



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia

RAYANA ARIANE PEREIRA MACIEL

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE URÊMICA DE *P*-CRESOL E *P*-CRESILSULFATO NA  
EXPRESSÃO DE MCP-1 VIA NF- $\kappa$ B EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS HUMANAS  
(VSMC)**

CURITIBA

2013

RAYANA ARIANE PEREIRA MACIEL

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE URÊMICA DE *P*-CRESOL E *P*-CRESILSULFATO NA EXPRESSÃO DE MCP-1 VIA NF- $\kappa$ B EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS HUMANAS (VSMC)**

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

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

CURITIBA

2013



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.


## TERMO DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE URÊMICA DE P-CRESOL E P-CRESILSULFATO NA EXPRESSÃO DE MCP-1 VIA NF-KB EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS HUMANAS (VSMC)”**


Por

**Rayana Ariane Pereira Maciel**

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

  
Prof.ª. Dr.ª. Andréa Emilia Marques Stinghen (presidente)

  
Prof.ª. Dr.ª. Aline Borsatto Hauser

  
Prof. Dr. Ricardo Fernandes

Curitiba, 02 de agosto de 2013.

## **NOTA BIOGRÁFICA**

Rayana Ariane Pereira Maciel, Bacharel em Biomedicina pelas Faculdades Integradas do Brasil em 2010. Durante a graduação foi aluna no Programa de Iniciação Científica entre os anos de 2007-2010, atuando na área de Genética, com ênfase no estudo de Fibrose Cística. Atualmente trabalha no Departamento de Qualidade da empresa Kasvi Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios.

## DEDICATÓRIA

A Deus, por me amar incondicionalmente e por ser meu refúgio e fortaleza. A Ele toda honra e glória.

Ao meu marido Diego, amor da minha vida. Por todo o carinho, paciência e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus pais Allan e Rosangela, pelo suporte que sempre me deram para estudar e pelo exemplo de vida que são para mim.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Stinghen, pelos importantes ensinamentos científicos e por confiar a mim a execução desse projeto. Agradeço a oportunidade.

À Lisienny Rempel, minha companheira de fé e amiga desde a época da graduação. Por ter se lembrado de mim no momento em que me indicou como sua possível colega de mestrado e por ter sido uma grande parceira na pesquisa.

À Vanessa Ribeiro, pela amizade e pela prontidão em me ensinar e me ajudar enquanto eu ainda estava aprendendo as técnicas básicas de extração e cultivo celular.

À Bruna Bosquetti, pela sua disposição e iniciativa em nos auxiliar no que fosse preciso. Agradeço a forma cuidadosa com que se dedicou ao projeto.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Wesley Mauricio de Souza, por toda ajuda dispensada na síntese e caracterização do *p*-cresilsulfato.

Ao grupo “*Scientia Renal*” da PUC/PR, por todo suporte com sugestões e assistência na padronização de alguns experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica, especialmente à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana de Moura e Alessandra Becker, por suas constantes colaborações e ajuda nos experimentos. Aos colegas dos Laboratórios de Epigenética, Neurobiologia e Microbiologia, pelos empréstimos de materiais e pelo auxílio no manuseio de equipamentos multiusuários.

À Luciana Marques, secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela sua dedicação nos processos administrativos.

Ao Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, por todos os funcionários que cooperaram conosco na coleta de cordões umbilicais. Agradeço ainda às gestantes que concordaram em ceder este material para a pesquisa.

