contrastam com baixos níveis de albumina (Kaysen *et al.*, 1997). A concentração de PCR, assim denominada por ligar-se avidamente ao polissacarídeo C de pneumococos, tem sido inclusive usada como um fator preditivo independente de morte nesses pacientes (Bergström, 1995; Iseki *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999) que, mesmo sendo um marcador inespecífico de inflamação (Ikizler *et al.*, 1999), está presente em 30-50% dos pacientes em HD (Qureshi *et al.*, 1998).

O mecanismo patológico exato do estado inflamatório presente em pacientes com IRC em HD não está totalmente esclarecido e, por ser multifatorial, é certamente complexo (Stevenson, 1998).

A redução da função renal *per se* já contribui para com ele, devido às conseqüências sistêmicas causadas pelo estado urêmico desses pacientes (Riella, 2000), envolvendo manifestações gastrintestinais, neuromusculares,

hematológicas, cardiopulmonares, dentre outras pormenorizadas na Tabela 1 (Cotran *et al.*, 1994).

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

Líquidos e Eletrólitos
Desidratação
Edema
Hiperpotassemia
Acidose metabólica
Fosfato de Cálcio e Ossos
Hiperfosfatemia
Hipocalcemia
Hipertireoidismo secundário
Osteodistrofia renal
Hematológicas
Anemia
Diátese hemorrágica
Cardiopulmonares
Hipertensão
Edema pulmonar
Insuficiência cardíaca
Pericardite urêmica
Gastrintestinais
Náuseas e vômitos
Sangramento
Esofagite, gastrite, colite
Neuromusculares
Neuropatia periférica
Encefalopatia
Dermatológicas
Prurido
Dermatite
Pigmentação amarelada

Adaptado de Cotran et al, 1994.

A uremia por si só, assim como a desnutrição, predispõe esses pacientes a infecções freqüentes, as quais, em contra-partida, comprometem as respostas inflamatória e imunitária (Riella, 2000; Schömig *et al.*, 2000).

Acrescente-se, ainda, o processo dialítico propriamente dito ao qual esses pacientes são regularmente submetidos. Como já citado, durante a HD,

o sangue entra em contato com superfícies estranhas como membranas artificiais que, embora confeccionadas com material compatível, promovem vários eventos que também desencadeiam uma resposta inflamatória, com simultânea elevação dos níveis séricos de proteínas de fase aguda. Importante ressaltar que essas proteínas ditas de “fase aguda” são sintetizadas principalmente pelo fígado quando estimulado por processos infecciosos ou traumáticos agudos e, em menor grau, por monócitos, fibroblastos, adipócitos e células endoteliais (Schömig *et al.*, 2000).

Diante de todos esses fatores, torna-se evidente que a reação inflamatória ocupa posição central da maioria, senão de todos, os processos localizados ou sistêmicos que estão simultaneamente presentes em pacientes em HD e concorrem para o agravamento da sua saúde.

1.5. A inflamação e a resposta inflamatória

A reação orgânica aguda que se verifica em uma inflamação é, fundamentalmente, uma resposta de defesa e proteção do organismo lesado contra o agente agressor e as conseqüências que ele pode vir a causar. É um fenômeno estereotipado, cujos sinais rubor, tumor, calor e dor foram primeiramente descritos por Celsius há 178 a.C. e, a estes, Galeno adicionou a perda de função (Cotran *et al.*, 1994). Atualmente, sabe-se que estes sinais são conseqüências da liberação de substâncias químicas encontradas no local da lesão, particularmente as citocinas (Silva, 1978; Sedgwick e Willoughby, 1985).

As citocinas inflamatórias são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores das respostas vascular e celular desencadeadas pelo estímulo inflamatório agudo. Dentre elas, destacam-se as interleucinas 1 (IL-1), IL-6 e IL-8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Springer, 1994; Cassatela, 1995; Springer, 1995) e sua relação com a IRC e a HD será tratada mais adiante nesta introdução.

No decorrer de um processo infeccioso ou inflamatório agudo, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular

devido à sua ativação por mediadores da inflamação, liberados por elementos presentes na área de lesão, tais como bactérias, células lesadas ou frações do complemento, passando a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida, aderem-se firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso (Smith *et al.*, 1979). Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (Dekker e Segal, 2000).

Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenvolver de um processo inflamatório agudo: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do endotélio vascular e (3) migração em direção ao estímulo quimiotático (Dekker e Segal, 2000; Mackai e Rosen, 2000). A Figura 1 ilustra, de forma esquemática, esses eventos.

Uma função crítica da inflamação é a migração de células especializadas provenientes do sangue periférico para o tecido conjuntivo no qual se situa o foco inflamatório. Estudos recentes têm demonstrado que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (Mackai e Rosen, 2000). Esses experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (Bokoch, 1995; Dekker e Segal, 2000).

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios destacam-se os granulócitos (GNC) circulantes no sangue periférico. Dentre esses, há os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleares (PMN), que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microorganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve (1) reconhecer seletivamente o agente agressor, responder apropriadamente por meio de (2) locomoção, (3) fagocitose do microorganismo e sua (4) subsequente destruição. Para tanto, possuem a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário,

também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (Cassatela, 1995).

O neutrófilo é uma célula que participa da defesa inata e, nos tecidos, está presente em todas as portas de entrada do organismo humano que fazem contato com o meio externo. Com um tempo de vida média na circulação de aproximadamente sete horas (Quesenberry e Colvin, 2001), passam a maior parte desse tempo trafegando no sangue periférico, num processo passivo.

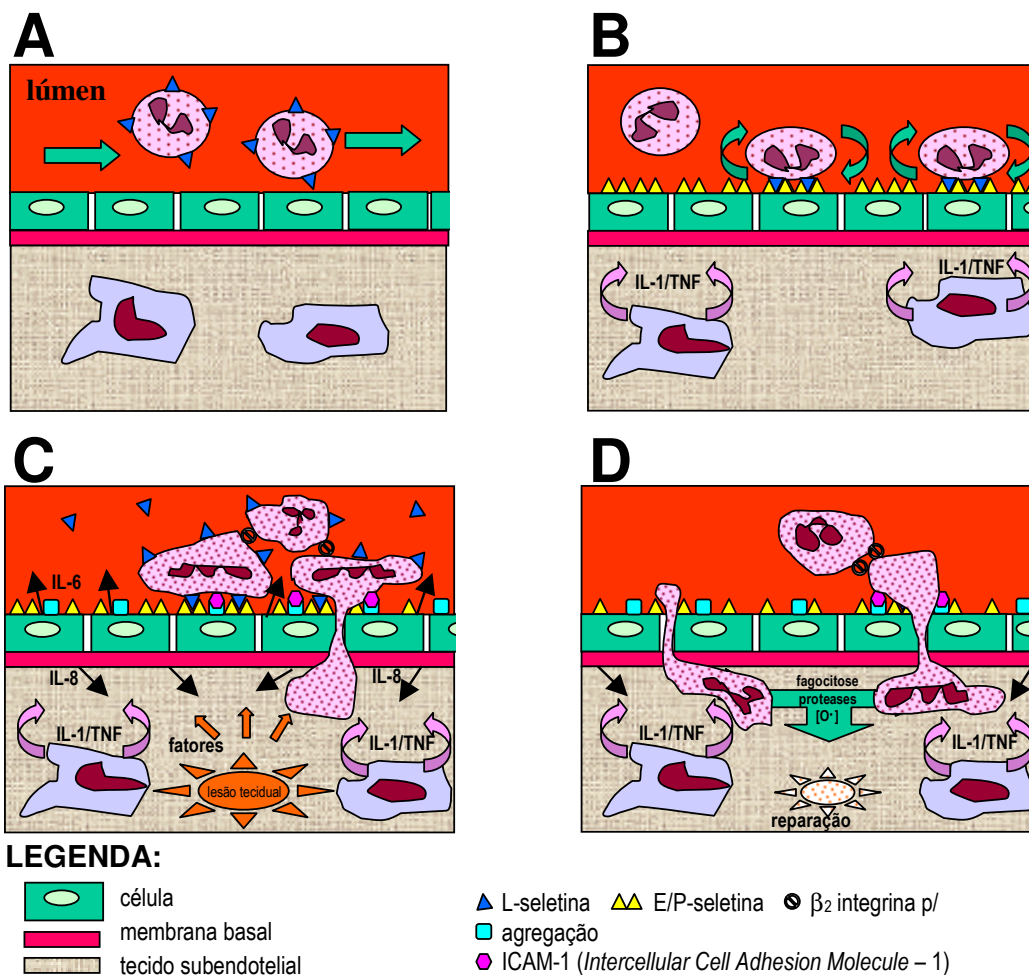


Figura 1. Etapas de uma resposta inflamatória aguda. (A) Leucócitos, especialmente neutrófilos, expressam L-seletina e trafegam livremente na circulação. (B) Durante uma lesão local, macrófagos teciduais liberam citocinas inflamatórias como IL-1 e TNF, as quais ativam células endoteliais, que passam a expressar E/P-seletinas, que servem como receptores para a E-seletina leucocitária, promovendo adesão e rolamento sobre o endotélio vascular. (C) Células endoteliais ativadas expressam ICAM-1, que funciona como receptor para integrinas β_2 que, após interação, estimulam a transmigração dos leucócitos pelo endotélio (diapedese), em direção ao foco de injúria. Migração transendotelial de neutrófilos ativados é estimulada por fatores quimiotáticos como IL-8, por exemplo, ou peptídeos bacterianos *N*-formilados. Quimiocinas ativam neutrófilos, com

Para o mesmo número de neutrófilos que está circulando no leito central do vaso, tem-se igual quantidade na porção mais periférica, próxima ao endotélio, representando o subcompartimento marginal, ou *pool* marginal, como anteriormente exposto.

Para que o organismo possa atender a uma demanda tecidual extra de PMN como, por exemplo, no combate a patógenos invasores ou em uma inflamação aguda, a medula óssea dispõe do *pool* de reserva, composto por neutrófilos segmentados e seus precursores imediatos, os neutrófilos bastonetes e os metamielócitos. Assim, quando necessário, um maior número de neutrófilos pode ser lançado na corrente circulatória, colaborando com a leucocitose observada, geralmente acompanhada do aumento do número de formas segmentadas (neutrofilia) e de bastonetes (Lee *et al.*, 1999).

Quando os processos fisiológicos imediatos da resposta inflamatória não conseguem eliminar o agente agressor, com persistência dos efeitos lesivos por ele causado, instala-se uma situação crônica, cuja longevidade acaba por comprometer a saúde do indivíduo. Exemplos clássicos de processos inflamatórios que se iniciam de forma aguda e, por falta de resolução, cronificam, são dados pelas úlceras duodenais ou do estômago, infecções como a tuberculose e a sífilis, doenças autoimunes, como a artrite reumatóide e o lupus eritematoso sistêmico, dentre outros.

A exposição prolongada a agentes endógenos com potencial tóxico, quando não eliminados, podem também levar a uma condição inflamatória crônica e, como exemplos clássicos, tem-se a aterosclerose, que resulta de níveis persistentemente elevados de componentes lipídicos na circulação (Cotran *et al.*, 1994). É neste contexto que também se encaixa o processo inflamatório crônico comumente presente em pacientes com IRC em HD, onde

níveis elevados de uréia, creatinina, ácido úrico e outros produtos de catabolismo acumulam-se na circulação, particularmente por deficiência de filtração renal, gerando um estado clínico definido como uremia.

Em contraste com a reação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por uma maior infiltração de células mononucleares (MNC), incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (Cotran *et al.*, 1994). Dentre essas células, os macrófagos ocupam posição de destaque comparável ao papel principal desempenhado pelos PMN na reação aguda.

Os macrófagos são células que se originam dos monócitos circulantes que, por sua vez e à semelhança dos GNC, são descendentes de progenitores hematopoiéticos presentes na medula óssea (Lee *et al.*, 1999). Após diapedese, os monócitos se distribuem nos mais diferentes tecidos do organismo dos mamíferos, onde se transformam em macrófagos especializados, recebendo, inclusive, nomenclatura de acordo com o tecido onde residem (Reeves e Todd, 2000).

Em contraste com um tempo de vida de cerca de 24 horas para os monócitos circulantes, os macrófagos sobrevivem por vários meses, durante os quais, ao responderem a vários estímulos, especialmente de citocinas, tornam-se ativados e capazes de exercer inúmeras funções, como proliferação, síntese, armazenamento e secreção de moléculas biologicamente ativas (enzimas proteolíticas, componentes do sistema complemento, fibronectina, α_2 -macroglobulina, fatores de coagulação, prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas *etc*), atuam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos, tornando-se coadjuvantes indispensáveis na resposta imunitária, produzem reagentes metabólitos do oxigênio e outras moléculas importantes para a eliminação de microorganismos, além de participarem ativamente nos processos de reparo e regeneração tecidual (Cotran *et al.*, 1994; Reeves e Todd, 2000).

Assim como acontece com os neutrófilos, monócitos são continuamente recrutados da circulação por responderem com avides aos estímulos recebidos. Em contrapartida, todas as células envolvidas nos mecanismos de

defesa exercem, com competência, suas funções, amplificando o quadro inespecífico de uma resposta inflamatória persistente.

1.6. Insuficiência renal crônica, hemodiálise e citocinas

Com o exposto até aqui, não resta dúvidas de que um estado inflamatório persistente existe em pacientes com IRC, amplificado pelas freqüentes sessões de hemodiálise e que as citocinas ocupam posição de destaque por serem os agentes não só desencadeadores, mas também mantenedores do processo crônico.

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, secretadas no meio extracelular por diferentes tipos celulares, onde podem exercer efeitos locais sobre células semelhantes (atividade autócrina) ou à distância (efeito parácrino). Devido às suas origens, ora operacional, ora conceitual, o termo “citocina” tem sua definição confusa e uma sobreposição de definições é freqüentemente observada. Poderia ser definida como um grupo heterogêneo de moléculas sinalizadoras intercelulares solúveis, englobando mais de uma centena de moléculas denominadas, muitas vezes, de interleucinas (IL), interferons (IFN), fatores de crescimento (GF), fatores estimulantes de colônias (CSF) ou quimiocinas (Balkwill, 1997).

Essas moléculas possuem uma série de características comuns e essenciais, das quais destacam-se sua natureza hormonal, sua secreção em quantidades diminutas por diferentes células e em diferentes órgãos em resposta a uma variedade de agressões, servindo como mediadoras e reguladoras, principalmente, das respostas inflamatória e imunitária; atuam em receptores de alta afinidade presentes nos mais variados tecidos e órgãos, induzindo respostas complexas, com efeitos, em sua maioria, de curto prazo; são pleiotrópicas, induzindo diferentes efeitos em células-alvo, ou seja, são produzidas por diferentes tipos celulares, mas atuam sobre vários tipos celulares com funções distintas; algumas possuem efeitos redundantes, isto é, possuem natureza diferente, mas exercem o mesmo efeito, compartilhando as mesmas propriedades; muitas possuem efeitos de interação, tais como sinergismo, efeito aditivo (ou potencializador), antagônico e efeito em cascata,

trabalhando em conjunto, formando o que se denomina “rede de citocinas”. Com hormônios e neurotransmissores, coordenam interações rápidas e dinâmicas entre células, culminando em respostas celulares complexas, porém estritamente controladas nos níveis transcricional, de tradução, secreção e até, muitas vezes, no de ativação do precursor. Essas atividades são decorrentes de sua interação com receptores presentes na superfície das células e na matriz extracelular (Bokoch, 1995; Dekker e Segal, 2000), os quais respondem através de uma sucessão de interações e desacoplamentos de suas subunidades até a associação final com uma enzima-alvo, a qual se torna uma ativadora de moléculas sinalizadoras ou mensageiros secundários (Alberts *et al.*, 1994).

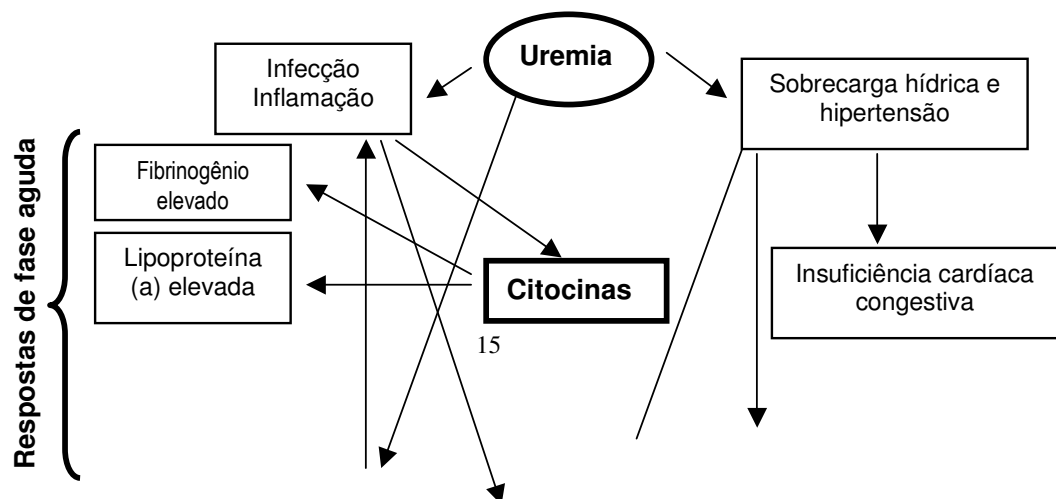
A ativação de um receptor, independente de sua família ou do mecanismo de transdução por ele desencadeado, direciona o comportamento celular e culmina no desencadeamento de uma ou mais atividades celulares, incluindo os mecanismos observados nas respostas inflamatórias como a mobilização de Ca^{+2} intracelular (Hallet *et al.*, 1990), rearranjo do citoesqueleto (Smith *et al.*, 1979), exocitose, indução da expressão de receptores de superfície, mudanças na adesão e agregação (Smith *et al.*, 1979), indução da produção de superóxidos (Simchowitz e Spilberg, 1979; Thelen *et al.*, 1993), aumento da atividade metabólica (Bokoch, 1995), da quimiotaxia (Zigmond, 1977), indução à apoptose (Vaux, 2002), dentre outras, como revisado recentemente por Dudez e colaboradores (Dudez *et al.*, 2002).

As citocinas podem ser classificadas em quatro categorias funcionais: (1) as que medeiam a imunidade natural, tais como a IL-1, TNF- α , IFN- α e IL-8; (2) as que regulam a proliferação, ativação e diferenciação de linfócitos, como a IL-2, 4, 5, 10 e 12, TGF (*Tumor Growth Factor*) - β ; (3) as que ativam células inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e β , MIF (*Migration Inhibitory Factor*); e (4) aquelas que estimulam a hematopoiese, como os GF e os CSF. Entretanto, esta classificação funcional, embora conveniente, é arbitrária, pois as citocinas, como visto, caracterizam-se por um número de ações diferentes, atividades redundantes e elevada capacidade de interagir umas com as outras, demonstrando desempenho funcional coletivo e pleiotrópico.

Inúmeros efeitos das citocinas, isoladas ou em combinações, foram observados tanto *in vitro* como *in vivo* e os resultados observados dependiam fundamentalmente do contexto no qual as células recebiam os sinais (Cotran *et al.*, 1994). Neste cenário, torna-se óbvio entender que uma produção inapropriada de citocinas ou um desequilíbrio na sua ativação podem contribuir de forma eficaz na patogênese de várias doenças ou acentuar o quadro clínico de doenças já instaladas.

Níveis elevados de citocinas inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α já foram descritos na circulação de pacientes com IRC em HD (Pereira *et al.*, 1994; Stenvinkel, 2001) decorrentes do processo dialítico freqüente (Tielemans *et al.*, 1996; Bergström e Lindholm, 2000; Pertosa *et al.*, 2000; Schindler *et al.*, 2000), do estado urêmico (Schömig *et al.*, 2000) e inflamatório vigentes (Riella, 2000), assim como da presença de comorbidades, por exemplo, insuficiência cardíaca congestiva (Roumen *et al.*, 1993; Rixen *et al.*, 1996).

Dentro deste quadro complexo, insere-se o estado desnutrido comum desses pacientes, o qual, direta ou indiretamente, colabora para com o seu agravamento, pois há evidências de que as citocinas interferem com o apetite por diminuição da motilidade gastrointestinal, modificação da secreção gástrica, assim como estimulação da gliconeogênese, com conseqüente aumento da proteólise no músculo esquelético, diminuição da síntese de albumina, promoção da oxidação de glicose, da síntese hepática de ácidos graxos e de proteínas de fase aguda (Dinarello, 1984; Beutler, 1988; Heinrich *et al.*, 1990; Plata-Salamán, 1998), fechando um círculo vicioso de natureza sistêmica, muito bem caracterizado na Figura 2.