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

## RESUMO

O *p*-cresol (PC) e seu conjugado *p*-cresilsulfato (PCS) são toxinas urêmicas de baixo peso molecular que quando ligadas a proteínas, sobretudo a albumina, podem desencadear via NF- $\kappa$ B a produção da quimiocina *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Essa quimiocina é responsável pela quimioatração de monócitos para a camada íntima do vaso durante os eventos que precedem a aterosclerose. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar *in vitro* o papel do PC e PCS na expressão de MCP-1, via fator de transcrição NF- $\kappa$ B p65. O PCS foi sintetizado a partir da sulfatação do PC com ácido clorosulfônico e caracterizado por cromatografia de camada delgada (CCD). As concentrações de PC e PCS utilizadas nos experimentos seguiu o preconizado pelo *European Group of Uremic Toxins* (EuTox). Sendo assim, utilizaram-se as concentrações normais, PC1 (0,60 mg/L) e PCS1 (2,87 mg/L), mínimas urêmicas PC2 (20,10 mg/L) e PCS2 (15,60 mg/L) e máximas urêmicas PC3 (40,70 mg/L) e PCS3 (47,20 mg/L). Como modelo experimental foram utilizadas células musculares lisas humanas (VSMC) extraídas através de digestão enzimática de veia de cordão umbilical. A fim de avaliar a viabilidade das células frente às toxinas foi realizado o ensaio de MTT. Para verificar a expressão de MCP-1, as células foram tratadas com PC e PCS em cinética de 0 e 3 horas nas concentrações descritas acima. Para fins de comparação, as VSMC também foram tratadas com 1  $\mu$ g/mL de lipopolissacarídeo (LPS), outra conhecida toxina urêmica de baixo peso molecular. Todos os ensaios foram realizados na presença e ausência de inibidor da via NF- $\kappa$ B p65. Através do ensaio de MTT verificou-se que não houve diferença significativa na viabilidade celular entre o controle e todas as concentrações testadas de PC e PCS. As VSMC expostas a PC2 e PC3 produziram níveis significativos de MCP-1 após 3h de tratamento ( $149,8 \pm 16$  pg/mL,  $p < 0,001$  e  $143,5 \pm 28,7$  pg/mL,  $p < 0,05$  respectivamente) quando comparados ao tempo 0h. PCS3 estimulou de forma mais intensa a produção de MCP-1 do que as VSMC tratadas com PC3 ( $162,7 \pm 7,5$  pg/mL vs  $143,7 \pm 28$  pg/mL,  $p < 0,005$ ) em 3h. Na presença do inibidor de NF- $\kappa$ B p65, houve uma diminuição significativa na produção de MCP-1 após o tratamento por 3h com PC2 ( $149,8 \pm 16$  pg/mL vs  $36,4 \pm 10,5$  pg/mL;  $p < 0,001$ ) e PC3 ( $143,6 \pm 28$  pg/mL vs  $50 \pm 18$  pg/mL;  $p < 0,05$ ). Após tratamento com PCS1 houve diferença significativa nos níveis de MCP-1 na presença de inibidor ( $156,49 \pm 15,9$  pg/mL vs  $102,3 \pm 4,6$  pg/mL;  $p < 0,05$ ). Após 3h de tratamento com LPS, não houve produção significativa de MCP-1 em relação ao controle ( $35,5 \pm 8,9$  pg/mL vs  $34 \pm 8,9$  pg/mL). Ainda, na presença do inibidor, verificou-se uma leve diminuição nos níveis de MCP-1, porém não significativa ( $35,5 \pm 8,9$  pg/mL vs  $25,6 \pm 6,5$  pg/mL). Com base em nossos resultados, concluímos que apesar de PC e PCS não serem citotóxicas, induzem a expressão de níveis significativos de MCP-1, sendo o PCS mais efetivo na indução da expressão de MCP-1 que seu precursor PC. Assim como PC e PCS, LPS também ativa a produção de MCP-1 via NF- $\kappa$ B. Desta forma sugerimos que a inibição da via NF- $\kappa$ B p65 poderia diminuir níveis de MCP-1 e consequentemente a progressão do desenvolvimento da aterosclerose na DRC.

**Palavras chave:** doença renal crônica, toxicidade urêmica, *p*-cresol, *p*-cresilsulfato, LPS, MCP-1 e NF- $\kappa$ B.