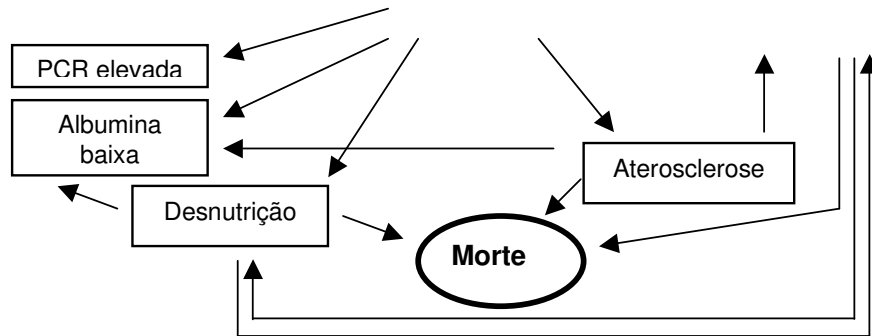


Figura 2. Interrelação entre uremia, desnutrição, inflamação, comorbidades e citocinas em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise. (Adaptado de Schömig, Eisenhardt e Ritz, 2000).

1.7. Fibronectina, moléculas de adesão e resposta inflamatória

O processo de adesão ocorre em vários eventos biológicos sendo essencial durante a morfogênese, o crescimento, na organização e estabilidade teciduais, na inflamação, na resposta do hospedeiro às infecções e injúrias, nos processos de cicatrização, assim como na resposta imunocelular.

Organismos multicelulares possuem diferentes tecidos constituídos por células que estão em íntimo contato com uma rede complexa de macromoléculas denominada matriz extracelular (Engel e Prockop, 1991), a qual, além de servir como suporte físico, possui múltiplas funções biológicas. Dentre elas, destacam-se a de reservatório de diferentes hormônios que controlam o crescimento e a diferenciação celulares, a de prover uma estrutura em malha na qual as células podem locomover-se, aderir, promover trocas entre si e com o ambiente. É essencial, também, na regulação da forma e reorganização do citoesqueleto celulares, na migração e na diferenciação durante a embriogênese. Destaca-se na recuperação de lesões e feridas por facilitar a localização de macrófagos e outras células do sistema imunitário à área lesada (Alberts *et al.*, 1994).

Constitui-se de uma combinação de vários tipos de proteínas e carboidratos de acordo com o tecido, tais como diferentes tipos de colágeno, fibronectinas, laminina, vitronectina, dentre outras, que possuem múltiplos sítios de interação (ou domínios), sendo cada um específico para o acoplamento com outras moléculas da matriz ou com receptores circulantes ou presentes na superfície das células (Alberts *et al.*, 1994).

Um dos componentes mais bem caracterizados da matriz extracelular é a fibronectina (FN), uma glicoproteína multifuncional de 400kDa (Cotran *et al.*, 1994), composta de duas subunidades unidas por um par de pontes dissulfeto próximas à carboxila terminal (Alberts *et al.*, 1994). Existindo sob uma variedade de isoformas, está presente no plasma na forma solúvel e, na forma insolúvel, na matriz extracelular das células que formam o tecido conjuntivo (Alberts *et al.*, 1994).

Digestão proteolítica branda da FN demonstrou que sua cadeia polipeptídica consiste de seis domínios (Figura 3), sendo que cada domínio contém seqüências repetitivas de aminoácidos usados para classificar a molécula em três tipos diferentes, a saber tipos I, II e III (Alberts *et al.*, 1994).

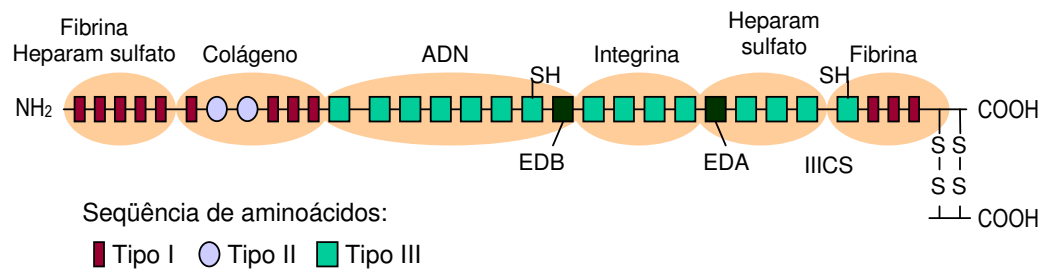


Figura 3. Estrutura básica da molécula de fibronectina e seus eítospos de interação. Somente uma das duas cadeias diméricas da fibronectina está representada. Cada cadeia contém cerca de 2500 aminoácidos, com seis domínios distintos (áreas ovais), contendo sítios de ligação específicos para sulfato de heparan, fibrina, colágeno, ADN e integrinas. Digestão proteolítica resulta nos fragmentos Tipos I, II e III.

EDA: *extra domain A*; EDB: *extra domain B*; ADN: ácido desoxirribonucléico; NH₂: região amino-terminal; -COOH: região carbóxi-terminal; -SH: radical sulfidríla; -S-S-: pontes dissulfeto.

(Adaptado de Alberts *et al.*, 1994).

A fibronectina que circula no sangue é secretada pelo fígado, enquanto a produzida por fibroblastos, monócitos, células endoteliais, células estromais da medula óssea, dentre outras células, associa-se a superfícies celulares, matrizes pericelulares e a um número de outros componentes da matriz

extracelular, incluindo colágeno, fibrina, heparina e proteoglicanos via domínios específicos e, às células, via receptores de integrinas (Ruoslahti, 1988).

Como já descrito, para alcançar os locais de inflamação os leucócitos circulantes devem sair da circulação sangüínea atravessando o endotélio (Murdoch e Finn, 2000). Para isto, empregam moléculas de adesão (MA) para, primeiro, se ligarem ao endotélio vascular e, posteriormente, migrarem para dentro dos tecidos adjacentes (Springer, 1994; Mackai e Rosen, 2000). Estes fenômenos são decorrentes da ação de diferentes mediadores inflamatórios e, dentre eles, as citocinas, que também induzem as células endoteliais vasculares a expressarem diferentes MA que, por sua vez, interagem com receptores protéicos presentes na superfície dos leucócitos. Estes também são estimulados e, ativados, passam a expressar níveis mais elevados de várias moléculas de adesão, as quais ligam-se a receptores protéicos expressos na superfície de células endoteliais. Essas interações iniciais são as responsáveis pela “captura” dos leucócitos periféricos circulantes, os quais “rolam” pela superfície interna dos vasos (Lawrence e Springer, 1991; Mackai e Rosen, 2000), como ilustrado na Figura 1.

As MA são, pois, glicoproteínas que medeiam o contato entre duas células ou entre a célula e a matriz extracelular, sendo responsáveis pela adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e ao endotélio, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sangüíneos até o local da inflamação. Atuam, ainda, como moléculas sinalizadoras, tendo participação essencial na regulação da inflamação e da resposta imunitária (Simmons, 1995).

Estão agrupadas em quatro superfamílias, dependendo de suas características moleculares como a superfamília das imunoglobulinas, a das seletinas, a das integrinas e as caderinas (Simmons, 1995). Na superfamília das imunoglobulinas estão incluídas, dentre outras, as moléculas expressas no endotélio vascular, importantes na interação leucócito-endotélio, como a VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule - 1*) e a ICAM-1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule - 1*) (Simmons, 1995).

A ICAM-1 é constitutivamente expressa no epitélio e em baixos níveis nas células endoteliais, tendo sua transcrição regulada por várias citocinas.

Possui dois sítios de ligação para a integrina β_2 , também conhecida como CD11a e LFA-1 (*Lymphocyte Function Antigen - 1*). A VCAM-1 tem níveis de expressão basal muito baixos nas células endoteliais, porém esses níveis aumentam sob ação de citocinas como a IL-4. Sua fixação maior ocorre através do ligante VLA-4 (*Very Late Activation Antigen - 4*) (Carlos e Harlan, 1994; Gahmberg *et al.*, 1999). Enquanto ICAM-1 está envolvida no recrutamento de todos os tipos de leucócitos, VCAM-1 mobiliza células mediadoras da inflamação crônica como linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (Springer, 1994).

As MA pertencentes à família das seletinas são expressas em células endoteliais (E-seletina), plaquetas (P-seletina) e leucócitos (L-seletina) e medeiam os processos envolvidos no rolamento dos leucócitos ao longo da parede do vaso (Lawrence e Springer, 1991), enquanto as MA da família das integrinas promovem a adesão transitória dessas células ao endotélio (Springer, 1990).

As integrinas são heterodímeros que formam uma classe especial de receptores constituídos por subunidades α e β , ambas cooperando para a formação dos domínios usados para acoplamento (Hynes, 1987, 1992). A maioria é expressa em uma ampla variedade de células e a maioria de células expressa alguma integrina. Há, até o momento, oito subunidades β e 14 subunidades α conhecidas, de natureza glicoprotéica e na forma de proteoglicanos facultativos (Veiga *et al.*, 1997) e, cada uma, com um segmento transmembrana hidrofóbico único (Hynes, 1992), com especificidade para componentes da matriz extracelular e ligantes da superfície celular (Burrige *et al.*, 1988; Arnaout, 1990; Springer, 1990).

Como regra geral, as integrinas que contêm a subunidade β_1 medeiam interação com componentes da matriz extracelular (Buck e Horwitz, 1987; Akiyama *et al.*, 1990), enquanto as β_2 são expressas unicamente nos leucócitos, juntamente com três unidades α , também específicas para leucócitos, mediando interações intercelulares (Wright e Detmers, 1988).

Deve-se ressaltar que cada receptor $\alpha\beta$ reconhece um ou mais ligantes e a especificidade de ligação de um determinado receptor pode ser marcadamente comprometido pelo ambiente em que ele se encontra ou pelo

estado de ativação. Dessa forma, a expressão de uma integrina não necessariamente indica que ela terá um papel funcional na adesão, até mesmo se o seu ligante estiver presente em um contexto disponível. Muitas vezes, elas precisam ser primeiro ativadas por mediadores solúveis, como hormônios e particularmente por citocinas, por exemplo, ou por proteínas componentes da matriz extracelular (Springer, 1990; Hynes, 1992; Lampugnani e Dejana, 1997) para, então, aumentar sua afinidade e interagir com o ligante.

Neste contexto, no domínio da FN que interage com as integrinas, há a sequência tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico, conhecida como sequência RGD, responsável pelo acoplamento da FN às integrinas $\alpha_5\beta_1$ (ou VLA-5), $\alpha_{11b}\beta_3$ e $\alpha_v\beta$, sendo que a sequência ácido glutâmico-isoleucina-leucina-asparagina-valina (EILDV) interage especificamente com a integrina $\alpha_4\beta_1$, enquanto asparagina-glicina-ácido glutâmico-alanina (DGEA) acopla-se à integrina $\alpha_2\beta_1$ (ou VLA-4). Entretanto, deve-se ressaltar que a afinidade da FN por integrinas é substancialmente maior quando estas são expostas à molécula toda quando comparada a segmentos restritos contendo a região RGD ou outra (Doherty *et al.*, 1990).

As integrinas β_2 são estruturas heterodímeras que contêm uma cadeia alfa variável (CD11a, CD11b ou CD11c) e uma cadeia beta comum (CD18) (Arnaout, 1990). O LFA-1 (ou CD11a ou $\alpha_L\beta_2$) é uma integrina β_2 expressa em todos os leucócitos (Hynes, 1992; Kipps, 2001), sendo constitutivamente ativo em diferentes células (Larson *et al.*, 1991). Esta integrina não se adere normalmente ao seu ligante ICAM-1, presente no endotélio vascular (Hynes, 1992). Entretanto, quando os granulócitos são ativados por diferentes fatores, em particular os que estimulam sua migração, como a IL-8 (Ben-Baruch *et al.*, 1995), LFA-1 é convertido de um estado de baixa afinidade para uma situação de alta afinidade para com ICAM-1, com mudança conformacional da molécula (Hynes, 1992).

Durante uma inflamação, por exemplo, o aumento da afinidade de LFA-1 simultaneamente ao aumento da expressão de ICAM-1 pelo endotélio induzido por citocinas, propicia-lhes uma forte ligação. Esta interação, juntamente com a diminuição do fluxo sanguíneo local, permite uma firme

adesão dessas células ao endotélio, facilitando processos subseqüentes como, por exemplo, a transmigração celular e a quimiotaxia (Hynes, 1992).

Integrinas β_1 são encontradas primariamente em leucócitos presentes na inflamação crônica e seus níveis aumentam após estímulo antigênico. Assim como em outros tipos de células, as integrinas β_1 medeiam adesão de linfócitos às proteínas da matriz extracelular e parecem desempenhar função relevante no extravasamento e migração dessas células ativadas nos tecidos durante a resposta imune (Ferguson *et al.*, 1991).

Dentre as integrinas β_1 , destacam-se as moléculas VLA (*Very Late Activation antigens*), cuja terminologia está relacionada com um grupo de moléculas, cujos níveis de expressão elevam-se em linfócitos somente 14-21 dias após sua ativação (Clark *et al.*, 1992), e ocorre em pelo menos 6 diferentes isoformas, denominadas VLA-1 a VLA-6.

Dentre elas, o VLA-4, também conhecido sob as denominações $\alpha_4\beta_1$ e CD49d/CD29, é uma integrina β_1 que atua como receptor celular (Springer, 1994) ligando-se, via EILDV, à VCAM-1 (Shimizu *et al.*, 1990a) e, como receptor de matriz, liga-se ao mesmo epítipo da FN. Da mesma forma, VLA-5, denominado também de $\alpha_5\beta_1$ e CD49e, interage com a FN usando o sítio RGD. Observou-se que a ativação aguda de células que medeiam as respostas inflamatória e imunitária resulta em uma rápida indução da sua adesão a fibronectina, porém sem alteração dos níveis de expressão de VLA-4 e VLA-5 (Shimizu *et al.*, 1990b).

Como já citado, a expressão de moléculas de adesão é modulada por inúmeras moléculas, entre as quais destacam-se as citocinas e pacientes com IRC em HD possuem elevados níveis de citocinas circulantes, em particular as pró-inflamatórias (Bolton *et al.*, 2001; Hoffmann *et al.*, 2003). Aumento dessas citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α , foi descrita em pacientes submetidos à HD crônica devido ao contato físico entre os leucócitos e as membranas de diálise (Hakim *et al.*, 1984; Bingel *et al.*, 1987; Lonnermann *et al.*, 1988). De particular interesse, os monócitos obtidos desses pacientes parecem ser as células mais influenciadas pela interação entre o sangue e materiais sintéticos, produzindo altos níveis de IL-6 e TNF- α (Girndt, 1995; Girndt *et al.*, 1998; Memoli *et al.*, 1999), dentre outras citocinas.

De fato, o aumento dos níveis séricos de E- e P- (Bonomini *et al.*, 1998) e L-seletinas (Thylen *et al.*, 1995), ICAM-1 e VCAM-1 (Bonomini *et al.*, 1998; Bolton *et al.*, 2001; Papayianni *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003; Papagianni *et al.*, 2003), MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) (Jacobson *et al.*, 2000; Jacobson *et al.*, 2001; Jacobson *et al.*, 2002; Papayianni *et al.*, 2002), Mac-1 (CD11b/CD18) (Thylen *et al.*, 1995) e ELAM-1 (E-seletina) (Hoffmann *et al.*, 2003) nesses pacientes tem sido amplamente documentado. Há sugestões de que este aumento possa ser decorrente também de um *clearance* inadequado (Bonomini *et al.*, 1998; Papayianni *et al.*, 2002) ou do aumento da síntese e secreção dessas moléculas por leucócitos ativados, demonstrado pelos elevados níveis de RNAm encontrados em PMN peritoneais obtidos de pacientes com IRC em diálise peritoneal (Elsner *et al.*, 1995).

Ampliando este contexto, há sugestões de que alterações na adesão celular e nos níveis séricos de moléculas de adesão possam estar relacionados à desnutrição (Borelli *et al.*, 1998; Stenvinkel *et al.*, 2000), a qual, assim como a inflamação, é comum neste grupo de pacientes (Stenvinkel *et al.*, 2000) e, em modelos animais, tem sido associada a alterações não só na expressão de moléculas de adesão, assim como na sua função de adesão (Borelli *et al.*, 1998).

Entretanto, não se tem conhecimento até o momento, de estudos correlacionando o estado nutricional de pacientes com IRC em HD com a expressão de moléculas de adesão em leucócitos periféricos e a sua função adesiva. Dessa forma, tornou-se alvo do nosso interesse investigar a relação do estado nutricional desses pacientes com os níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em diferentes populações de leucócitos obtidos de sangue periférico de pacientes desnutridos e correlacioná-los com semelhante população obtida de pacientes com IRC em HD eutróficos. Além disso, explorou-se a capacidade dessas células em interagir com a FN, com a finalidade de se contribuir para elucidar os mecanismos envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica comprometidas nesses pacientes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral: Demonstrar se há correlação entre:

- (1) o estado nutricional dos pacientes submetidos à HD e os níveis de expressão de moléculas de adesão em leucócitos de sangue periférico;
- (2) o estado nutricional dos pacientes submetidos à HD e a habilidade de seus leucócitos de interagirem com a fibronectina, um substrato da matriz extracelular que possui sítios específicos para moléculas de adesão.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em leucócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo controle), de pacientes em HD com estado nutricional adequado e desnutridos, por citometria de fluxo.
- Comparar seus níveis de expressão entre pacientes em HD desnutridos e eutróficos com a população normal.

- Comparar a capacidade de adesão à fibronectina imobilizada das diferentes populações de leucócitos (granulócitos e mononucleares) obtidos de pacientes desnutridos e eutróficos em HD e controles sadios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck ou Sigma, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultra pura obtida pelo sistema Puritech / Permuton.

As soluções foram preparadas e em seguida esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a 121°C, 30min, 1atm) ou (2) por filtração (0,22µm – Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente, a 4 - 8°C ou a -20°C), ao abrigo de luz, conforme indicado.

3.1. SOLUÇÕES

3.1.1. Meios líquidos

3.1.1.1. Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (Dacie e Lewis, 1995)

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se NaH₂PO₄.2H₂O (150mmol/l), Na₂HPO₄ (150mmol/l) e NaCl (154mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1N, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 – 8°C.

3.1.1.2. PBS suplementado com albumina soro bovina (BSA)

PBS foi suplementado, em condições assépticas, no momento do uso, com BSA 1% (p/v).

3.1.1.3. Solução hemolisante de Gey

Solução A: NH_4Cl (654,20mmol/l), KCl (24,83mmol/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (6,53mmol/l), KH_2PO_4 (0,88mmol/l), glucose (27,77mmol/l), vermelho de fenol (0,05g/l).

Solução B: $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,06mmol/l), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,56mmol/l), CaCl_2 (3,42mmol/l).

Solução C: NaHCO_3 (26,78mmol/l).

O pH de cada solução foi ajustado para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1N e os reagentes foram conservados a 4°C. No momento do uso, a solução hemolisante foi preparada na proporção de 4:1:1:14 para as soluções A, B, C e água, respectivamente.

3.1.1.4. Solução hemolisante “FACS™ Lysing Solution” (Becton Dickinson)

Solução hemolisante comercial foi preparada, em condições estéreis e na hora do uso, na proporção de 1:10 em água, conforme instruções do fabricante e conservada em temperatura ambiente (T.A.).

3.1.1.5. Solução de paraformaldeído 1% (p/v)

Paraformaldeído foi dissolvido em PBS sob aquecimento constante à 45°C e conservado a 4°C.

3.1.1.6. Solução de fibronectina (30µg/ml)

Fibronectina (Sigma F-0895) foi diluída em PBS para uma concentração de 30µg/ml no momento do uso e em condições estéreis.

3.1.1.7. Solução de tripsina a 0,025%

Solução de tripsina foi preparada, em condições estéreis, diluindo-se a solução de *Trypsin – EDTA 0,05%* (Gibco) na proporção de 1:2 em PBS e conservada a -20°C.

3.1.1.8. Solução de soro fetal bovino (SFB) a 10% (v/v)

A solução foi preparada, em condições estéreis, na proporção de 1:10 em PBS e conservada a -20°C.

3.1.1.9. Meio RPMI 1640

RPMI 1640 (Gibco) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante e suplementado com 0,3g/l de L-glutamina, esterilizado por filtração e conservado a 4°C.

3.2. POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram estudados pacientes atendidos pela Clínica de Doenças Renais, Curitiba-Pr, portadores de IRC e em HD há pelo menos 3 meses, com três sessões por semana e com duração de 3-4 horas por sessão, sendo que a prescrição de diálise foi individualizada para proporcionar um Kt/V maior que 1,3/sessão de HD. Solução de diálise (Nutrovit) com bicarbonato e heparina sódica (Actparin Bergamo) foram utilizadas em todos os pacientes, os quais estavam sendo tratados com eritropoetina e/ou ferro endovenoso para manutenção dos níveis de hemoglobina entre 11-13g/dl.

Os pacientes foram distribuídos em 2 grupos de acordo com seu estado nutricional estabelecido através de dados resultantes de avaliação subjetiva global modificada (SGAm), coleta de dados antropométricos e exames laboratoriais. O primeiro grupo constituiu-se de pacientes desnutridos moderados a severos e o segundo, de eutróficos, ou seja, com estado nutricional adequado. Dos 120 pacientes avaliados, foram excluídos do estudo os pacientes classificados como portadores de risco nutricional ou desnutrição leve, assim como de infecções agudas, doenças imunológicas ativas (lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide), insuficiência cardíaca congestiva, neoplasias e doenças pulmonares crônicas, resultando em 22 pacientes.

Um terceiro grupo, constituído por indivíduos sadios, classificados como eutróficos pela avaliação nutricional, foi usado como grupo controle. Consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) dos pacientes e dos voluntários sadios foi obtido após aprovação do protocolo pela Comissão de Ética em Pesquisa dos Hospitais da Aliança Saúde PUCPR - Santa Casa (Anexo A).

3.2.1. Avaliação Nutricional

3.2.1.1. Avaliação Subjetiva Global modificada (SGAm): fichas padronizadas com questões sobre história de perda de peso corporal, alterações na ingestão alimentar, sintomas gastrintestinais, capacidade funcional e exame físico (presença de edema, perdas de massa muscular e de gordura subcutânea), foram preenchidas após as sessões de diálise (Anexo B).

3.2.1.2. Antropometria: o índice de massa corporal (IMC) foi obtido após as sessões de diálise utilizando-se a relação entre a altura e o peso seco (sem edema) dos pacientes.

3.2.1.3. Exames laboratoriais: dosagem de albumina sérica foi realizada usando-se metodologia tradicional do verde de bromocresol (Rodkey, 1964).

3.3. OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários sadios e de pacientes portadores de insuficiência renal crônica submetidos à hemodiálise e com estados nutricionais distintos foram colhidas antes do início da sessão de diálise e 20 minutos após o término da mesma, em seringas estéreis contendo EDTA-K₃ como anticoagulante e foram utilizadas para obtenção das diferentes populações de leucócitos humanos.

3.4. SEPARAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS HUMANOS

Células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GNC: polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação, usando-se *Ficoll-PaqueTM PLUS* (Amersham Biosciences) 1,077g/cm³ como gradiente de densidade.

Após centrifugação a 400g por 25 min a T.A., os MNC recuperados da interface do gradiente foram lavados 2 vezes (800g/5min) e ressuspensos em

PBS e a concentração ajustada para 10^6 células/ml de RPMI 1640 com auxílio de hemocítômetro de Neubauer.

Os granulócitos recuperados do sedimento após lise dos eritrócitos com solução hemolisante de Gey foram lavados 2 vezes (800g/5min) e ressuspensos em PBS, enumerados com auxílio de um hemocítômetro de Neubauer e sua concentração igualmente ajustada para 10^6 células/ml de RPMI 1640.

3.5. VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES

A viabilidade dos leucócitos foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste com azul de tripano, o qual baseia-se na habilidade que a membrana plasmática de células viáveis (vivas) possui de excluir o corante (Merchant *et al.*, 1964). Populações de leucócitos isoladas como descrito anteriormente foram diluídas apropriadamente em solução a 0,4% (p/v) de azul de tripano em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz (Olympus CH30). Somente amostras contendo $\geq 95\%$ de células viáveis foram utilizadas nos experimentos.

3.6. PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS

Para observar a composição das frações de mononucleares e de granulócitos, citocentrifugados contendo 2×10^4 células foram preparados após centrifugação a 1500rpm por 5 min, sob baixa aceleração em citocentrífuga Cytopro™ (Wescor). Em seguida, foram corados com May-Grünwald-Giemsa (Dacie e Lewis, 1995) e observados sob microscopia de luz em aumentos de 400 e 1000x. Fotomicrografias foram obtidas usando-se o *software* IMAGE PRO PLUS.

3.7. EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NA SUPERFÍCIE DOS LEUCÓCITOS

Amostras de sangue contendo 10^6 leucócitos foram adicionadas de $5\mu\text{l}$ ($2\mu\text{g/ml}$) de solução de anticorpos monoclonais conjugados à ficoeritrina (PE) para VLA-4 (Pharmingen/BD) e anticorpos monoclonais conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) para VLA-5 (Immunotech) e LFA-1 (Pharmingen/BD). Após incubação no escuro por 15 min à T.A., adicionou-se 2ml de solução lisante *FACSTM Lysing Solution* (Becton Dickinson) em cada tubo. Após 10min à T.A. em ambiente escuro, as células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS (800g/5min) e ressuspensas em 0,5ml de solução de paraformaldeído a 1%. Os níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 pelos diferentes tipos de leucócitos foram analisados por citometria de fluxo em um citômetro de fluxo Becton Dickinson, modelo FACSCalibur. Para discriminar a população de monócitos, $5\mu\text{l}$ ($2\mu\text{g/ml}$) de solução de anticorpos monoclonais para VLA-5 e para LFA-1, ambos conjugados ao FITC, foram usados concomitantemente com $5\mu\text{l}$ ($2\mu\text{g/ml}$) de solução de anticorpos monoclonais para CD14 conjugado à PE (Pharmingen/BD).

3.8. ADESÃO CELULAR À FIBRONECTINA IMOBILIZADA

Para o estudo da função adesiva dos leucócitos utilizou-se o ensaio de adesão à fibronectina imobilizada descrito por Durig e colaboradores (Durig *et al.*, 1998; Durig *et al.*, 1999; Durig *et al.*, 2000) com algumas modificações:

3.8.1. Preparo das placas: foram adicionados a poços de placas estéreis de 96 cavidades (TPP), fundo chato, $50\mu\text{l}$ de solução de fibronectina ($30\mu\text{g/ml}$). Após 1 hora de incubação à T.A., os poços foram lavados duas vezes com PBS. Com a finalidade de se bloquear sítios inespecíficos, adicionou-se $100\mu\text{l}$ /poço de PBS enriquecido com 1% de BSA e as placas foram novamente incubadas por 1 hora à T.A.

3.8.2. Ensaio de adesão à fibronectina: após desprezar-se a solução bloqueadora (item 3.8.1), $100\mu\text{l}$ de meio RPMI 1640 contendo 10^5 células foram adicionados em cada poço e incubados a 37°C por 1 hora. As células

que não aderiram à fibronectina (fração não aderente) foram removidas dos poços por aspiração e os mesmos foram lavados 2 vezes com 100µl de PBS, sendo esses volumes adicionados à população inicial. As células aderidas à fibronectina (fração aderente) foram desalojadas após tratamento com solução a 0,025% de tripsina-EDTA, com incubação a 37°C por 8-10 minutos. A ação proteolítica da tripsina foi inibida por meio de adição de 100µl de SFB/poço. Após remoção das células, os poços foram, então, lavados com PBS com a finalidade de se remover eventuais células remanescentes. O monitoramento dessas populações foi realizado com auxílio de um estereomicroscópio adaptado, conforme ilustrado na Figura 4. A adesão espontânea das diferentes populações de leucócitos (controle) foi monitorada por meio de ensaio semelhante, porém na ausência de fibronectina, em solução de BSA a 1%.

Ambas frações foram enumeradas com auxílio de hemocítômetro de Neubauer e a porcentagem de adesão foi expressa conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de adesão} = \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ de células aderentes}}{\text{n}^\circ \text{ de células aderentes} + \text{n}^\circ \text{ de células não aderentes}} \right) \times 100$$

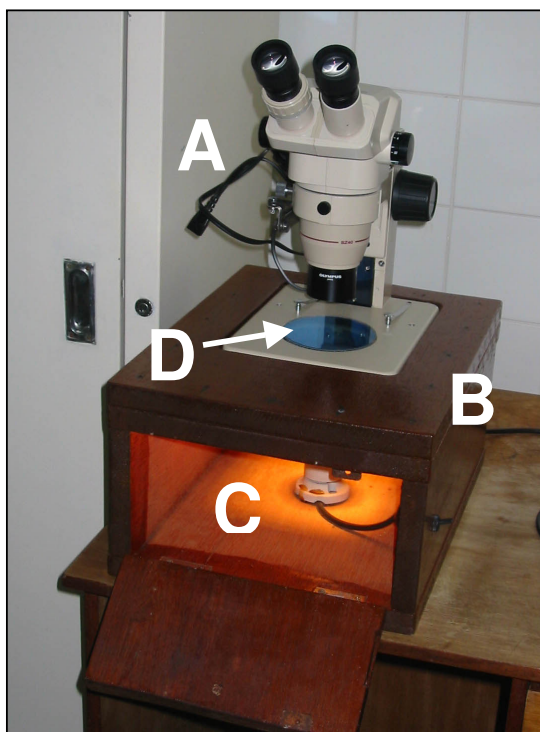


Figura 4. Microscópio invertido. O microscópio utilizado para monitoramento do ensaio de adesão foi adaptado a partir de um estereomicroscópio Olympus SZ40 **(A)**, o qual foi colocado sobre um suporte de madeira **(B)**, contendo uma lâmpada dicrômica **(C)**, cuja intensidade de luz foi controlada pelo uso de vidro azul **(D)**.

3.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA C-REATIVA (PCR) SÉRICA

Níveis séricos de PCR foram determinados em nefelômetro BN II, usando-se o sistema *N High Sensitivity CRP* (Dade Behring), de acordo com as instruções do fabricante, o qual recomenda como valores de referência para PCR níveis séricos $\leq 5\text{mg/l}$.

3.10. DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

A contagem do número total de leucócitos e das populações de linfócitos e de neutrófilos foi realizada em contador automatizado CellDyn 3000 SL, com posterior revisão microscópica.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a porcentagem média ± 1 erro padrão da média (EPM). Para análise estatística dos resultados usou-se o teste *t* de Student. Os cálculos foram realizados utilizando-se o *software* StatSoft, Inc. e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

Pacientes em HD possuem um estado inflamatório crônico (Kaysen *et al.*, 1997) frequentemente associado à imunodeficiência (Qureshi *et al.*, 1998; Chandra, 1999; Bhaskaram, 2001) e à desnutrição (Qureshi *et al.*, 1998; Stenvinkel, 2001). Com a finalidade de se observar uma possível correlação entre o estado nutricional deficiente desses pacientes e seu estado inflamatório crônico, investigou-se, primeiramente, níveis de expressão das moléculas de adesão LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em diferentes populações de leucócitos obtidas de sangue periférico de pacientes em HD crônica com estado nutricional adequado (HDE) e com desnutrição (HDD), antes da sessão de diálise (ini) e após 20 minutos do término da mesma (fim), usando-se a citometria de fluxo como modelo experimental.

Num segundo momento, a capacidade de adesão dessas populações leucocitárias foi investigada *in vitro*, utilizando-se a técnica de adesão à FN imobilizada, como previamente descrito por Durig e colaboradores (Durig *et al.*, 1998; Durig *et al.*, 1999; Durig *et al.*, 2000). Para comparação, investigação semelhante foi realizada nas mesmas populações celulares obtidas de indivíduos saudáveis (grupo controle).

Para distinção dos grupos “desnutrido” e “eutrófico” entre os pacientes em HD inclusos neste estudo, utilizou-se a SGAm, onde foram considerados os relatos dos pacientes com relação à história de perda de peso corporal, incidência de alterações da ingestão alimentar, sintomas gastrintestinais e

exame físico, com especial atenção à presença de edema, perda de massa muscular e gordura subcutânea (Anexo B), além do índice de massa corporal (IMC). Foram considerados também os níveis séricos de albumina e PCR, o número de linfócitos circulantes, tempo em hemodiálise, número e duração das sessões semanais e o material da membrana de diálise para cada paciente, os quais estão apresentados na Tabela 2.

A idade média dos pacientes foi de 42,1 anos, com limites entre 28 e 68 anos. Dos 22 pacientes estudados, doze pacientes eram do sexo masculino e dez, do feminino. Para o grupo controle, dos dez voluntários, somente dois eram do sexo masculino. Todos os pacientes realizavam sessões de HD regulares por pelo menos três meses, sendo três sessões por semana, com duração de 3 a 4 h, utilizando membranas de diálise de polissulfona (PS) ou acetato de celulose (CA), conforme prescrição de diálise.

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

Características	HDE (n=12)	HDD (n=10)	Controle (n=10)
Idade (anos)	43,2 ± 10,8	49,8 ± 10,8	36,0 ± 7,7
Sexo (M/F)	9/3	3/7	2/8
Duração da HD (meses)	37,6 ± 56,5	29,7 ± 44,8	-
Sessão de HD (h)	3,8 ± 0,3	3,4 ± 0,4 ^a	-
MD (PS/CA)	8/4	4/6	-
SGA	8 (8)	14,5 (11-31) ^{a c}	8 (8)
IMC (kg/m ²)	24,7 ± 2,9	19,8 ± 3,1 ^{a c}	24,6 ± 2,5
Albumina sérica (g/dl)	3,9 ± 0,2 ^c	3,0 ± 0,3 ^{a c}	4,6 ± 0,3
PCR sérica (mg/l)	7,7 ± 9,7 ^c	8,3 ± 14,0 ^c	<0,8
Linfócitos/μl	1905 (1116-3058)	944,5 (448-1976)	2176 (1649-3437)

HDD: pacientes desnutridos portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise; HDE: pacientes com estado nutricional adequado portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise; M/F: masculino/feminino; HD: hemodiálise; IMC: índice de massa corporal; SGA: avaliação subjetiva global; PCR: proteína C-reativa; MD: membrana de diálise; PS: polissulfona; CA: acetato de celulose. Valores estão expressos como média ± DP ou em porcentagem, como apropriado. Os valores de SGA e linfócitos estão expressos como mediana (variação).

^a significativamente diferente do grupo HDE

^b significativamente diferente do grupo HDD

^c significativamente diferente do grupo controle

Para pertencer aos grupos controle e HDE, um escore igual a 8 no resultado da SGAm, $\text{IMC} \geq 20\text{kg/m}^2$ e albumina sérica $\geq 3,5\text{g/dl}$ foram exigidos, enquanto o grupo HDD caracterizou-se por apresentar escore maior que 8 no resultado da SGAm, $\text{IMC} < 20\text{kg/m}^2$ e albumina sérica $< 3,5\text{g/dl}$.

Os pacientes do grupo HDD (n=10) apresentaram uma mediana de 14,5 (intervalo: 11-31) para o escore da SGAm, $19,8 \pm 3,1\text{kg/m}^2$ para o IMC e $3,0 \pm 0,3\text{g/dl}$ para a albumina sérica, enquanto o IMC para os grupos HDE (n=12) e controle (n=10) foram $24,7 \pm 2,9\text{kg/m}^2$ e $24,6 \pm 2,5\text{kg/m}^2$, respectivamente. Níveis séricos de albumina para esses grupos foram, respectivamente, $3,9 \pm 0,2\text{g/dl}$ e $4,6 \pm 0,3\text{g/dl}$.

Para a PCR, os valores médios encontrados foram $7,7 \pm 9,7\text{mg/l}$ para os pacientes dos grupo HDE, $8,3 \pm 14,0\text{mg/l}$ para os HDD e inferior a $0,8\text{mg/l}$ para os indivíduos do grupo controle. Quanto ao número de linfócitos circulantes, os valores médios encontrados foram 1905 (1116-3058)/ μl para os pacientes do grupo HDE, 944,5 (448-1976)/ μl , para os HDD e 2176 (1649-3437)/ μl para o grupo controle. Importante ressaltar que, quando comparados, não foram observadas diferenças significativas para os níveis séricos de PCR, caracterizando um estado inflamatório comum aos dois grupos de pacientes. Por outro lado, os valores encontrados para SGAm ($p < 0,001$), IMC ($p = 0,001$) e albumina sérica ($p < 0,001$), usados como parâmetros nutricionais, foram significativamente maiores para o grupo HDE quando comparados aos valores encontrados para o grupo HDD, confirmando o elevado grau de comprometimento nutricional destes pacientes.

4.1. Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 em leucócitos por citometria de fluxo

Para análise da expressão de LFA-1, VLA-4, VLA-5 em linfócitos, monócitos e granulócitos do sangue periférico de pacientes desnutridos e eutróficos em HD, utilizou-se a citometria de fluxo, após marcar essas

populações leucocitárias com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, como descrito na seção de Material e Métodos. A Figura 5 ilustra a estratégia utilizada para essa análise, onde janelas específicas foram traçadas, baseadas no tamanho (FSC – *forward side scatter*) e na complexidade interna (SSC – *side light scatter*) distintas para cada população de células (Civin e Loken, 1987), onde R1 especifica a janela para linfócitos

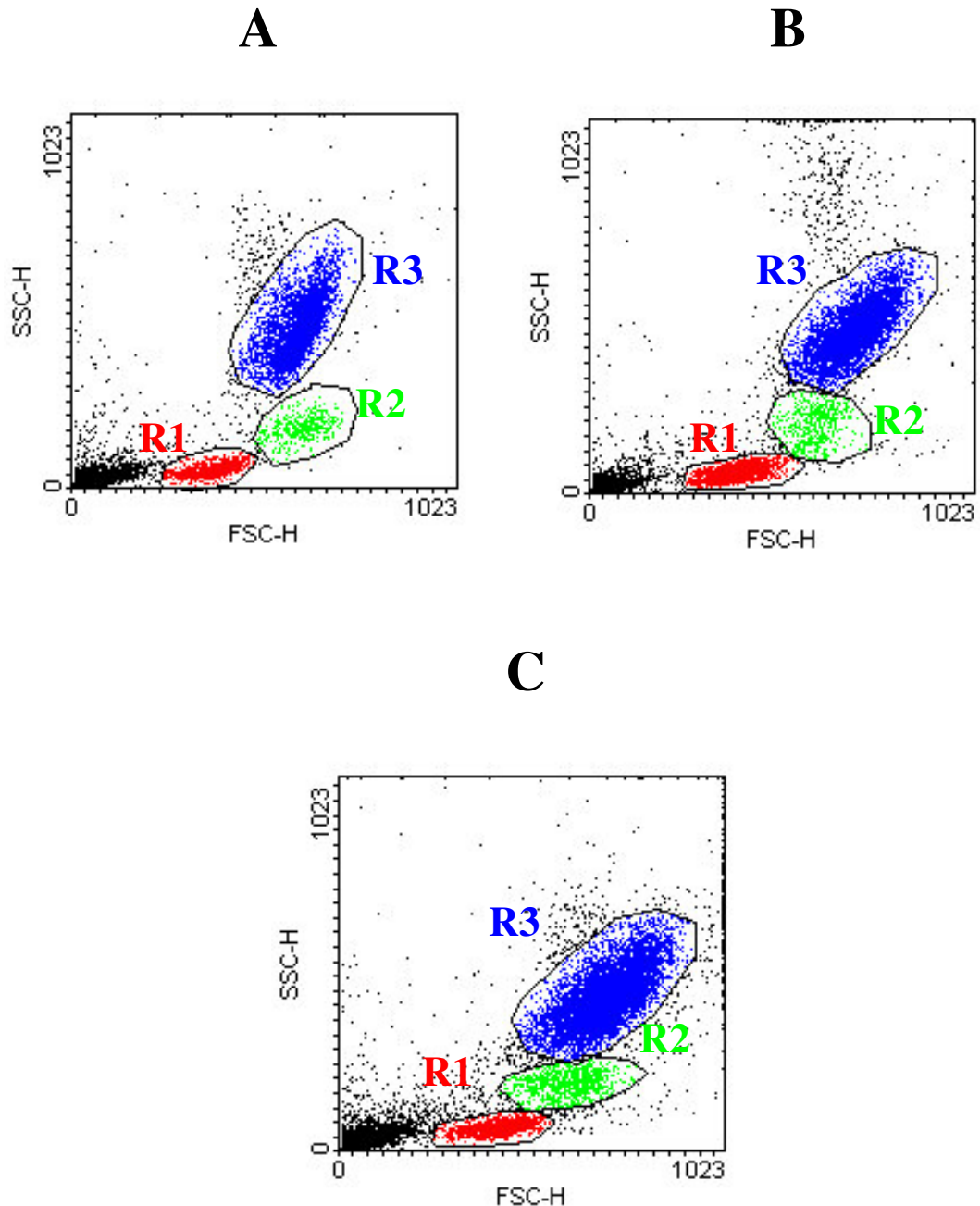


Figura 5. Estratégia de seleção das diferentes populações de leucócitos para avaliação da expressão de moléculas de adesão por citometria de fluxo. Os gráficos representam as populações de leucócitos analisados por citometria de fluxo obtida de sangue periférico, onde as características de complexidade interna (SSC-H) e tamanho celular (FSC-H) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para a análise da expressão de moléculas de adesão nos indivíduos de cada grupo (A) e de indivíduos de diferentes grupos (B) e de indivíduos de diferentes grupos (C). R1 refere-se à população de linfócitos, R2 refere-se à população de monócitos e R3 refere-se à população de neutrófilos.