## ABSTRACT

*p*-cresol (PC) and its conjugate *p*-cresyl sulfate are low molecular weight uremic toxins that when attached to proteins, especially albumin, can trigger via NF- $\kappa$ B the production of chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). This chemokine is responsible for monocytes chemoattraction to the vessel intimal layer during the events that precede atherosclerosis. Thus, the aim of this study was to investigate the in vitro role of PC and PCS in MCP-1 expression via transcription factor NF- $\kappa$ B p65. PCS was synthesized from PC sulfation with chlorosulphonic acid and characterized by thin layer chromatography (TLC). The PCS and PC concentrations were used according to the recommendations of the European Uremic Toxins Work Group (EuTox). So we used normal, PC1 (0.60 mg/L) and PCS1 (2.87 mg/L), uremic minimum PC2 (20.10 mg/L) and PCS2 (15.60 mg/L) and maximum uremic concentrations PC3 (40.70 mg/L) and PCS3 (47.20 mg/L). As experimental model we used human smooth muscle cells (VSMC) extracted by enzymatic digestion of umbilical cord vein. In order to assess the cells viability after toxins treatment, MTT assay was performed. To verify MCP-1 expression, cells were treated with PC or PCS in a kinetics of 0 and 3 h using the concentrations described above. For comparison purposes, the VSMC were also treated with lipopolysaccharide (LPS) (1  $\mu$ g/mL), other low molecular weight uremic toxin. All assays were performed in the presence and absence of NF- $\kappa$ B p65 inhibitor pathway. MTT assay showed that there was no significant difference in cell viability between control and all concentrations of PC and PCS tested. VSMC exposed to PC2 and PC3 produced significant levels of MCP-1 after 3h treatment ( $149.8 \pm 16$  pg/mL,  $p < 0.001$ , and  $143.5 \pm 28.7$  pg/mL,  $p < 0.05$  respectively) when compared to time 0h. PCS3 stimulated more intensively MCP-1 production in VSMC treated with the PC3 ( $162.7 \pm 7.5$  pg/mL vs  $143.7 \pm 28$  pg/mL,  $p < 0.005$ ) after 3h. In the presence of NF- $\kappa$ B p65 inhibitor, there was a significant decrease in MCP-1 production after 3h treatment with PC2 ( $149.8 \pm 16$  pg/mL vs  $36.4 \pm 10.5$  pg/mL,  $p < 0.001$ ) and PC3 ( $143.6 \pm 28$  pg/mL vs  $50 \pm 18$  pg/mL,  $p < 0.05$ ). After PCS1 treatment there was a significant difference in MCP-1 levels in the presence of inhibitor ( $156.49 \pm 15.9$  pg/mL vs  $102.3 \pm 4.6$  pg/mL,  $p < 0.05$ ). Finally after 3h treatment with LPS, there was no significant production of MCP-1 compared to control ( $35.5 \pm 8.9$  pg/mL vs  $34 \pm 8.9$  pg/mL), and, in the presence of the inhibitor, there was a slightly decrease in MCP-1 levels, but not significantly ( $35.5 \pm 8.9$  pg/mL vs.  $25.6 \pm 6.5$  pg/mL). Based on our findings, we concluded that in spite of PCS and PC are not cytotoxic, they induce significantly MCP-1 expression and PCS is more effective than its precursor PC. As PC and PCS, LPS also activates MCP-1 production via NF- $\kappa$ B. Therefore, we suggest that the inhibition of NF- $\kappa$ B could decrease MCP-1 levels and hence the development of atherosclerosis progression of CKD.

**Keywords:** chronic kidney disease, uremic toxicity, *p*-cresol, *p*-cresyl sulfate, LPS, MCP-1 and NF- $\kappa$ B.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTADIAMENTO DA DRC.....	13
FIGURA 2. ORIGEM DO <i>P</i> -CRESOL E SEUS CONJUGADOS. ....	19
FIGURA 3. ATIVAÇÃO DE LPS.....	22
FIGURA 4. PROCESSO ATEROGÊNICO .....	24
FIGURA 5. ATIVAÇÃO DA VIA NF- $\kappa$ B.....	28
FIGURA 6. MODELO DE MORFOGÊNESE VASCULAR.....	30
FIGURA 7. SISTEMA DE EXTRAÇÃO DE CÉLULAS DA VEIA DO CORDÃO UMBILICAL POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA.....	34
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO TRATAMENTO DAS VSMC .....	36
FIGURA 9. MICROFOTOGRAFIA DE CÉLULAS EXTRAÍDAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO .....	39
FIGURA 10. MICROFOTOGRAFIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI $\alpha$ -ACTINA .....	40
FIGURA 11. ALGUMAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO DE PRINCIPAIS TIPOS CELULARES VASCULARES.....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MTT EM 24 HORAS .....	43
GRÁFICO 2. EXPRESSÃO DE MCP-1 POR VSMC TRATADAS COM PC.....	45
GRÁFICO 3. EXPRESSÃO DE MCP-1 EM VSMC TRATADAS COM PCS.....	46
GRÁFICO 4. EXPRESSÃO DE MCP-1 POR VSMC TRATADAS COM PC E INIBIDOR DA VIA NF- $\kappa$ B EM 3 HORAS .....	47
GRÁFICO 5. EXPRESSÃO DE MCP-1 EM VSMC TRATADAS COM PCS E INIBIDOR DA VIA NF- $\kappa$ B EM 3 HORAS .....	49
GRÁFICO 6. EXPRESSÃO DE MCP-1 EM VSMC TRATADAS COM LPS E INIBIDOR DA VIA NF- $\kappa$ B EM 3 HORAS .....	51

## LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS

- BSA - *Bovin seric albumin*
- CCD - Cromatografia de Camada Delgada
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride salt*
- DCV - Doença Cardiovascular
- DRC - Doença Renal Crônica
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
- KRP - *Krebs-Ringer-Fosfato*
- LDL - *Low-density lipoprotein*
- LPS - Lipopolissacarídeo
- MCP-1 - *Monocyte Chemotactic Protein-1*
- MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)-2,5-diphenyl-2 12 tetrazolium bromide*
- NKF - *National Kidney Foundation*
- NF-κB - *Nuclear Factor Kappa B*
- OAT - *Organic anion transporter*
- PBS - Solução salina tamponada com fosfato
- PC - *p-cresol*
- PCG - *p-cresilgluconidato*
- PCS - *p-cresilsulfato*
- PFA - Paraformaldeído
- PKC-β - Proteína quinase C (isoforma beta)
- SFB - Soro Fetal Bovino
- TLR - *Toll-like Receptor*
- VSMC - *Vascular Smooth Muscle Cell*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	13
1.2 TOXINAS URÊMICAS.....	15
1.2.1 <i>p</i> -cresol e <i>p</i> -cresilsulfato.....	16
1.2.2 Lipopolissacarídeo .....	20
1.3 MCP-1.....	23
1.4 NF-κB .....	26
1.5 VSMC .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 OBJETIVO GERAL .....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 EXTRAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO CELULAR.....	34
4.3 PREPARO DAS TOXINAS.....	35
4.4 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR .....	36
4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1 .....	37
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
5.1 EXTRAÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR .....	38
5.2 SÍNTESE DE PCS.....	42
5.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	42
5.4 EXPRESSÃO <i>IN VITRO</i> DE MCP-1.....	44
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	52
<b>7 ENSAIOS ADICIONAIS</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
<b>APÊNDICES</b> .....	63
<b>ANEXOS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como presença de lesão renal por um período igual ou superior a 3 meses, com anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). Quando a TFG atinge valores inferiores a 15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> estabelece-se o que se denomina falência funcional renal, ou seja, o estágio mais avançado de perda funcional progressiva observado na DRC (*National Kidney Foundation - NKF, 2002*) (FIGURA 1).

Estágio	Descrição	Filtração Glomerular (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )
I	Lesão renal com taxa de filtração glomerular normal ou aumentado	≥90
II	Lesão renal com leve diminuição da taxa de filtração glomerular	60-89
III	Lesão renal com moderada diminuição da taxa de filtração glomerular	30-59
IV	Lesão renal com acentuada diminuição da taxa de filtração glomerular	15-29
V	Falência renal funcional ou em terapia substitutiva	<15

**FIGURA 1. Estadiamento da DRC.** Estágio de I a V de acordo com a TFG. FONTE: NKF, 2002.

A DRC é uma doença em crescimento exponencial e juntamente com outras doenças crônicas não transmissíveis são responsáveis por 25 milhões de mortes ao ano (EL NAHAS, 2010), tendo como principal causa as doenças cardiovasculares (DCV), as quais são responsáveis por 40-50% de todas as mortes. Em pacientes que precisam utilizar o tratamento dialítico, a morte por DCV é cinco vezes maior que na população em geral, mesmo após estratificação para idade, sexo, etnia e diabetes (MEIJERS, 2010). Atualmente no Brasil, estima-se que existam mais de 2 milhões de brasileiros portadores de algum grau de disfunção renal, sendo que aproximadamente 90 mil se encontram em diálise (SESSO, 2011). Com a progressão da doença, os rins perdem a capacidade de remover efetivamente compostos tóxicos da corrente

circulatória para conseqüente formação da urina, resultando em seu acúmulo no organismo. O acúmulo destas “toxinas urêmicas” é responsável por muitas das conseqüências clínicas de uma condição conhecida como uremia (GLASSOCK, 2008; HIMMELFARB, 2009).