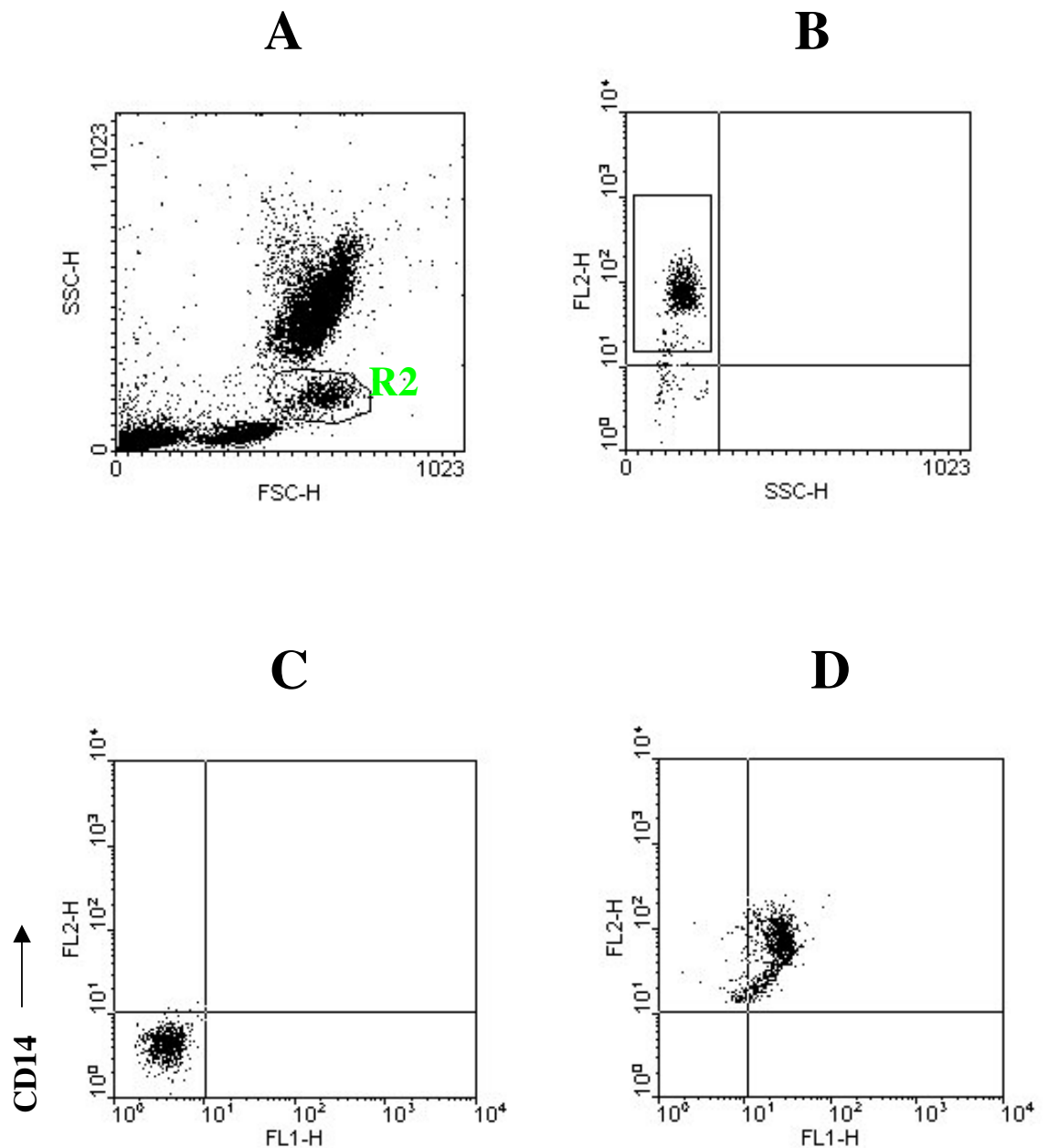
(LIN); R2, para monócitos (MON) e R3, para granulócitos (GNC). Com o objetivo de melhor caracterizar a expressão desses antígenos nos monócitos (R2), os quais, além de pouco numerosos, ocupam uma posição intermediária aos linfócitos e granulócitos, estes foram marcados com anticorpos monoclonais para VLA-5 e LFA-1 juntamente com anticorpos monoclonais para CD14, um marcador específico de monócitos (Szeberenyi *et al.*, 2000). A estratégia utilizada para esta análise está demonstrada na Figura 6.

Em todas as determinações citométricas, um mínimo de 10^6 células foi analisado e a linha limite de detecção baseou-se na máxima coloração obtida com a mesma população, porém sem estar marcada com o anticorpo monoclonal. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima de 1% da linha limite. Os dados foram analisados usando o *software* WinMDI 2.8 e os resultados estão apresentados como a porcentagem média de expressão para as células, mais ou menos um erro padrão da média (EPM). Exemplos de histogramas analisados para a expressão de LFA-1, VLA-4, VLA-5 em linfócitos, monócitos e granulócitos estão demonstrados, para os grupos controle, na Figura 7, para HDD na Figura 8 e, para HDE, na Figura 9.

Como demonstrado na Figura 10-A, $94,8 \pm 0,9\%$ dos linfócitos do grupo controle, $92,4 \pm 2,4\%$ do grupo HDDini, $92,4 \pm 2,3\%$ do grupo HDDfim, $96,8 \pm 2,2\%$ do grupo HDEini e $95,3 \pm 0,9\%$ do grupo HDEfim expressaram LFA-1. Para os monócitos (Figura 10-B), elevada expressão de LFA-1 para todas as populações analisadas foi obtida, porém com menor intensidade do que a observada para os linfócitos, onde $70,4 \pm 4,1\%$ de expressão de LFA-1 foi encontrado para o grupo controle, $63,8 \pm 3,8\%$ para o grupo HDDini,

70,0 ± 2,5% para o grupo HDDfim, 72,5 ± 4,2% para o grupo HDEini e 61,5 ± 4,4% para o grupo HDEFim.

Da mesma forma, índices de 96,7 ± 1,0% para o grupo controle, 97,9 ± 0,5% para o grupo HDDini, 95,4 ± 1,7% para o grupo HDDfim, 98,5 ± 0,2% para o grupo HDEini e 96,6 ± 0,8% para o grupo HDEFim, foram observados para a expressão de LFA-1 nos granulócitos (Figura 10-C).



LIN

Figura 6. Estratégia para análise da expressão de moléculas de adesão em monócitos por citometria de fluxo. Leucócitos isolados de sangue periférico foram marcados simultaneamente com os anticorpos monoclonais anti-CD14 (PE-FL2) e anti-LFA-1 (A-R2). Todas as células marcadas (A) foram selecionadas (B) e analisadas (C) quanto à expressão de LFA-1 ou VLA-4 (D). (C) representa a população de monócitos não marcada, usada para a linha de detecção limite.

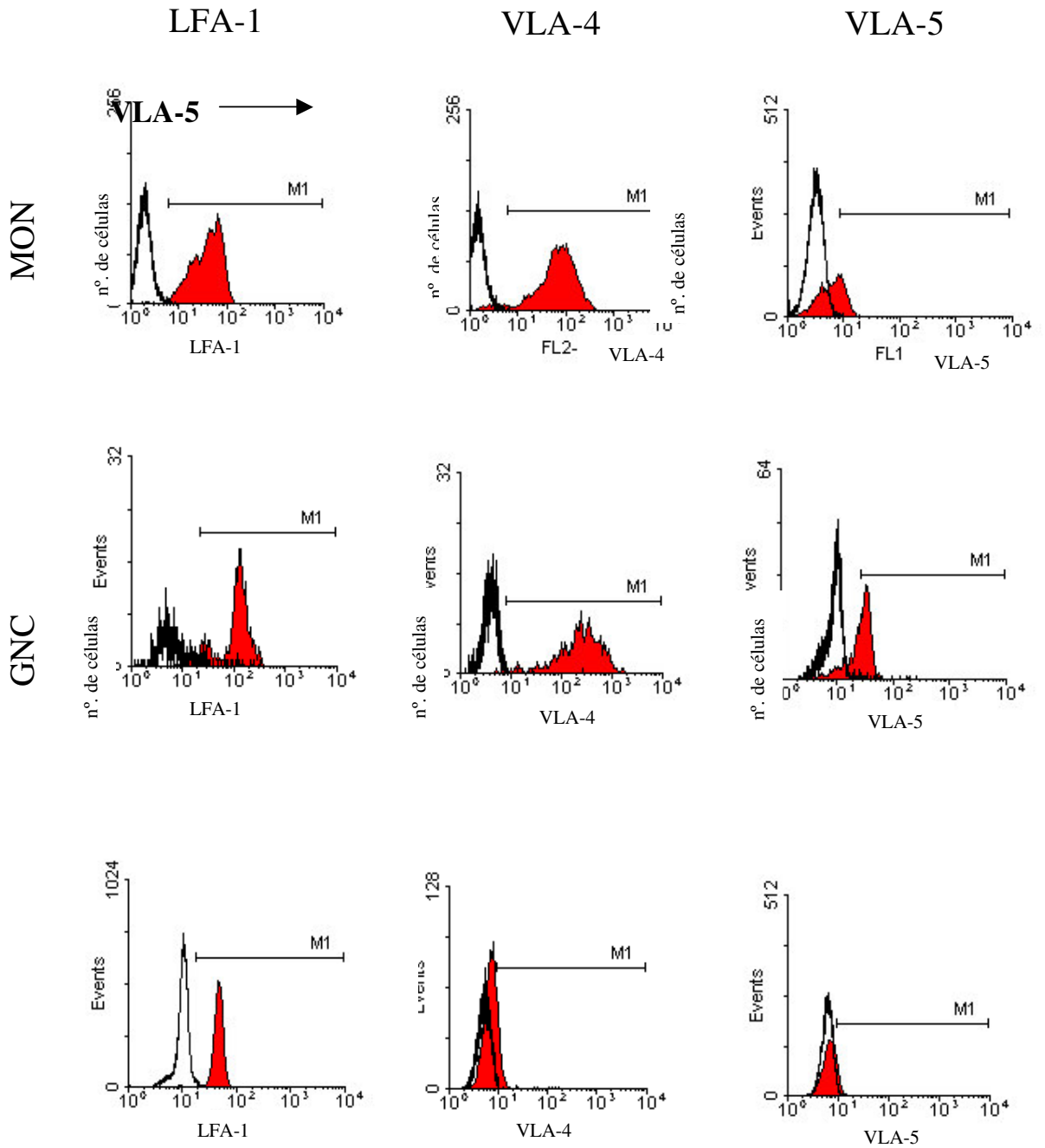


Figura 7. Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nas diferentes populações de leucócitos de indivíduos saudáveis. Leucócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis (grupo controle), após serem marcados com anticorpos monoclonais anti-LFA-1, anti-VLA-4 e anti-VLA-5, foram submetidos à análise por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que expressaram LFA-1, VLA-4 e VLA-5 (picos vermelhos) nas regiões dos linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GNC), delimitados pelo eixo M1. Histogramas de um experimento representativo.

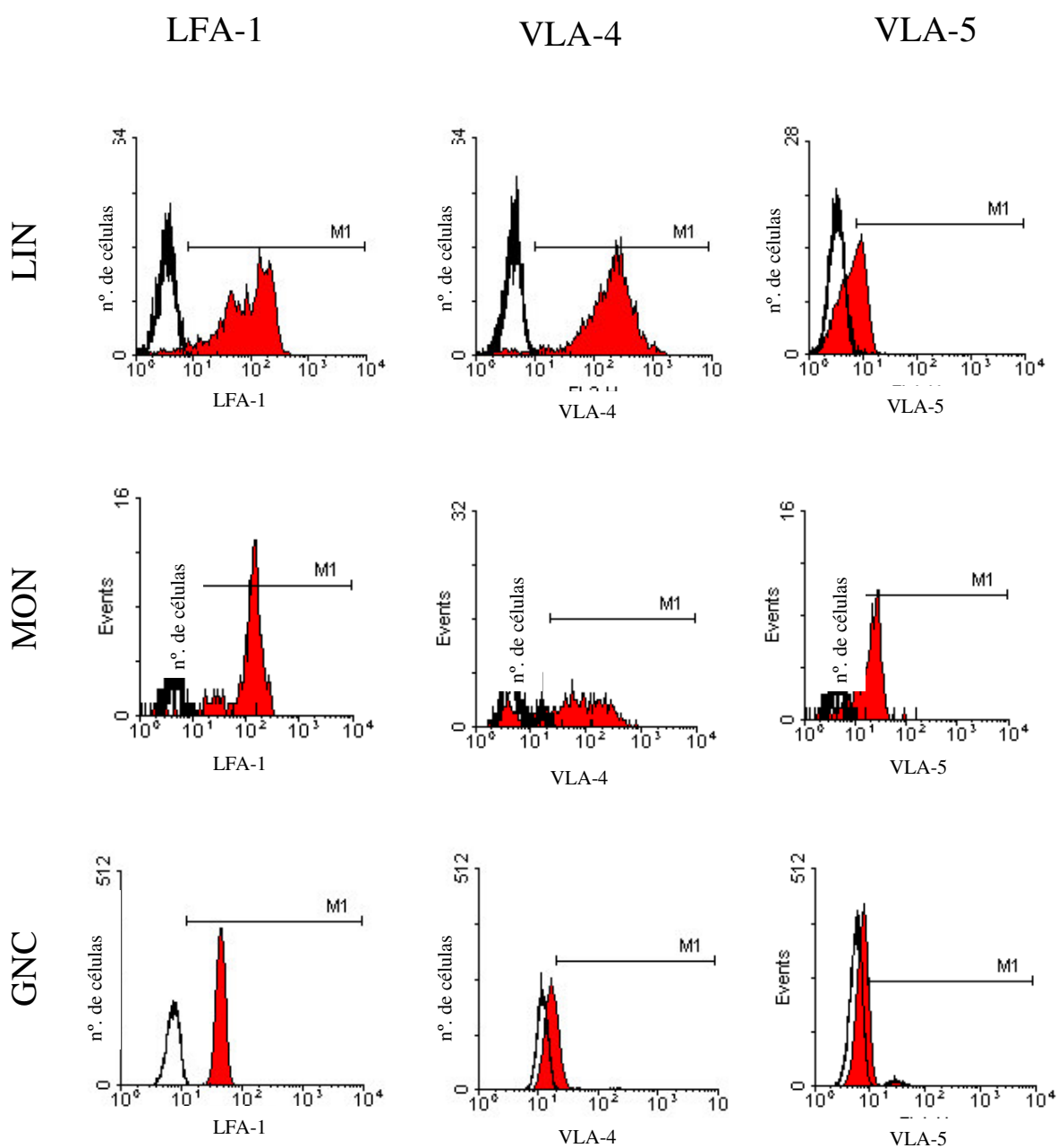


Figura 8. Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nas diferentes populações de leucócitos de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) desnutridos em hemodiálise (HD). Leucócitos obtidos de sangue periférico dos pacientes com IRC desnutridos em HD, após serem marcados com anticorpos monoclonais anti-LFA-1, anti-VLA-4 e anti-VLA-5, foram submetidos à análise por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que expressaram LFA-1, VLA-4 e VLA-5 (picos vermelhos) nas regiões dos linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GNC), delimitados pelo eixo M1. Histogramas de um experimento representativo.

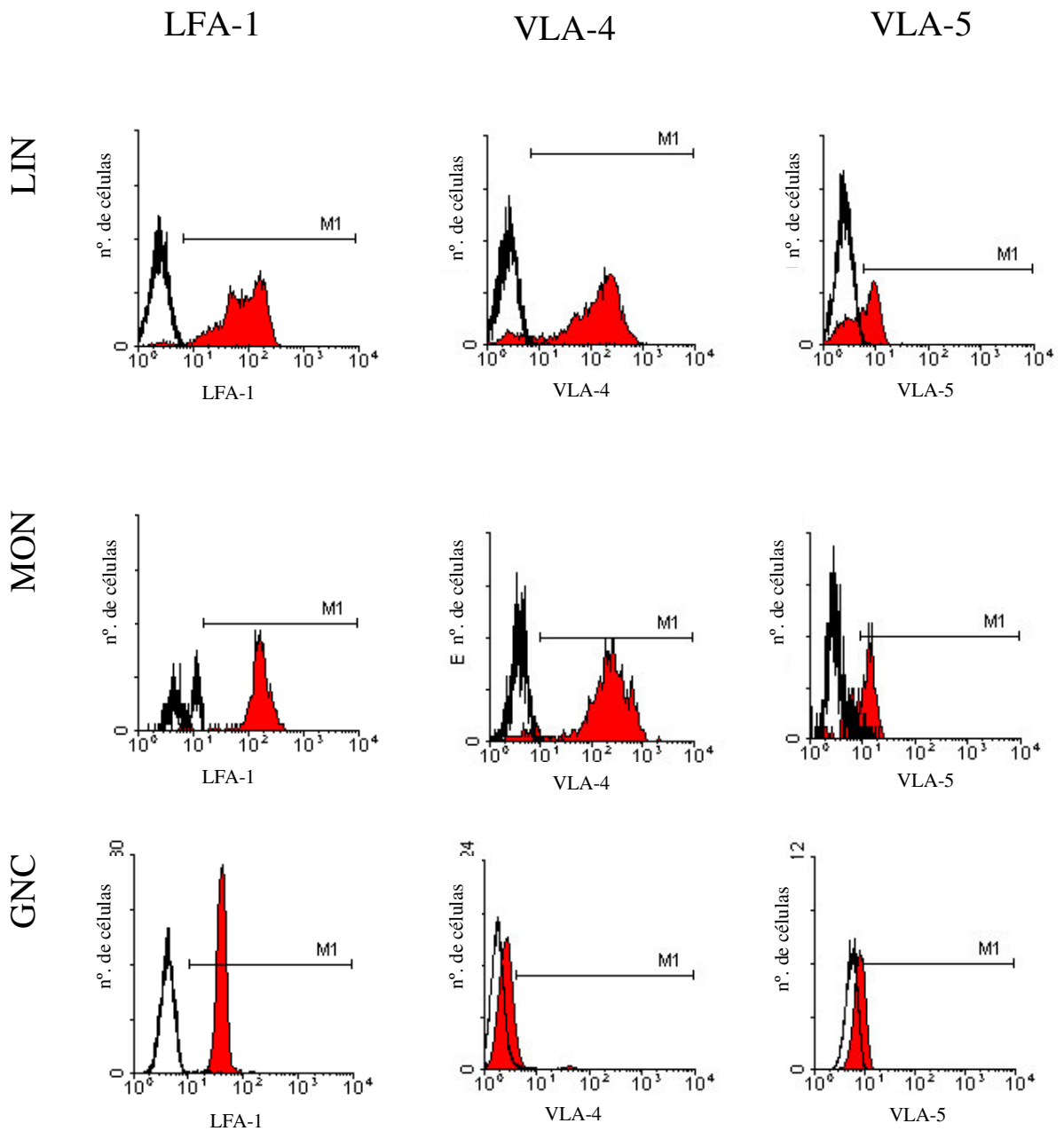


Figura 9. Expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nas diferentes populações de leucócitos de pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) eutróficos em hemodiálise (HD). Leucócitos obtidos de sangue periférico dos pacientes com IRC eutróficos em HD, após serem marcados com anticorpos monoclonais anti-LFA-1, anti-VLA-4 e anti-VLA-5, foram submetidos à análise por citometria de fluxo. Os histogramas representam células que expressaram LFA-1, VLA-4 e VLA-5 (nós vejam e delimitamos).

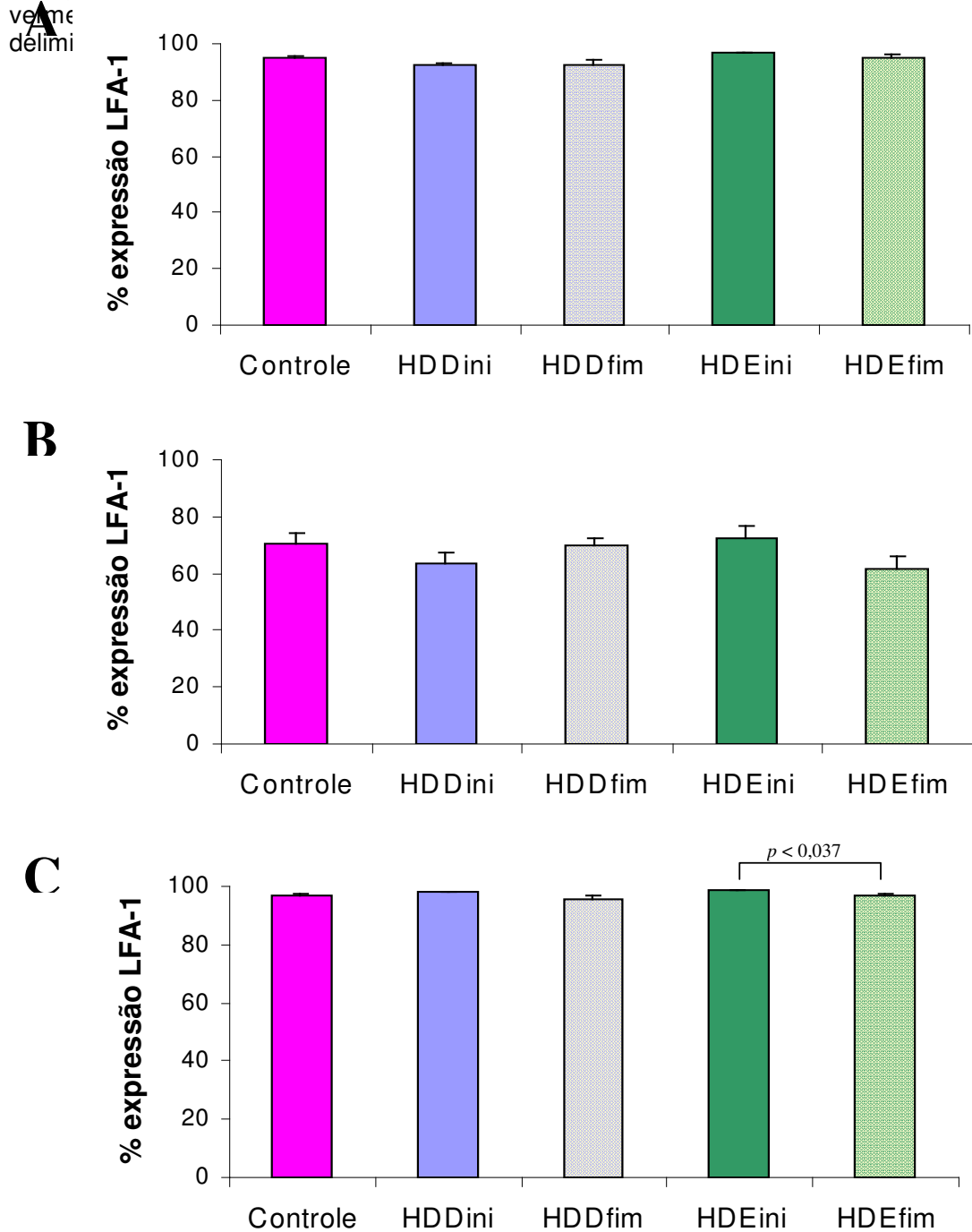


Figura 10. Expressão de LFA-1 em leucócitos detectada por citometria de fluxo. Linfócitos (A), monócitos (B) e granulócitos (C) obtidos de sangue periférico de pacientes em hemodiálise (HD) desnutridos (HDD) e eutróficos (HDE) e voluntários sadios (controle), antes (ini) e após 20 minutos do processo dialítico (fim), foram marcados com anticorpos monoclonais para LFA-1, como descrito na sessão de Material e Métodos. Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo para expressão de LFA-1 usando as estratégias descritas nas Figuras 3 e 4, onde um mínimo de 10^6 células foi avaliado. As colunas representam a porcentagem média de expressão \pm 1 EPM.

Com relação à expressão de VLA-4, demonstrada na Figura 11-A para linfócitos, os valores médios obtidos foram: $93,1 \pm 0,3\%$ para o grupo controle, $92,7 \pm 2,1\%$ para o grupo HDDini, $92,3 \pm 1,2\%$ para o grupo HDDfim, $88,2 \pm 1,4\%$ para o grupo HDEini e $90,7 \pm 0,9\%$ para o grupo HDE fim.

Nos monócitos (Figura 11-B), $94,6 \pm 1,1\%$ para o grupo controle, $92,1 \pm 1,8\%$ para o grupo HDDini, $91,1 \pm 1,7\%$ para o grupo HDDfim, $88,3 \pm 1,4\%$ para o grupo HDEini e $90,7 \pm 1,4\%$ para o grupo HDEfim, foram os valores médios encontrados.

A Figura 11-C demonstra a expressão de VLA-4 nos granulócitos, cujos níveis de expressão obtidos foram $22,4 \pm 3,7\%$, $27,9 \pm 5,0\%$, $27,4 \pm 5,5\%$, $26,3 \pm 3,5\%$ e $29,5 \pm 4,0\%$ para os grupos controle, HDDini, HDDfim, HDEini e HDEfim, respectivamente, diferindo muito em relação aos elevados índices apresentados por linfócitos e monócitos.

Em contraste com a relativa uniformidade de expressão observada para LFA-1 e VLA-4, a expressão de VLA-5 mostrou-se variável dependendo da população celular estudada, assim como do grupo estudado. Para os linfócitos, $19,1 \pm 2,9\%$ (controle), $36,4 \pm 5,3\%$ (HDDini), $33,0 \pm 2,8\%$ (HDDfim), $41,8 \pm 4,2\%$ (HDEini) e $42,1 \pm 3,7\%$ (HDE fim) foram encontrados (Figura 12-A).

Já nos monócitos (Figura 12-B), os resultados encontrados foram $66,0 \pm 4,4\%$ para o grupo controle, $72,7 \pm 2,4\%$ para o grupo HDDini, $64,8 \pm 3,4\%$ para o grupo HDDfim, $68,0 \pm 5,7\%$ para o grupo HDEini e $70,7 \pm 2,0\%$ para o grupo HDEfim.

A Figura 12-C mostra os resultados obtidos quando investigou-se a expressão de VLA-5 nos granulócitos dos pacientes dos cinco grupos estudados, onde $5,0 \pm 1,1\%$ para o grupo controle, $13,7 \pm 2,3\%$ para o grupo

HDDini, $25,8 \pm 4,1\%$ para o grupo HDDfim, $26,8 \pm 2,5\%$ para o grupo HDEini e $20,2 \pm 3,4\%$ para o grupo HDEfim foram os valores registrados.

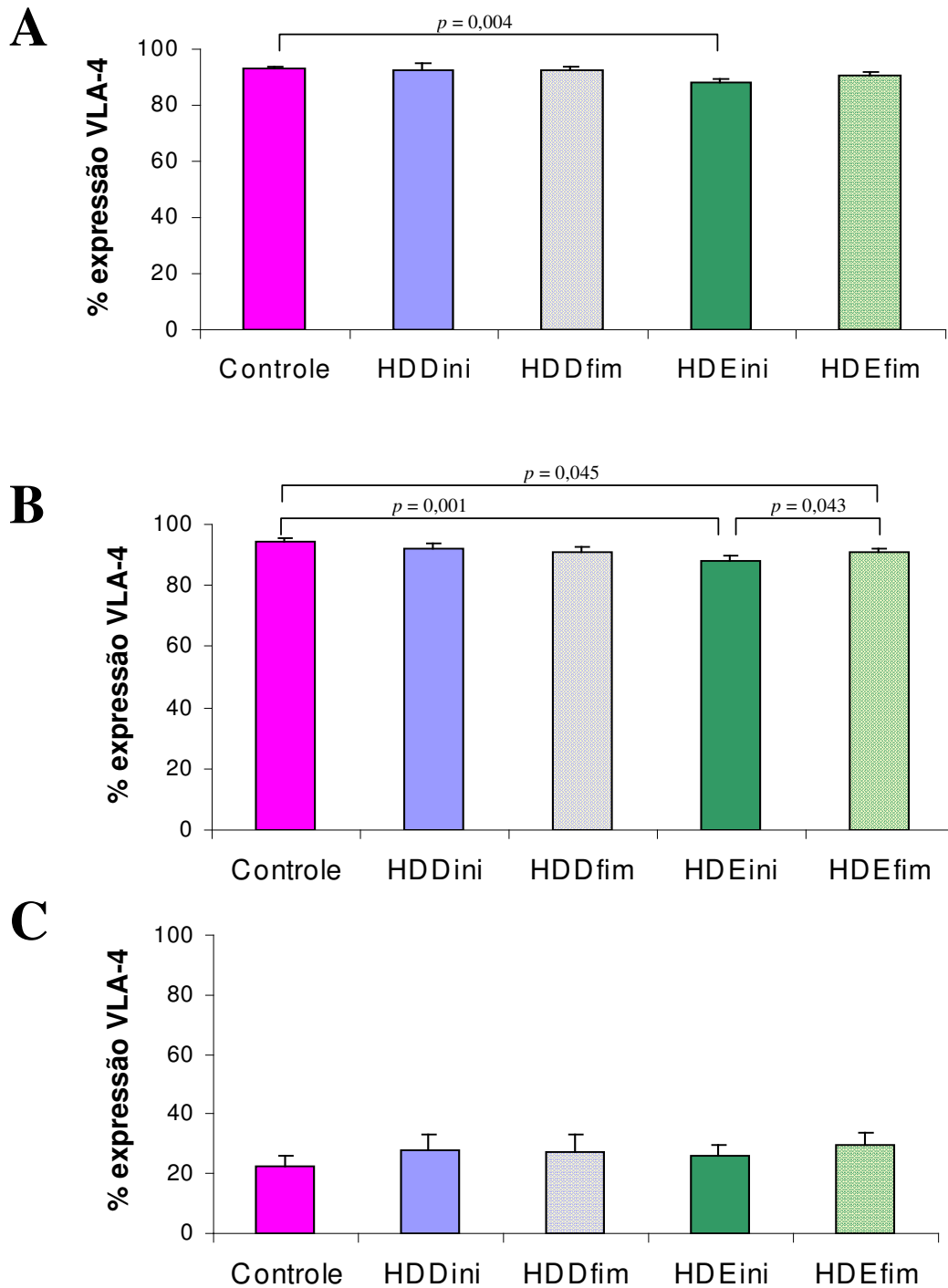
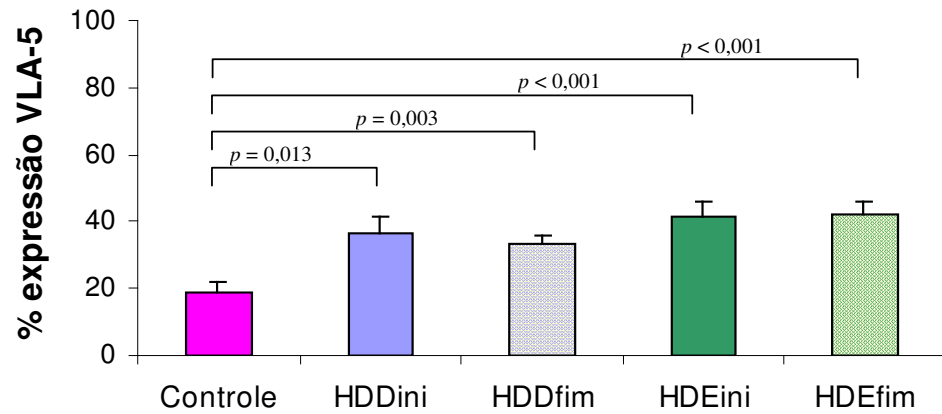
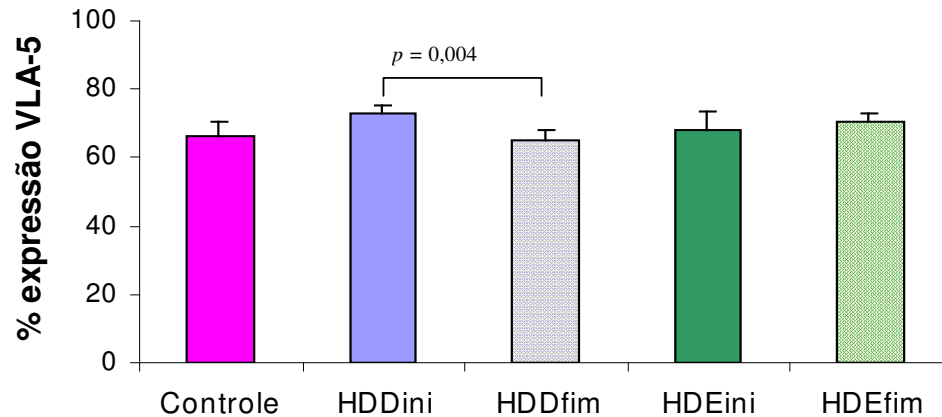


Figura 11. Expressão de VLA-4 em leucócitos detectada por citometria de fluxo. Linfócitos (A), monócitos (B) e granulócitos (C) obtidos de sangue periférico de pacientes em hemodiálise (HD) desnutridos (HDD) e eutróficos (HDE) e voluntários sadios (controle), antes (ini) e após 20 minutos do processo dialítico (fim), foram marcados com anticorpos monoclonais para VLA-4, como descrito na sessão de Material e Métodos. Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo para expressão de VLA-4 usando as estratégias descritas nas Figuras 3 e 4, onde um mínimo de 10^6 células foi avaliado. As colunas representam a porcentagem média de expressão + 1

A



B



C

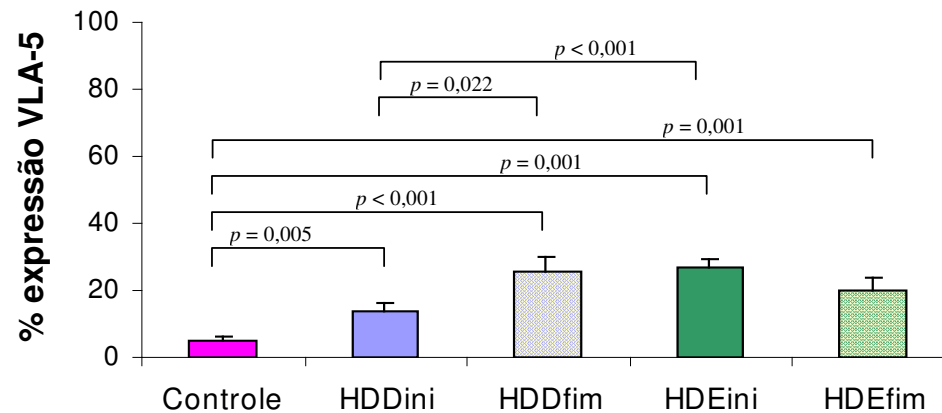


Figura 12. Expressão de VLA-5 em leucócitos detectada por citometria de fluxo. Linfócitos (A), monócitos (B) e granulócitos (C) obtidos de sangue periférico de pacientes com IRC em hemodiálise (HD) desnutridos (HDD) e eutróficos (HDE) e voluntários sadios (controle), antes (ini) e após 20 minutos do processo dialítico (fim), foram marcados com anticorpos monoclonais para VLA-5, como descrito na sessão de Material e Métodos. Em seguida, foram analisados por citometria de fluxo para expressão de VLA-5 usando as estratégias descritas nas Figuras 3 e 4, onde um mínimo de 10^6 células foi avaliado. As colunas representam a porcentagem média de expressão \pm 1 EPM.

4.2. Adesão de leucócitos à fibronectina imobilizada

Para o estudo da função adesiva de populações leucocitárias nos grupos estudados, os leucócitos foram divididos em duas populações: a de mononucleares (MNC) e a de granulócitos (GNC), obtidos após centrifugação sobre um gradiente de densidade (ver Material e Métodos) e os resultados foram expressos em porcentagem do número de células aderidas, mais ou menos 1 EPM.

A análise citológica do conteúdo dessas frações, obtidas em citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa como ilustra a Figura 13, está apresentada na Tabela 3.

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.

Exp.	Fração	Grupo	Tipos celulares				
			Seg (%)	Bast (%)	Eos (%)	Linf (%)	Mono (%)
01	GNC	HDD	73	26	-	01	-
02			52	44	01	03	-
03			62	37	-	01	-
04			74	16	07	03	-
05	HDE	HDD	93	-	05	02	-
06			91	01	05	02	01
07			91	01	08	-	-
08			85	07	08	-	-
09	MNC	HDD	02	-	-	37	61
10			15	-	-	62	23
11			10	04	04	37	45
12			03	06	-	59	32
13			22	-	-	44	34

Citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa foram preparados após separação dos mononucleares (MNC) dos granulócitos (GNC) usando gradiente de separação (ver Material e

Métodos) e observados sob microscopia de luz. Em cada experimento (exp.), um mínimo de 100 células foram contadas e as figuras representam a porcentagem de cada tipo leucocitário identificado. HDD: pacientes desnutridos portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise; HDE: pacientes com estado nutricional adequado portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise; Seg: neutrófilos segmentados; Bast: neutrófilos bastonetes; Eos: eosinófilos; Linf: linfócitos; Mono: monócitos.

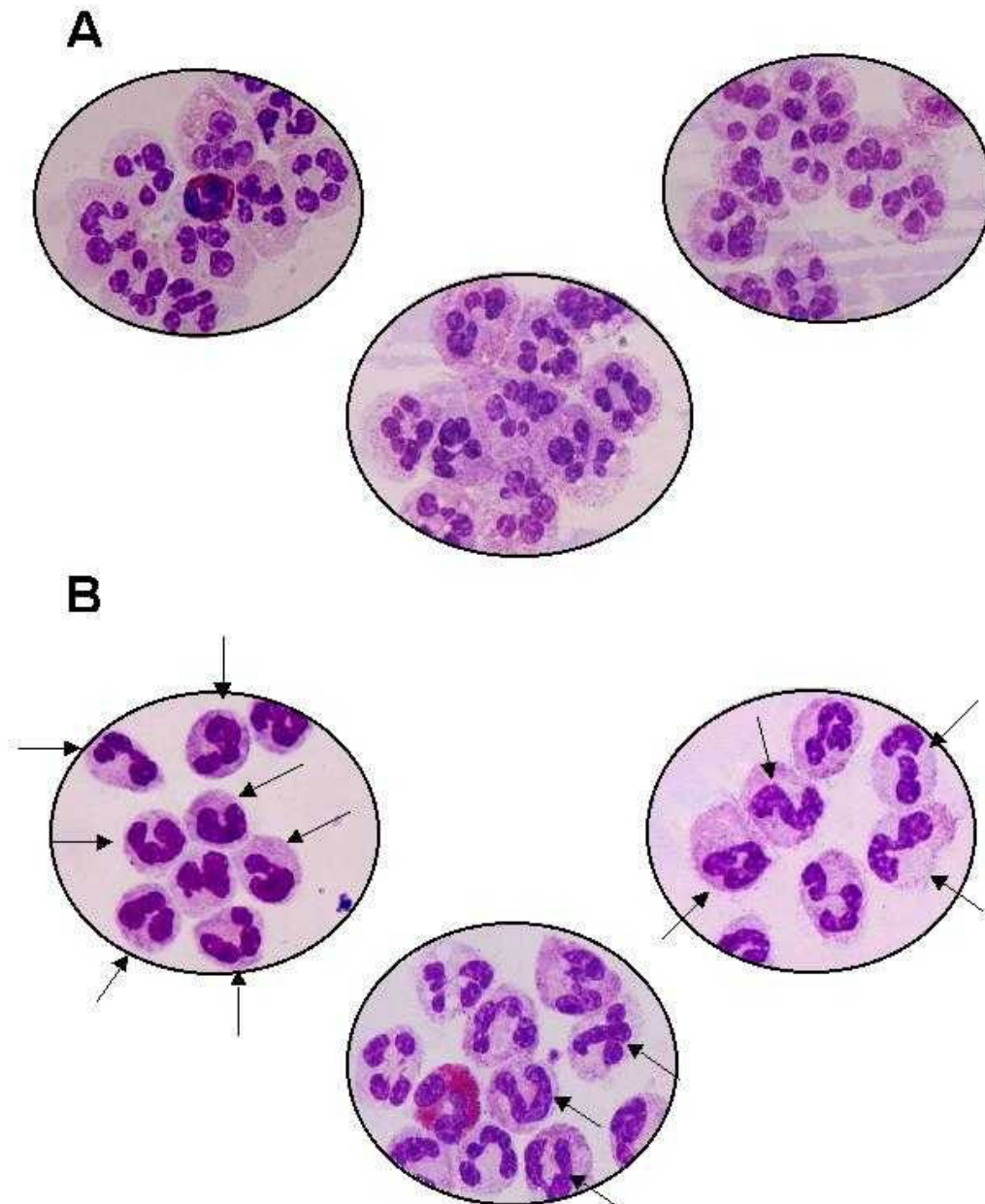


Figura 13. Análise citológica de citocentrifugados das frações de granulócitos de pacientes eutróficos e desnutridos em hemodiálise. Citocentrifugados obtidos de sangue periférico de pacientes eutróficos (A) e desnutridos (B) em hemodiálise foram analisados quanto à sua composição após serem corados com May-Grunwald-Giemsa (ver Material e Métodos). As setas destacam os neutrófilos bastonetes encontrados em maior proporção aos neutrófilos segmentados em pacientes desnutridos. Fotomicrografias obtidas com auxílio do software IMAGE PRO PLUS (1000x).

Linfócitos e monócitos predominaram entre os MNC (>78%), enquanto neutrófilos e eosinófilos constituíram mais de 95% da fração GNC. Interessante ressaltar que, dentre os neutrófilos, presença marcante de células imaturas (bastonetes) foram observadas somente nos citocentrifugados de GNC obtidos de pacientes desnutridos em HD, como demonstrado na Figura 13-B.

A capacidade adesiva natural dos leucócitos foi analisada observando-se o número de células que aderiram espontaneamente à base do frasco de cultura, em presença de BSA.

A Figura 14-A demonstra a baixa adesão dos MNC ao frasco de cultura, onde somente $24,2 \pm 0,9\%$ para o grupo controle, $27,8 \pm 2,6\%$ para o grupo HDDini, $20,1 \pm 1,8\%$ para o grupo HDDfim, $22,5 \pm 2,1\%$ para o grupo HDEini e $29,0 \pm 2,9\%$ para o grupo HDEFim dessas células permaneceram firmemente aderidas.

Em contraste, este número elevou-se para $37,4 \pm 0,7\%$ ($n=6$; $p<0,0001$), $47,6 \pm 1,2\%$ ($n=5$; $p=0,001$), $35,7 \pm 2,6\%$ ($n=5$; $p=0,009$), $36,0 \pm 2,7\%$ ($n=6$; $p=0,006$), $45,4 \pm 1,4\%$ ($n=6$; $p=0,001$), respectivamente para os grupos controle, HDDini, HDDfim, HDEini e HDEFim quando expostos à fibronectina, demonstrando diferenças significativas não somente entre essas populações (Figura 14-B), mas também em relação à adesividade natural.

Para a população de GNC, $36,4 \pm 1,8\%$ para o grupo controle, $34,1 \pm 1,8\%$ para o grupo HDDini, $28,8 \pm 3,2\%$ para o grupo HDDfim, $44,6 \pm 1,6\%$ para o grupo HDEini e $37,0 \pm 3,1\%$ para o grupo HDEFim foram os índices médios de adesão espontânea observados (Figura 15-A).

Quando expostos à fibronectina imobilizada, comportamento semelhante aos MNC, porém mais intenso foi observado, com $58,9 \pm 1,0\%$ ($n=5$; $p<0,001$) para o grupo controle, $48,8 \pm 1,5\%$ ($n=5$; $p<0,001$) para o grupo HDDini, $50,6 \pm 1,2\%$ ($n=5$; $p=0,004$) para o grupo HDDfim, $62,3 \pm 0,7\%$ ($n=5$; $p<0,001$)

para o grupo HDEini e $65,7 \pm 1,4\%$ ($n=5$; $p<0,0001$) para o grupo HDEfim de granulócitos recuperados da fração aderente (Figura 15-B).

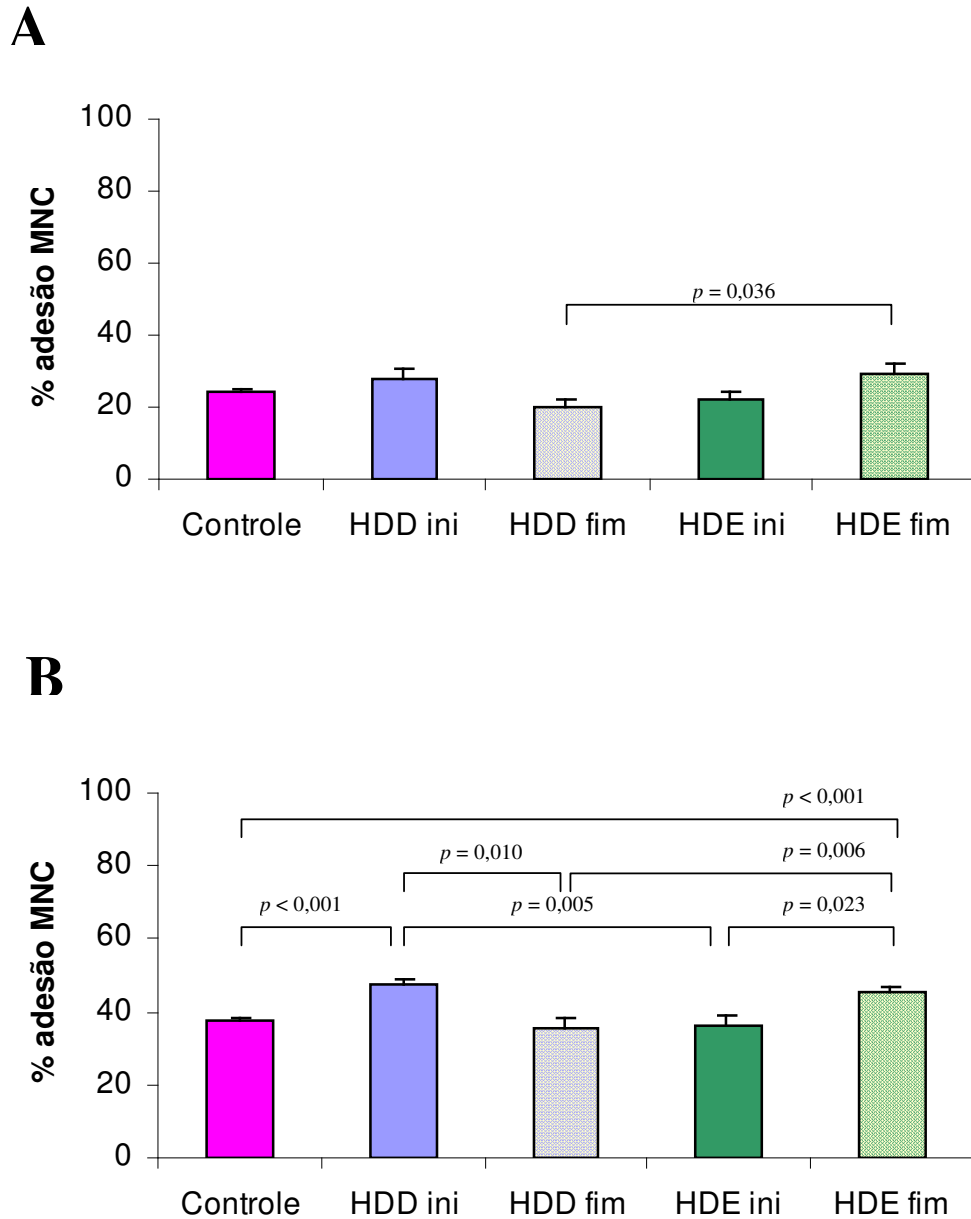


Figura 14. Adesão de leucócitos mononucleares a diferentes substratos. Células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes desnutridos e eutróficos em HD, obtidas após separação por centrifugação com gradiente de densidade ($1,077\text{g/cm}^3$), foram incubadas em

placas de cultura com ou sem a presença de fibronectina, como descrito na sessão de Material e Métodos. Após 1h à 37°C, as células em suspensão (não-aderentes) foram retiradas e contadas em hemocítmetro. Em seguida, as células firmemente aderidas à base do frasco (**A**) ou à FN (**B**) foram desalojadas após tratamento com tripsina e também enumeradas. Os resultados expressam a porcentagem média de adesão ± 1 EPM em relação à população inicial.

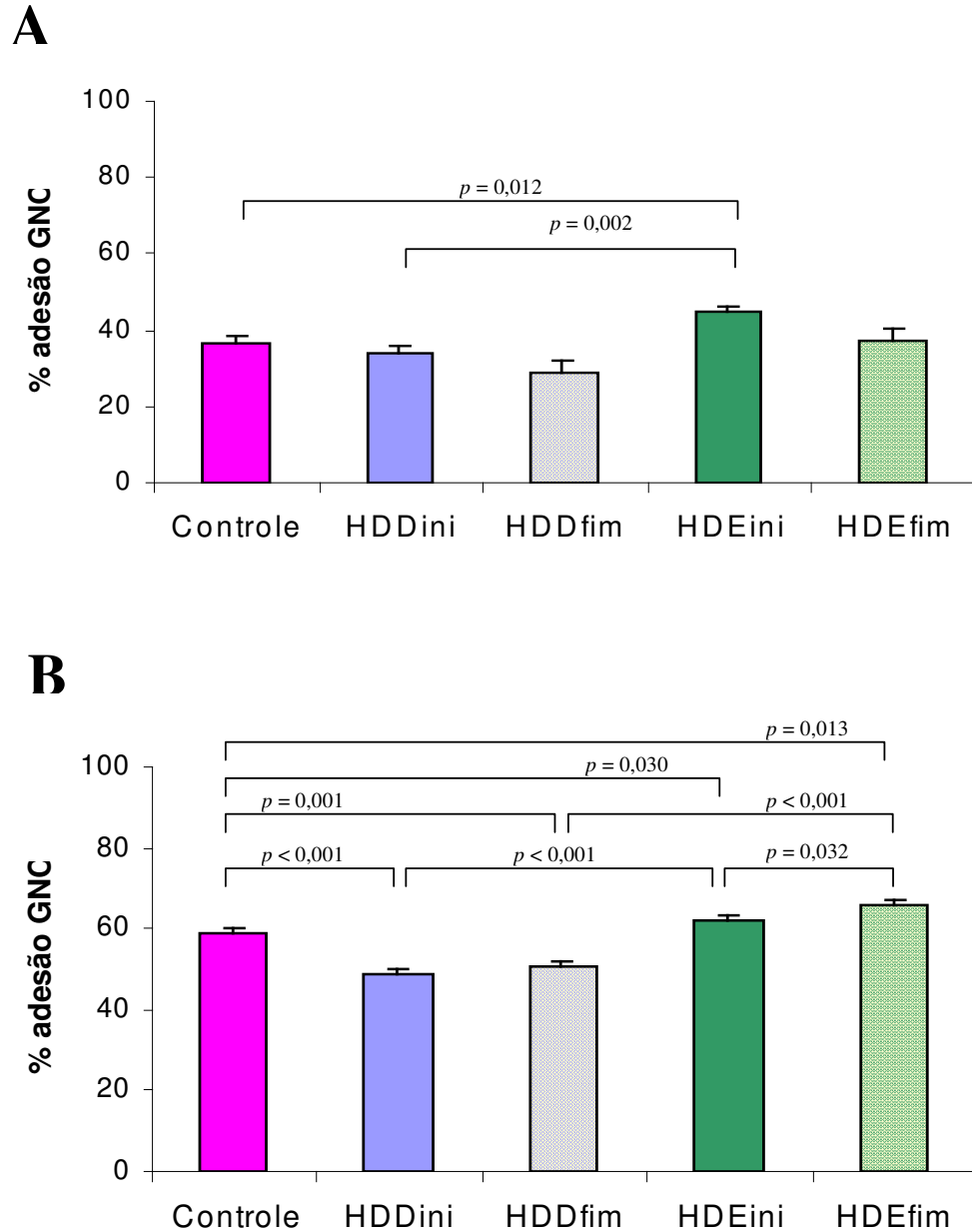


Figura 15. Adesão de leucócitos granulócitos a diferentes substratos. Granulócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes desnutridos e eutróficos em HD, obtidos após separação por centrifugação com gradiente de densidade ($1,077\text{g/cm}^3$), foram incubadas em placas de cultura com ou sem a presença de fibronectina, como descrito na sessão de

Material e Métodos. Após 1h à 37°C, as células em suspensão (não-aderentes) foram retiradas e contadas em hemocítômetro. Em seguida, as células firmemente aderidas à base do frasco (**A**) ou à FN (**B**) foram desalojadas após tratamento com tripsina e também enumeradas. Os resultados expressam a porcentagem média de adesão \pm 1 EPM em relação à população inicial.

5. DISCUSSÃO

Respostas imunológica e inflamatória adequadas requerem a migração de diferentes tipos de leucócitos que circulam no sangue periférico para a área de lesão. Essas células entram em contato com moléculas da matriz extracelular, composta por colágeno, glicoproteínas, proteoglicanas e moléculas associadas, tais como laminina e fibronectina. Além da manutenção da estrutura tecidual, a matriz extracelular e os seus ligantes atuam como moduladores da ativação, adesão, proliferação e diferenciação celulares. Muitas dessas funções são mediadas por receptores de integrinas das subfamílias β_1 e β_2 , expressos tanto nos leucócitos circulantes como nas paredes dos vasos e do endotélio subjacente após sua interação com o ligante (Springer, 1990).

Granulócitos, monócitos e linfócitos usam diversas moléculas para aderirem ao endotélio e sua adesividade pode ser modulada pelo estado de ativação de ambos (Butcher, 1991) e o estudo do padrão de sua expressão é central para o entendimento de alguns dos processos patológicos que comprometem e, eventualmente, agravam o estado de saúde de pacientes em HD.

Recentemente, uma diversidade de anticorpos específicos para detectar a expressão de proteínas na superfície celular por citometria de fluxo encontra-se disponível no mercado. A citometria de fluxo é um método de contagem automatizada que baseia-se em algumas características da célula, como o tamanho (FSC) e a complexidade estrutural interna (SSC), como elementos discriminantes para sua análise. O equipamento FACS (*fluorescent-activated cell sorter*) é um instrumento baseado na citometria de fluxo que seleciona células marcadas com um ou mais anticorpos quando conjugados a fluorocromos. As células marcadas podem, então, ser convenientemente

selecionadas, analisadas e, se necessário, separadas das outras quando, no aparelho, emitem fluorescência.

Uma estratégia de seleção, como as ilustradas nas Figuras 5 e 6, é normalmente requerida para separar uma ou mais populações de interesse e, simultaneamente, minimizar interferências de debris e/ou outras células às quais os anticorpos podem ligar-se de forma não-específica (Shapiro, 1995). Usando as características de tamanho e complexidade interna demonstrada nessas figuras, os linfócitos (LIN), monócitos (MON) e granulócitos (GNC) obtidos de pacientes com IRC em HD mostraram distribuição similar ao grupo controle (Figura 5) e comparáveis à descrita por outros (Civin e Loken, 1987). Embora não ilustrado, os monócitos de ambos os grupos de pacientes, estrategicamente selecionados pela expressão de CD14 (Figura 6), também apresentaram-se com perfil semelhante aquele demonstrado pelos monócitos do grupo sadio.

Em seguida, combinou-se a especificidade de anticorpos monoclonais para LFA-1, VLA-4 e VLA-5 conjugados a fluorocromos com a metodologia de citometria de fluxo para investigar a expressão de moléculas de adesão na superfície de leucócitos obtidos de pacientes com IRC desnutridos e eutróficos, ambos em HD.

Como revisado na introdução desta dissertação, LFA-1 é uma integrina β_2 normalmente presente nas subpopulações leucocitárias circulantes e está envolvida nos processos de adesão e migração dos leucócitos através do endotélio vascular e nos mecanismos primários envolvidos nas respostas inflamatória e imunitária (Larson *et al.*, 1991).

De fato, níveis elevados de LFA-1 foram encontrados em todas as populações leucocitárias analisadas neste trabalho (Figura 10), particularmente em granulócitos e linfócitos, células primárias dos mecanismos básicos de defesa. Esta elevada expressão foi independente (a) do estado de saúde das populações (controle vs. HDD vs. HDE), (b) do estado nutricional dos pacientes (HDD vs. HDE); ou (c) do processo dialítico (inicial vs. final).

Assim sendo, os níveis elevados de expressão de LFA-1 nos diferentes tipos de leucócitos demonstrados em nosso trabalho, tanto nos indivíduos do grupo controle como nos pacientes em HD, vêm corroborar com a já conhecida

ubíquua distribuição dessa molécula em leucócitos circulantes (Tielemans *et al.*, 1993; Zachee *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1998), independente de seu estado de ativação.

Por outro lado, os histogramas apresentados nas Figuras 7, 8 e 9 mostram perfis de expressão de LFA-1 distintos para as populações leucocitárias estudadas. Por exemplo, monócitos e granulócitos mostraram homogeneidade de expressão, representada pela base estreita e forma aguda dos picos dos histogramas, enquanto linfócitos mostraram distribuição, em sua maioria, bimodal.

Deve-se ressaltar que, neste trabalho, os linfócitos foram analisados como população única, mas é possível que o perfil diferenciado de expressão de LFA-1 observado para linfócitos possa estar relacionado às suas subpopulações, como sugerido por outros (Shimizu *et al.*, 1990a), as quais possuem funções diversificadas, contribuindo nos diferentes processos coadjuvantes da resposta imunitária. Para elucidar essa hipótese, anticorpos monoclonais específicos para cada subtipo de linfócitos poderiam ser utilizados e a expressão de LFA-1 novamente estudada.

Quando análise de VLA-4 foi realizada com as mesmas frações leucocitárias, níveis de expressão elevados foram encontrados nos linfócitos dos pacientes em HD (Figura 11-A), porém menores do que o observado para o controle, tendo sido inclusive significativo para o grupo dos pacientes eutróficos no início da diálise quando comparado aos indivíduos do grupo controle ($p=0,004$). De forma semelhante, menores e significativos níveis de expressão de VLA-4 foram observados para os monócitos destes pacientes (Figura 11-B), tanto no início ($p=0,001$) como no final da diálise ($p=0,045$) em comparação ao grupo controle. Entretanto, observou-se um aumento significativo na expressão de VLA-4 nos monócitos destes pacientes após o processo de filtração ($p=0,043$) em relação aos níveis iniciais.

A elevada expressão de VLA-4 encontrada em linfócitos e monócitos, corrobora com outros relatos confirmando sua expressão constitutiva (Larson *et al.*, 1991; St-Pierre *et al.*, 1996). Em contraste aos MNC, nossos resultados demonstraram níveis reduzidos dessa molécula em granulócitos (Figura 11-C) em todos os grupos estudados, também confirmando dados recentemente

relatados (Kipps, 2001). Interessante ressaltar que todos os pacientes em HD demonstraram uma tendência em apresentar níveis mais elevados dessa molécula em seus leucócitos do que os indivíduos do grupo controle. Entretanto, como observado para monócitos e linfócitos, houve aumento, embora discreto, da expressão de VLA-4 pelos granulócitos dos pacientes eutróficos após o processo dialítico.

Com relação a VLA-5, um perfil diferenciado de expressão, quando comparado às expressões de LFA-1 e VLA-4, pôde ser observado para os linfócitos de todos os pacientes em HD, no início ou final de diálise, independente do estado nutricional, com maior e significativa expressão em relação aos indivíduos sadios (HDDini: $p=0,013$; HDDfim: $p=0,003$; HDEini: $p<0,001$; HDEFim: $p<0,001$) (Figura 12-A).

Já para os monócitos, os níveis de expressão de VLA-5 foram muito semelhantes entre os grupos, porém com diminuição significativa da expressão após a diálise ($p=0,004$) para os pacientes HDD (Figura 12-B).

Assim como observado para linfócitos, os granulócitos de pacientes em HD, independente do estado nutricional ou do processo de diálise (Figura 12-C), expressaram maiores e significativos níveis de VLA-5 quando comparados ao grupo controle (HDDini: $p=0,005$; HDDfim: $p<0,001$; HDEini: $p<0,001$; HDEFim: $p=0,001$). Deve-se ressaltar que, em contraste com os resultados obtidos com linfócitos e monócitos de pacientes HDD, maiores e significativos níveis de VLA-5 nos granulócitos foram observados após a diálise quando comparados aos níveis detectados no início da sessão ($p=0,022$), sugerindo que o processo dialítico atua como um ativador de sua expressão.

Como revisado na introdução deste trabalho, leucócitos circulantes expressam algumas integrinas no estado inativo e sua ativação pode ser resultante da ação de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, algumas citocinas (Hynes, 1992). Estas por sua vez, geralmente encontram-se aumentadas no soro de pacientes em HD crônica (Pereira *et al.*, 1994) e vários estudos têm demonstrado que o processo dialítico pode induzir sua produção (Memoli *et al.*, 1999; Pertosa *et al.*, 2000; Toft *et al.*, 2002). Dessa forma, é provável que a variação dos níveis de expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5 nos

diferentes subtipos de leucócitos observada em nossos experimentos seja, também, resultante do processo de diálise.

De fato, interferência do processo de diálise nos níveis de expressão de outras moléculas de adesão já foi descrita, como por exemplo, para LAM-1 e Mac-1 (Arnaout *et al.*, 1985; Himmelfarb *et al.*, 1992; Thylen *et al.*, 1996) ou para CD62L (Alvarez *et al.*, 1991), dentre outras já citadas na introdução desta dissertação.

Os efeitos decorrentes do uso de membranas dialisadoras na geração de fatores que exacerbam os mecanismos da resposta inflamatória e, ao mesmo tempo, comprometem a resposta imunitária de pacientes portadores de insuficiência renal é amplamente documentado na literatura (Hoffmann *et al.*, 2003), sendo que especial atenção é dada à ativação dos leucócitos circulantes após o processo dialítico, observada especialmente pela modulação dos níveis de citocinas inflamatórias circulantes, como já citado, e na expressão de várias moléculas de adesão e de seus receptores. Como consequência, disfunção dessas células relacionadas à atividade metabólica dos fagócitos (Kubala *et al.*, 2002), sua migração (Thylen *et al.*, 1996; Kawabata *et al.*, 2001), à interação célula-célula (Rabb *et al.*, 1998) ou à sua adesão ao endotélio (Himmelfarb *et al.*, 1992; Thylen *et al.*, 1997) dentre outras, têm sido descritas.

Entretanto, o contato freqüente do sangue desses pacientes com essas membranas é, por enquanto, necessário e irremediável para sua sobrevivência e os distúrbios por ele desencadeados devem ser atenuados com medidas que visem a melhoria da qualidade de vida. Portanto, necessário se faz investir no desenvolvimento de membranas cada vez mais biocompatíveis, assim como em substâncias que possam amenizar (ou mesmo bloquear) os efeitos da ativação leucocitária exacerbada decorrentes do processo dialítico. Neste contexto, interessante são os relatos recentes demonstrando que o uso de substâncias antagonistas a ICAM-1 (Canonica e Ciprandi, 1999) e a VLA-4 têm se mostrado eficientes contra doenças de natureza alérgica e pulmonar, tanto *in vitro* (Koo *et al.*, 2003) como *in vivo* seja em modelos animais (Abraham *et al.*, 2000; Kudlacz *et al.*, 2002) como no homem (Koo *et al.*, 2003).

Como demonstrado até agora, LFA-1, VLA-4 e VLA-5 possuem perfis diferentes de expressão em pacientes em HD dependendo da população de leucócitos estudada, assim como sua expressão parece, de fato, sofrer influências do processo dialítico. Entretanto, a expressão de uma molécula não necessariamente demonstra sua capacidade de interagir com ligantes apropriados, intermediando sinais e funções.

Em paralelo à expressão de LFA-1, VLA-4 e VLA-5, um dos objetivos deste trabalho foi o de investigar a capacidade funcional de leucócitos de pacientes com IRC desnutridos e eutróficos em HD e compará-los com a atividade desempenhada por células normais. Para tanto, explorou-se o potencial dessas células em aderir, *in vitro*, a superfícies estranhas (Mosier, 1984). Para tanto, usou-se a superfície plástica do frasco de cultura como modelo. Depois, investigou-se sua interação com a molécula de fibronectina intacta, proteína da matriz extracelular com epítopos distintos para interação com VLA-4 e VLA-5.

Quando se comparou, entre os grupos, a capacidade natural de adesão dos leucócitos, pôde-se observar que os granulócitos dos pacientes eutróficos no início da diálise apresentaram maior e significativa habilidade adesiva em relação aos grupos controle ($p=0,012$) e HDDini ($p=0,002$) (Figura 15-A). Propriedade semelhante também foi observada pelos mononucleares desses pacientes quando comparados aos pacientes desnutridos ($p=0,036$), porém somente após a sessão de diálise (Figura 14-A). Esses resultados provavelmente refletem a biologia de ativação particular de cada tipo celular, neste caso entre mononucleares e granulócitos. Sabe-se que durante um processo inflamatório, muitos mediadores químicos são produzidos e que, muitos deles, têm a função de estimular as diferentes funções leucocitárias (Cotran *et al.*, 1994). Portanto, é possível que, para os GNC, a presença de um estado de ativação prévio tenha influenciado o seu comportamento *in vitro*, tornando-os mais prontamente responsivos ao estímulo de adesão, enquanto o processo dialítico tenha sido necessário para ativar os MNC.

Vários estudos têm demonstrado que diferentes tipos de leucócitos respondem de forma particular a, por exemplo, estímulos quimiotáticos, dependendo de estarem ou não sensibilizados e/ou ativados pela presença de

citocinas inflamatórias (Shalaby *et al.*, 1985; Ozaki *et al.*, 1987; Nathan, 1989) ou outras substâncias (Lomas *et al.*, 1991). Neste contexto, Hill e colegas relataram que neutrófilos de pacientes com infecções estreptocócicas de pele (Hill *et al.*, 1974a), assim como os de pacientes jovens portadores de infecções bacterianas sistêmicas (Hill *et al.*, 1974b) apresentaram aumento da locomoção *in vitro*. Semelhante efeito foi, também, registrado para leucócitos provenientes de pacientes com infecções por *Mycoplasma pneumoniae* (Martin *et al.*, 1973) e daqueles de pacientes apresentando pirexia e leucocitose, devido a infecções piogênicas severas (Krukowski, 1978).

Quando a adesão de leucócitos à fibronectina foi analisada, monócitos e granulócitos de pacientes HDE mostraram-se competentes, particularmente após o processo dialítico, em exercer essa função. Evidências sugerem que mesmo uma curta exposição dos leucócitos às citocinas pró-inflamatórias aumentam significativamente a avidéz de VLA-4 e VLA-5 pela fibronectina, resultando em uma maior adesão (Lévesque *et al.*, 1995). Assim, é provável que a significativa adesão dos leucócitos de pacientes HDE à fibronectina observada seja não só um reflexo do aumento da expressão de VLA-5 como observado em nossos experimentos, mas também a um estado de ativação maior destas células em relação às células obtidas dos outros grupos estudados como anteriormente proposto. Por outro lado, é possível que essa diferença de respostas entre as células estudadas esteja associada, também, à concentração de fibronectina necessária para desencadear o mecanismo de ativação seguido de adesão para os MNC.

Os resultados aqui demonstrados indicam que tanto os MNC como os GNC de pacientes HDE são dotadas de habilidade funcional, pelo menos aquela que se refere à adesão, semelhante ou até melhor à desempenhada por essas populações provenientes de voluntários sadios, em profundo contraste com os resultados observados para com leucócitos do grupo de pacientes desnutridos. Uma possível explicação poderia ser com referência à diminuição da expressão de VLA-5 nessas células após a diálise, a qual chegou a ser inclusive significativa para monócitos (Figura 12-B). Entretanto, para granulócitos, nossos dados mostram um aumento significativo na expressão de VLA-5 após o processo de filtração (Figura 12-C).

A diferença majoritária entre os dois grupos de pacientes com IRC em HD analisados neste trabalho foi com relação ao seu distinto estado nutricional, caracterizando-os como eutróficos (HDE) e desnutridos (HDD). Assim sendo, uma outra alternativa seria de que a deficiência nutricional, evidente no grupo HDD, poderia estar comprometendo, de alguma forma, a função dessas células. Com a finalidade de se esclarecer a razão pela qual granulócitos de pacientes desnutridos em HD tiveram menor adesão à fibronectina, investigou-se a composição celular desta fração em citocentrifugados e uma marcante proporção de neutrófilos bastonetes foi encontrada no material (Tabela 3) obtido desses pacientes (Figura 13).

Pacientes com IRC, quando submetidos à HD, apresentam uma leucopenia transitória, substituída por imediata leucocitose (Kaplow e Goffinet, 1968). Estudos mais aprofundados envolvendo os *pools* marginal e circulante de neutrófilos durante esses processos, têm mostrado diferenças na maturidade das células que compõem esses *pools*, onde representantes mais jovens (bastonetes) abundam na circulação enquanto neutrófilos totalmente diferenciados e maduros (segmentados) encontram-se sequestrados, particularmente na região pulmonar (Fehr e Grossmann, 1979). Recentemente, cinética semelhante foi descrita para monócitos (Girndt *et al.*, 2001). Entretanto, é preciso ressaltar que o elevado número de bastonetes observado nos pacientes do grupo HDD foi independente do processo dialítico, refletindo uma cinética diferenciada desse tipo de leucócitos em relação aos pacientes HDE.

Modelos experimentais de animais desnutridos têm revelado deficiências na hematopoiese, onde se observou hipoplasia mielóide e esplênica (Borelli *et al.*, 1995), com bloqueio de diferenciação de células blásticas (Blatt *et al.*, 2003), refletindo em uma redução de células sanguíneas maduras na circulação (Fried *et al.*, 1978; Blatt *et al.*, 2003).

Medula óssea de ratos desnutridos mostram atrofia de todos os compartimentos de neutrófilos associada a uma redução proporcional no trânsito celular de um compartimento para outro, além de atraso de chegada de PMN circulantes nos locais de lesão (Suda *et al.*, 1976). Tempo maior para maturação de células mielóides tem sido descrito em animais desnutridos

(Ortiz e Betancourt, 1984) e está, provavelmente, associado aos mesmos mecanismos moleculares observados na deficiência de precursores do DNA, como ácido fólico e vitamina B12 em humanos (Scott e Weir, 1994).

Interferência do estado de desnutrição com as respostas imunitária (Chandra, 1991) e inflamatória (Keusch e Farthing, 1986) tem sido amplamente descrita e foi bastante discutida neste trabalho. Além disso, há estudos recentes mostrando que a desnutrição provoca mudanças no microambiente medular, com aumento de deposição de fibronectina e laminina, não apenas em modelos animais (Favero *et al.*, 2003), mas também em humanos (Savino, 2002). Em paralelo, estudos *in vitro* têm demonstrado menor capacidade adesiva de macrófagos provenientes de camundongos desnutridos à fibronectina, vitronectina e colágeno quando comparados a controles saudáveis (Borelli *et al.*, 1998).

Em condições fisiológicas basais, a produção de granulócitos na medula óssea é totalmente dependente de interações entre as células progenitoras e o microambiente medular, assim como da presença de várias moléculas que promovem o seu amadurecimento. Durante o seu desenvolvimento, proteínas específicas para cada estágio maturacional são, então, sintetizadas com o objetivo de formar elementos maduros, capazes de responder a estímulos variados, assim como exercer atividades essenciais à defesa do organismo, tais como adesão, diapedese, locomoção, fagocitose, eliminação de bactérias, secreção de citocinas, expressão de receptores, produção de espécies reativas de oxigênio *etc.* Quando diferenciados, maduros e competentes, deixam o ambiente medular e passam para a circulação sangüínea, onde são capazes de executar várias mudanças complexas e rápidas na expressão de genes que regulam suas inúmeras atividades acima descritas (Newburger *et al.*, 2000), dentre outras, quando devidamente estimulados (Tsukahara *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

No sangue periférico, cerca de 80% dessas células estão sob a forma de segmentados, sendo o restante composto por neutrófilos bastonetes, caracterizados morfológicamente por incompleta segmentação do núcleo, porém ambos respondem com semelhante competência funcional quando necessário (Lee *et al.*, 1999).

Entretanto, estudos comparando as atividades exercidas por bastonetes e segmentados presentes na circulação com aqueles ainda residentes na medula têm demonstrado diferenças na habilidade funcional desses *pools*, como por exemplo, diminuição da atividade da fosfatase alcalina (Fehr e Grossmann, 1979), diminuição da fagocitose (Steele *et al.*, 1987), produção defeituosa de radicais superóxido após estimulação com peptídeos bacterianos, baixa atividade da oxidase NADPH-dependente (Berkow e Dodson, 1986), indicando que esses neutrófilos, embora morfológicamente maduros, permanecem funcionalmente imaturos. Além disso, relatos demonstram que monócitos circulantes obtidos de pacientes com IRC em HD diferem na expressão de moléculas de adesão conforme seu grau de maturidade (Faull *et al.*, 1996).

Neste trabalho, estudou-se a influência do estado nutricional na atividade de adesão leucocitária de pacientes em HD. Embora simples, nossos resultados mostraram significativa disfunção adesiva na população celular primariamente responsável por vários processos naturais de defesa. Além disso, observou-se a presença de células imaturas na circulação de pacientes desnutridos independente do processo dialítico, sugerindo uma cinética de reposição mielóide periférica diferenciada daqueles com estado nutricional adequado. Portanto, é possível que nossos resultados de adesão estejam relacionados à circulação de um *pool* de PMN mais jovens, funcionalmente comprometidos e que esta disfunção resulte de uma somatória de distúrbios decorrentes do seu estado desnutrido, acometendo não só o microambiente medular, a proliferação, diferenciação e maturação de células sangüíneas, mas e principalmente, sua função.

6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que:

- linfócitos, monócitos e granulócitos de pacientes em HD possuem níveis de expressão de LFA-1 semelhantes aos indivíduos saudáveis e o processo dialítico aumenta esta expressão somente em granulócitos dos pacientes eutróficos em HD.
- linfócitos e monócitos de pacientes eutróficos em HD possuem níveis de expressão de VLA-4 significativamente menores do que indivíduos saudáveis e o processo dialítico aumenta esses níveis apenas para monócitos.
- linfócitos e granulócitos de pacientes desnutridos e eutróficos em HD, independente do processo dialítico, possuem níveis de expressão de VLA-5 significativamente maiores que indivíduos saudáveis.
- os níveis de expressão de VLA-5 em linfócitos e monócitos aumentam para pacientes eutróficos em HD após a diálise, enquanto diminuem para granulócitos.
- em contraste, os níveis de expressão de VLA-5 em linfócitos e monócitos de pacientes desnutridos em HD diminuem após a diálise, enquanto aumentam em granulócitos.
- granulócitos de pacientes desnutridos em HD possuem menor e significativa capacidade de adesão a FN, independente do processo dialítico, quando comparado a pacientes eutróficos em HD e

indivíduos sadios, independente do aumento de VLA-5 após a diálise.

Tem se tornado cada vez mais notório que o estado nutricional de pacientes em HD influencia a evolução de seu quadro clínico e pode ser um fator determinante na qualidade de vida desses pacientes.

Neste trabalho, analisamos apenas uma pequena e inespecífica parte dos eventos que ocorrem em uma resposta inflamatória, ou seja, a capacidade de expressão de MA nos leucócitos e sua habilidade em aderir a uma proteína da matriz extracelular. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados obtidos e as informações deles derivadas delinearam alguns dos mecanismos contribuintes do estado inflamatório crônico presente em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise e essas considerações abrem, com certeza, um horizonte de possibilidades que deverão ser exploradas exaustivamente, a fim de testemunharem (experimentalmente) a contribuição negativa da desnutrição nos mais diferentes mecanismos orgânicos, tornando-se ferramentas mestras que incentivem mudanças na prática clínica e dietoterápica desses pacientes, visando seu bem estar.

7. REFERÊNCIAS

- Abraham W.M.; Gill A.; Ahmed A.; Sielczak M.W.; Lauredo I.T.; Botinnikova Y.; Lin K.C.; Pepinsky B.; Leone D.R.; Lobb R.R. e Adams S.P. A small-molecule, tight-binding inhibitor of the integrin alpha(4)beta(1) blocks antigen-induced airway responses and inflammation in experimental asthma in sheep. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **162**: 603-611, 2000.
- Akiyama S.K.; Nagata K. e Yamada K.M. Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta* **1031**: 91-110, 1990.
- Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K. e Watson J.D. Molecular biology of the cell. New York. 1294p. 1994.
- Alvarez V.; Pulido R.; Campanero M.R.; Paraiso V.; de Landazuri M.D. e Sanchez-Madrid F. Differentially regulated cell surface expression of leukocyte adhesion receptors on neutrophils. *Kidney International* **40**: 899-905, 1991.
- Alvestrand A. Protein metabolism and nutrition in hemodialysis patients. *Contributions to Nephrology* **78**: 102-118, 1990.
- Arnaout M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules (CD18/CD11). *Blood* **75**: 1037-1050, 1990.
- Arnaout M.A.; Hakim R.M.; Todd R.F.; Dana N. e Colten H.R. Increased expression of an adhesion-promoting surface glycoprotein in the granulocytopenia of hemodialysis. *New England Journal of Medicine* **312**: 457-462, 1985.
- Baker J.P.; Detsky A.S.; Wesson D.E.; Wolman S.L.; Stewart S.; Whitewell J.; Langer B. e Jeejeebhoy K.N. Nutritional assessment: a comparison of clinical judgement and objective measurements. *New England Journal of Medicine* **306**: 969-972, 1982.

- Balkwill F.R. Cytokines, a practical approach. Oxford, IRL Press. 417p. 1997.
- Banerji D. The knowledge of human nutrition and the peoples of the world. *World Review of Nutrition and Dietetics* **57**: 1-23, 1988.
- Becker D.J. The endocrine responses to protein calorie malnutrition. *Annual Review of Nutrition* **3**: 187-212, 1983.
- Beisel W.R. Metabolic effects of infection. *Progress in Food and Nutrition Sciences* **8**: 43-75, 1984.
- Ben-Baruch A.; Michiel D.F. e Oppenheim J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 11703-11706, 1995.
- Bergström J. Nutrition and mortality in hemodialysis. *Journal of American Society Nephrology* **6**: 1329-1341, 1995.
- Bergström J. e Lindholm B. What are the causes and consequences of the chronic inflammatory state in chronic dialysis patients? *Seminars in dialysis* **13**: 163-164, 2000.
- Berkow R.L. e Dodson R.W. Purification and functional evaluation of mature neutrophils from human bone marrow. *Blood* **68**: 853-860, 1986.
- Beutler B. Tumor necrosis factor, cachexia, shock and inflammation: a common mediator. *Annual Review Biochemistry* **57**: 505-518, 1988.
- Bhaskaram P. Immunobiology of mild micronutrient deficiencies. *The British Journal of Nutrition* **85**: S75-80, 2001.
- Bilbrey C. e Cohen T. Identification and treatment of protein calorie malnutrition in chronic hemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**: 669-678, 1989.
- Bingel M.; Lonnemann G.; Koch K.M.; Dinarello C.A. e Shaldon S. Enhancement of *in vitro* human interleukin-1 production of sodium acetate. *Lancet* **1**: 14-16, 1987.
- Blatt S.L.; Fock R.; Favero M.E.; Souza A.C.; Tsujita M.; Vinolo M.; Silva M.C.F. e Borelli P. Avaliação do perfil imunofenotípico e da apoptose da medula óssea em desnutrição protéica. *XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FESBE*, n 14052. Curitiba/PR. 2003.
- Bokoch G.M. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **86**: 1648-1660, 1995.
- Bolton C.H.; Downs L.G.; Victory J.G.; Dwight J.F.; Tomson C.R.; Mackness M.I. e Pinkney J.H. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology Dialysis Transplantation* **16**: 1189-1197, 2001.
- Bonomini M.; Reale M.; Santarelli P.; Stuard S.; Settefrati N. e Albertazzi A. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron* **79**: 399-407, 1998.

- Borelli P.; Mariano M. e Borojevic R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutrition Research* **15**: 1477-1485, 1995.
- Borelli P.; Souza I.P.; Borojevic R.; Dagli M.L. e Kang H.C. Protein malnutrition: some aspects of the *in vitro* adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Annals of Nutrition & Metabolism* **42**: 367-373, 1998.
- Buck C.A. e Horwitz A.F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annual Review of Cell Biology* **3**: 179-205, 1987.
- Burridge K.; Fath K.; Kelly T.; Nuckolls G. e Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology* **4**: 487-525, 1988.
- Butcher E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67**: 1033-1036, 1991.
- Canonica G.W. e Ciprandi G. Minimal persistent inflammation may be controlled by cetirizine. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **83**: 445-448, 1999.
- Carlos T.M. e Harlan J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101, 1994.
- Cassatela M.A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today* **16**: 21-26, 1995.
- Chan C. e Greene G. Dietary compliance among young hemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **23**: 67-68, 1994.
- Chandra R.K. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. *Acta Paediatrica Scandinavica (S374)*: 129-132, 1991.
- Chandra R.K. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proceedings of the Nutrition Society* **58**: 681-683, 1999.
- Cianciaruso B.; Brunori G.; Kopple J.D.; Traverso G.; Panarello G.; Enia G.; Strippoli P.; De Vecchi A.; Querques M. e Viglino G. Cross-sectional comparison of malnutrition in continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Disease* **26**: 475-486, 1995.
- Civin C.I. e Loken M.R. Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *International Journal of Cell Cloning* **5**: 267-288, 1987.
- Clark B.R.; Gallagher J.T. e Dexter T.M. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. *Bailliere's Clinical Haematology* **5**: 619-652, 1992.
- Cotran R.S.; Kumar V. e Robbins S.L. Pathologic basis of disease. Philadelphia, W.B. Saunders Co. 1400p. 1994.
- Dacie J.D. e Lewis S.M. Practical haematology. Edinburgh, Churchill Livingstone. 609p. 1995.
- Dekker L.V. e Segal A.W. Signals to move cells. *Science* **287**: 982-985, 2000.

- Descombes E.; Hanck A.B. e Fellay G. Water soluble vitamins in chronic hemodialysis patients and need for supplementation. *Kidney International* **43**: 1319-1328, 1993.
- Dinareello C.A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. *New England Journal of Medicine* **311**: 1413-1418, 1984.
- Doherty D.E.; Henson P.M. e Clark R.A. Fibronectin fragments containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung. A potential mechanism for C5 fragment-induced monocyte lung accumulation. *The Journal of Clinical Investigation* **86**: 1065-1075, 1990.
- Dudez T.S.; Chanson M.; Schlegel-Haueter S.E. e Suter S. Characterization of a novel chemotactic factor for neutrophils in the bronchial secretions of patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* **186**: 774-781, 2002.
- Durig J.; E.A. D.W.; Kasper C.; Cross M.A.; Chang J.; Testa N.G. e Heyworth C.M. Expression of macrophage inflammatory protein-1 receptors in human CD34(+) hematopoietic cells and their modulation by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Blood* **92**: 3073-3081, 1998.
- Durig J.; Rosenthal C.; Elmaagacli A.; Heyworth C.M.; Halfmeyer K.; Kasper C.; Novotny J. e Duhrsen U. Biological effects of stroma-derived factor -1alpha on normal and CML CD34+ haemopoietic cells. *Leukemia* **14**: 1652-1660, 2000.
- Durig J.; Testa N.G. e Heyworth C.M. Distinct biological effects of macrophage inflammatory protein-1alpha and stroma-derived factor-1alpha on CD34+ haemopoietic cells. *Stem Cells* **17**: 62-71, 1999.
- Elsner J.; Sach M.; Knopf H.P.; Norgauer J.; Kapp A.; Schollmeyer P. e Dobos G.J. Synthesis and surface expression of ICAM-1 in polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in normal subjects and during inflammatory disease. *Immunobiology* **193**: 456-464, 1995.
- Engel J. e Prockop D.J. The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. *Annual Review of Biophysics and Chemistry* **20**: 137-152, 1991.
- Faull R.J.; Wang J. e Stavros W. Changes in the expression of adhesion molecules as peripheral blood monocytes differentiate into peritoneal macrophages. *Nephrology Dialysis Transplantation* **11**: 2037-2044, 1996.
- Favero M.E.; Blatt S.L.; Fock R.; Souza A.C. e Borelli P. Alterações da matriz extracelular da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica. *XVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FESBE*, n 14053. Curitiba/PR. 2003
- Fehr J. e Grossmann H.C. Disparity between circulating and marginated neutrophils: evidence from studies on the granulocyte alkaline phosphatase, a marker of cell maturity. *American Journal of Hematology* **7**: 369-379, 1979.
- Ferguson T.A.; Mizutani H. e Kupper T.S. Two integrin-binding peptides abrogate T cell-mediated immune responses *in vivo*. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America **88**: 8072-8076, 1991.

- Ferro-Luzzi A. e Spadoni M.A. Protein-energy malnutrition. *Progress in Food and Nutrition Sciences* **2**: 515-541, 1978.
- Fried W.; Barone S.J. e Anagnostou A. Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **92**: 303-310, 1978.
- Gahmberg C.G.; Valmu L.; Tian L.; Kotovuori P.; Fagerholm S.; Kotovuori A.; Kantor C. e Hilden T. Leukocyte adhesion - a fundamental process in leukocyte physiology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**: 511-517, 1999.
- Girndt M.; Kaul H.; Leitnaker C.K.; Sester M.; Sester U. e Köhler H. Selective sequestration of cytokine-producing monocytes during hemodialysis treatment. *American Journal of Kidney Disease* **37**: 954-963, 2001.
- Gutierrez A.; Alvestrand A.; Wahren J. e Bergstrom J. Effect of *in vivo* contact between blood and dialysis membranes on protein catabolism in humans. *Kidney International* **38**: 487-494, 1990.
- Hakim R.M.; Breillatt J.; Lazarus J.M. e Port F.K. Complement activation and hypersensitivity reaction to dialysis membranes. *New England Journal of Medicine* **311**: 878-882, 1984.
- Hallet M.B.; Davies E.V. e Campbell A.K. Oxidase activation in individual neutrophils is dependent on the onset and magnitude of the Ca²⁺ signal. *Cell Calcium* **11**: 655-663, 1990.
- Heinrich P.C.; Castell J.S. e Andus T. Interleukin-6 and acute phase response. *The Biochemical Journal* **265**: 621-636, 1990.
- Hill H.R.; Gerrard J.M.; Hogan N.A. e Quie P.G. Hyperactivity of neutrophil leukotactic responses during active bacterial infection. *Journal of Clinical Investigation* **53**: 996-1002, 1974a.
- Hill H.R.; Kaplan E.L.; Dajani A.S.; Wannamaker L.W. e Quie P.G. Leukotactic activity and reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophil granulocytes from patients with streptococcal skin infection. *The Journal of Infectious Diseases* **129**: 322-326, 1974b.
- Himmelfarb J.; Zaoui P. e Hakim R. Modulation of granulocyte LAM-1 and MAC-1 during dialysis - a prospective, randomized controlled trial. *Kidney International* **41**: 388-395, 1992.
- Hoffmann U.; Fischereeder M.; Marx M.; Schweda F.; Lang B.; Straub R.H. e Kramer B.K. Induction of cytokines and adhesion molecules in stable hemodialysis patients: is there an effect of membrane material? *American Journal of Nephrology* **23**: 442-447, 2003.
- Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**: 549-554, 1987.
- Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25, 1992.

- Ikizler T.A.; Wingard L.; Harvell J.; Shyr Y. e Hakim M. Association of morbidity with markers of nutrition and inflammation in chronic hemodialysis patients: a prospective study. *Kidney International* **55**: 1945-1951, 1999.
- Iseki K.; Tozawa M.; Yoshi S. e Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **14**: 1956-1960, 1999.
- Jacob V.; Le Carpentier J.E.; Salzano S.; Naylor V.; Wild G.; Brown C.B. e el Nahas A.M. IGF-I, a marker of undernutrition in hemodialysis patients. *American Journal of Clinical Nutrition* **52**: 39-44, 1990.
- Jacobson S.H.; Egberg N.; Hylander B. e Lundahl J. Correlation between soluble markers of endothelial dysfunction in patients with renal failure. *American Journal of Nephrology* **22**: 42-47, 2002.
- Jacobson S.H.; Hylander B.; Thylen P. e Lundahl J. Monocyte-related determinants of inflammation in patients on peritoneal dialysis. *American Journal of Nephrology* **21**: 40-46, 2001.
- Jacobson S.H.; Thylen P. e Lundahl J. Three monocyte-related determinants of atherosclerosis in haemodialysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* **15**: 1414-1419, 2000.
- Kaplow L.S. e Goffinet J.A. Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. *JAMA* **203**: 133-135, 1968.
- Kawabata K.; Nakai S.; Miwa M.; Sugiura T.; Otsuka Y.; Shinzato T.; Hiki N.; Tomimatsu I.; Ushida Y.; Hosono F. e Maeda K. CD31 expression on leukocytes is downregulated *in vivo* during hemodialysis. *Nephron* **89**: 153-160, 2001.
- Kaysen G.A.; Dubin J.A.; Muller H.G.; Rosales L.M. e Levin N.W. The acute phase response varies with time and predicts serum albumin levels in hemodialysis patients. *Kidney International* **58**: 346-352, 2000.
- Kaysen G.A.; Stevenson F.T. e Depner T.A. Determinants of albumin concentration in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Disease* **29**: 658-668, 1997.
- Keenan R.A.; Moldawer L.L.; Yang R.D.; Kawamura I.; Blackburn G.L. e Bistrian B.R. An altered response by peripheral leukocytes to synthesize or release leukocyte endogenous mediator in critically ill, protein-malnourished patients. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **100**: 844-857, 1982.
- Keusch G.T. e Farthing M.J. Nutrition and infection. *Annual Review of Nutrition* **6**: 131-154, 1986.
- Kipps T.J. The cluster of differentiation antigens. In Willian hematology. Beutler E.; Lichtman M.A.; Coller B.S.; Kipps T.J. e Seligsohn U. (eds.) New York, McGraw -Hill: 141-152. 2001
- Koo G.C.; Shah K.; Ding G.J.; Xiao J.; Wnek R.; Doherty G.; Tong X.C.; Pepinsky R.B.; Lin K.C.; Hagmann W.K.; Kawka D. e Singer, II. A small molecule very late antigen-4 antagonist can inhibit ovalbumin-induced

- lung inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **167**: 1400-1409, 2003.
- Kopple J. Nutrition, diet and the kidney. Modern nutrition in health and disease. Shills M.E.; Young, V. (eds.) Philadelphia, Lea Febiger. 1988
- Kopple J. National kidney foundation K/DOQI clinical practice guidelines for nutrition in chronic renal failure. *American Journal of Kidney Disease* **37**: S66-70, 2001.
- Krukowski Z.H. Studies of polymorphonuclear neutrophil leukocyte function in relation to surgical practice. Ph.D. Thesis. University of Aberdeen: 201p. 1978
- Kubala L.; Ciz M.; Soska V.; Cerny J. e Lojek A. Influence of polysulfone and hemophan hemodialysis membranes on phagocytes. *General Physiology and Biophysics* **21**: 367-380, 2002.
- Kudlacz E.; Whitney C.; Andresen C.; Duplantier A.; Beckius G.; Chupak L.; Klein A.; Kraus K. e Milici A. Pulmonary eosinophilia in a murine model of allergic inflammation is attenuated by small molecule alpha4beta1 antagonists. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **301**: 747-752, 2002.
- Lampugnani M.G. e Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 674, 1997.
- Larson R.S.; Hibbs M.L. e Springer T.A. The leukocyte integrin LFA-1 reconstituted by cDNA transfection in a nonhematopoietic cell line is functionally active and not transiently regulated. *Cell Regulation* **1**: 359-367, 1991.
- Lawrence M.B. e Springer T.A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**: 859, 1991.
- Lee G.R.; Foerster J.; Lukens J.; Paraskevas F.; Greer J.P. e Rodgers G.M. Wintrobe's clinical hematology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2763p. 1999.
- Lévesque J.P.; Leavesley D.I.; Niutta S.; Vadas M. e Simmons P.J. Cytokines increase human hematopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 e VLA-5 integrins. *Journal of Experimental Medicine* **181**: 1805, 1995.
- Lomas D.A.; Ip M.; Chamba A. e Stockley R.A. The effect of *in vitro* and *in vivo* dexamethasone on human neutrophil function. *Agents and Actions* **33**: 279-285, 1991.
- Lonnermann G.; Bingel M.; Floege J.; Koch K.M.; Shaldon S. e Dinarello C.A. Detection of endotoxin-like interleukin-1 inducing activity during *in vitro* dialysis. *Kidney International* **33**: 19-35, 1988.
- Mackai I.R. e Rosen F.S. T-cell function and migration. *The New England Journal of Medicine* **343**: 1020-1034, 2000.

- Markmann P. Nutritional status of patients of hemodialysis and peritoneal dialysis. *Clinical Nephrology* **29**: 75-78, 1988.
- Martin R.R.; Warr G.; Cough R. e Knight V. Chemotaxis of human leukocytes: responsiveness to *Mycoplasma pneumoniae*. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **81**: 520-529, 1973.
- Martins C. e Riella M.C. Nutrição e hemodiálise. Nutrição e o rim. In: Riella M.C. e Martins C. (eds.) Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 114-131. 2001
- Matsumoto Y.; Shinzato T.; Takai I.; Nishimoto A.; Nakai S.; Sakai T.; Amano I. e Maeda K. Peripheral deletion of gamma delta T cells in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **13**: 2861-2866, 1998.
- Memoli B.; Marzano L.; Bisesti V.; Andreucci M. e Guida B. Hemodialysis-related lymphomononuclear release of interleukin-12 in patients with end-stage renal disease. *Journal of American Society Nephrology* **10**: 2171-2176, 1999.
- Merchant D.; Kahn R. e Murphy W. Handbook of cell and organ culture, Burgess Publishing, Broken Arrow. 1964.
- Mosier D.E. Separation of macrophages on plastic and glass surfaces. *Methods in Enzymology* **108**: 294-297, 1984.
- Murdoch C. e Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* **95**: 3032-3043, 2000.
- Nathan C.F. Respiratory burst in adherent human neutrophils: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G. *Blood* **73**: 301-306, 1989.
- Newburger P.E.; Subrahmanyam Y.V. e Weissman S.M. Global analysis of neutrophil gene expression. *Current Opinion in Hematology* **7**: 16-20, 2000.
- Ortiz R. e Betancourt M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *The Journal of Nutrition* **114**: 472-476, 1984.
- Ozaki Y.; Ohashi T. e Kume S. Potential of neutrophil function by recombinant DNA-produced interleukin 1a. *Journal of Leukocyte Biology* **42**: 621-627, 1987.
- Papagianni A.; Kalovoulos M.; Kirmizis D.; Vainas A.; Belechri A.M.; Alexopoulos E. e Memmos D. Carotid atherosclerosis is associated with inflammation and endothelial cell adhesion molecules in chronic haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **18**: 113-119, 2003.
- Papayianni A.; Alexopoulos E.; Giamalis P.; Gionanlis L.; Belechri A.M.; Koukoudis P. e Memmos D. Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events. *Nephrology Dialysis Transplantation* **17**: 435-441, 2002.
- Pereira B.J.G.; Shapiro, L.; King A.J.; Falagas M.E.; Strom J.A. e Dinarello C.A. Plasma levels of IL-1, TNF- α and their specific inhibitors in undialyzed

- chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney International* **45**: 890-896, 1994.
- Pertosa G.; Grandaliano G.; Gesualdo L. e Schena F.P. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney International* **38 (S76)**: 104-111, 2000.
- Peters W.P.; Holland J.F.; Senn H.; Rhomberg W. e Benerjee T. Corticosteroid administration and localized leukocyte, mobilization in man. *New England Journal of Medicine* **282**: 342-345, 1972.
- Plata-Salamán C.R. Cytocines and anorexia: a brief overview. *Seminars in Oncology* **25**: 64-72, 1998.
- Quesenberry P.J. e Colvin G.A. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In Willians hematology. Beutler E.;Lichtman M.A.;Coller B.S.;Kipps T.J. e Seligsohn U. (eds.) New York, McGraw-Hill: 153-174. 2001
- Qureshi A.R.; Alvestrand A.; Danielson A.; Divino-Filho J.C.; Gutierrez A.; Lindholm B. e Bergström J. Factors influencing malnutrition in hemodialysis patients. A cross-sectional study. *Kidney International* **53**: 773-782, 1998.
- Rabb H.; Agosti S.J.; Hakala S.; Hoffman P.; Gallatin W.M. e Ramirez G. The leukointegrin alpha d/beta 2 (alpha d/CD18): specific changes in surface expression in patients on hemodialysis. *Cell Adhesion and Communication* **6**: 13-20, 1998.
- Redmond H.P.; Shou J.; Kelly C.J.; Schreider S.; Miller E.; Leon P. e Daly J.M. Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. *Surgery* **110**: 311-317, 1991.
- Reeves G. e Todd I. Lectures notes on immunology. Oxford, Blackwell Science. 267p. 2000.
- Riella M.C. Malnutrition in dialysis: malnourishment or uremic inflammatory response? *Kidney International* **57**: 1211-1232, 2000.
- Rixen D.; Siegel J.H. e Friedman H.P. "Sepsis/SIRS," physiologic classification, severity stratification, relation to cytokine elaboration and outcome prediction in posttrauma critical illness. *The Journal of Trauma* **41**: 581-598, 1996.
- Rodkey F.L. Binding of bromocresol green by human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **108**, 1964.
- Roumen R.M.; Hendriks T.; van der Ven-Jongekrijg J.; Nieuwenhuijzen G.A.; Sauerwein R.W.; van der Meer J.W. e Goris R.J. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Annals of Surgery* **218**: 769-776, 1993.
- Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annual Review of Biochemistry* **57**: 375-413, 1988.

- Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* **56**: S46-49, 2002.
- Schindler R.; Boenisch O.; Fischer C. e Frei U. Effect of the hemodialysis membrane on the inflammatory reaction *in vivo*. *Clinical Nephrology* **53**: 452-459, 2000.
- Schoenfeld P.Y.; Henry R.R.; Laird N.M. e Roxe D.M. Assessment of nutritional status of the National Cooperative Dialysis Study population. *Kidney International*: S80-88, 1983.
- Schömig M.; Eisenhardt A. e Ritz E. The microinflammatory state of uremia. *Blood Purification* **18**: 327-332, 2000.
- Scott J. e Weir D. Folate/vitamin B₁₂ inter-relationships. In: Essays in biochemistry. Tipton K. (ed.) London, Portland Press. **28**: 63-72. 1994
- Sedgwick A.D. e Willoughby D.A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Handbook of inflammation. Bonta I.L.; Bray M.A. e Parnham M.J. (eds.) New York, Elsevier: 27-47. 1985
- Shalaby M.R.; Aggarwal B.B.; Ridernecht E.; Svedersky L.P.; Finkle B.S. e Palladino M.A. Activation of human polymorphonuclear functions by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* **135**: 2069-2073, 1985.
- Shapiro H.M. Practical flow cytometry. New York, Alan R. Liss, Inc. 83p. 1995.
- Shimizu Y.; Van Seventer G.A.; Horgan K.J. e Shaw S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4+ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *The Journal of Immunology* **145**: 59-67, 1990a.
- Shimizu Y.; Van Seventer G.A.; Horgan K.J. e Shaw S. Regulated expression and function of three VLA () integrin receptors on T cells. *Nature* **345**: 250, 1990b.
- Silva M.O.R. Brief history of inflammation. In: Handbook of experimental pharmacology. Vane J.R. e Ferreira S.H. (eds.) New York, Springer-Verlag: 6-25. 1978
- Simchowit L. e Spilberg I. Chemotactic factor-induced generation of superoxide radicals by human neutrophils. Evidence for the role of sodium. *Journal of Immunology* **123**: 2428-2435, 1979.
- Simmons D.L. The role of ICAM expression in immunity and disease. *Cancer Surveys: Cell Adhesion and Cancer* **25**: 141, 1995.
- Smith C.W.; Hollers J.C.; Patrick R.A. e Hassett C. Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *Journal of Clinical Investigation* **63**: 221-229, 1979.
- Springer T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434, 1990.
- Springer T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. *Cell* **76**: 301-314, 1994.

- Springer T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annual Review of Physiology* **57**: 827-872, 1995.
- Steele R.W.; Steele C.R.; Pilkington N.S., Jr. e Charlton R.K. Functional capacity of marginated and bone marrow reserve granulocytes. *Infection Immunity* **55**: 2359-2363, 1987.
- Stenvinkel P. Malnutrition and chronic inflammation as risk factors for cardiovascular disease in chronic renal failure. *Blood Purification* **19**: 143-151, 2001.
- Stenvinkel P.; Lindholm B.; Heimbürger M. e Heimbürger O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **15**: 1624-1630, 2000.
- Stevenson F.T. Inflammation and end-stage renal disease: recent insights. *Seminars in dialysis* **9**: 249-256, 1998.
- St-Pierre Y.; Hugo P.; Legault D.; Tremblay P. e Potworowski E.F. Modulation of integrin-mediated intercellular adhesion during the interaction of thymocytes with stromal cells expressing VLA-4 e LFA-1 ligands. *European Journal of Immunology* **26**: 2050-2055, 1996.
- Suda A.K.; Mathur M.; Deo K. e Deo M.G. Kinetics of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein-calorie deficiency. *Blood* **48**: 865-875, 1976.
- Szeberenyi J.B.; Rothe G.; Pallinger E.; Orso E.; Falus A. e Schmitz G. Multi-color analysis of monocyte and dendritic cell precursor heterogeneity in whole blood. *Immunobiology* **202**: 51-58, 2000.
- Thelen M.; Dewald B. e Baggiolini M. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiological Reviews* **73**: 797-821, 1993.
- Thylen P.; Fernvik E.; Haegerstrand A.; Lundahl J. e Jacobson S.H. Dialysis-induced serum factors inhibit adherence of monocytes and granulocytes to adult human endothelial cells. *American Journal of Kidney Disease* **29**: 78-85, 1997.
- Thylen P.; Fernvik E.; Lundahl J.; Hed J. e Jacobson S.H. Cell surface receptor modulation on monocytes and granulocytes during clinical and experimental hemodialysis. *American Journal of Nephrology* **15**: 392-400, 1995.
- Thylen P.; Fernvik E.; Lundahl J.; Hed J. e Jacobson S.H. Modulation of CD11b/Cd18 on monocytes and granulocytes following hemodialysis membrane interaction *in vitro*. *The International Journal of Artificial Organs* **19**: 155-163, 1996.
- Tielemans C.; Delville J.P.; Husson C.P.; Madhoun P.; Lambrechts A.M. e Goldman M. Adhesion molecules and leukocyte common antigen on monocytes and granulocytes during hemodialysis. *Clinical Nephrology* **39**: 158-165, 1993.

- Tielemans C.; Husson C.; Schurmans T.; Gastaldello K.; Madhoun P.; Delville J.P.; Marchant A.; Goldman M. e Vanherweghem J.L. Effects of ultrapure and non-sterile dialysate on the inflammatory response during *in vitro* hemodialysis. *Kidney International* **49**: 236-243, 1996.
- Toft P.; Brix-Christensen V.; Baech J.; Krog J.; Jorgensen H.S.; Tonnesen E.; Petersen T.K. e Dagnaes-Hansen F. Effect of hemodiafiltration and sepsis on chemotaxis of granulocytes and the release of IL-8 and IL-10. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **46**: 138-144, 2002.
- Tsukahara Y.; Lian Z.; Zhang X.; Whitney C.; Kluger Y.; Tuck D.; Yamaga S.; Nakayama Y.; Weissman S.M. e Newburger P.E. Gene expression in human neutrophils during activation and priming by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Cell Biochemistry* **89**: 848-861, 2003.
- Vaux D.L. Apoptosis and toxicology--what relevance? *Toxicology* **181-182**: 3-7, 2002.
- Veiga S.S.; Elias M.; Gremski W.; Porcionatto M.A.; da Silva R.; Nader H.B. e Brentani R.R. Post-translational modifications of alpha5beta1 integrin by glycosaminoglycan chains. The alpha5beta1 integrin is a facultative proteoglycan. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 12529-12535, 1997.
- Waterlow J.C. e Alleyne G.A. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten years. *Advances in Protein Chemistry* **25**: 117-241, 1971.
- WHO. Food and nutrition terminology: Terminology Circular. *World Health Organization*, 1973.
- Wright S.D. e Detmers P.A. Adhesion-promoting receptors on phagocytes. *Journal of Cell Science* (**S9**): 99-120, 1988.
- Zachee P.; Daelemans R.; Pollaris P.; Boogaerts M.A. e Lins R.L. Neutrophil adhesion molecules in chronic hemodialysis patients. *Nephron* **68**: 192-196, 1994.
- Zhang X.; Kluger Y.; Nakayama Y.; Poddar R.; Whitney C.; DeTora A.; Weissman S.M. e Newburger P.E. Gene expression in mature neutrophils: early responses to inflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology*, in press. 2003.
- Zigmond S.H. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *The Journal of Cell Biology* **75**: 606-616, 1977.
- Zimmermann J.; Herrlinger S.; Pruy A.; Metzger T. e Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International* **55**: 648-658, 1999.