Entre os principais efeitos biológicos tóxicos da uremia na DRC estão: anemia, disfunção imune, osteodistrofia renal, hiperparatireoidismo, resistência insulínica, malnutrição, inflamação, desordens de coagulação, atrofia dérmica, polineurite, falência cardíaca, anorexia, pericardite, hipertensão e DCV (VANHOLDER, 2008), sendo esse último um dos principais responsáveis pela grande morbi-mortalidade neste grupo de pacientes, mesmo em estágios precoces da DRC. Muitos destes efeitos, tais como inflamação e anemia, têm um impacto significativo sobre o *status* cardiovascular (VANHOLDER, 2008). A taxa de mortalidade por DCV em pacientes com idade entre 25 e 34 anos em terapia renal substitutiva é cerca de 500 vezes maior do que na população geral, ou seja, um jovem em diálise apresenta a mesma taxa de mortalidade que um indivíduo com idade acima de 75 anos sem DRC (SARNAK, LEVEY, 2000). Acredita-se que o acúmulo de toxinas urêmicas devido à perda ou diminuição da função renal pode levar a uma resposta inflamatória endotelial (VANHOLDER, DE SMET *et al.*, 2003; COHEN, GLORIEUX *et al.*, 2007). A disfunção endotelial é um evento comumente descrito na falência renal, tanto crônica como aguda, assim como em estágio final de todas as doenças renais. Trata-se de um evento chave inicial no desenvolvimento da aterosclerose e está presente em muitas doenças associadas com um aumento do risco cardiovascular, tais como hipertensão diabetes, tabagismo e dislipidemia (SERRADELL, 2002). De fato, a exposição do endotélio a estas toxinas leva a modificações no fenótipo celular fazendo com que as células respondam com produção de moléculas pró-inflamatórias.

Contudo, a evolução da DRC depende da qualidade do seu tratamento nos estágios menos avançados da doença. O diagnóstico precoce da doença, o encaminhamento imediato para acompanhamento nefrológico e a implementação de medidas que retardam a progressão do dano renal, aliadas ao diagnóstico e tratamento das suas complicações e comorbidades, são estratégias fundamentais para a maior sobrevivência do paciente (SEGAL, BAYLIS *et al.*, 2006; DIAZ-BUXO E WOODS, 2006).

## 1.2 TOXINAS URÊMICAS

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

- 1) Ser quimicamente identificada e caracterizada;
- 2) Ser possível sua quantificação nos fluidos corporais;
- 3) Ter seu nível aumentado na uremia;
- 4) Ter uma relação entre o nível da toxina nos fluidos corporais e um ou mais dos sintomas da uremia;
- 5) Estar reduzida em níveis corporais quando houver melhora no quadro urêmico do paciente;
- 6) Reproduzir a manifestação urêmica mediante a administração da toxina *in vitro* ou *in vivo* em modelo animal ou humano, em níveis semelhantes àqueles encontrados na uremia (MASSRY, 1977).

Atualmente já foram identificados mais de 100 compostos urêmicos, que são classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas e características de remoção por diálise em:

- Compostos pequenos solúveis em água com no máximo 500 Da, que têm como protótipos moléculas como ureia e creatinina e que são facilmente removidos por diálise. Os compostos neste grupo não têm necessariamente uma toxicidade funcional;
- Compostos de peso molecular moderado com mais de 500 Da. Os protótipos deste grupo são  $\beta$ 2-microglobulina e leptina. Estas moléculas só podem ser removidas por membranas de porosidade grande o suficiente para permitir sua passagem através da membrana. Muitos dos compostos deste grupo são peptídeos que afetam um grande número de órgãos e sistemas;

- Compostos ligados a proteínas, em geral com baixo peso molecular. Os protótipos deste grupo são os fenóis, como *p*-cresol e os indóis, como o indoxil sulfato. São compostos de difícil remoção por diálise e com diversas atividades tóxicas no organismo pela sua alta afinidade com proteínas, sobretudo a albumina (VANHOLDER, 2001; VANHOLDER, 2003; VANHOLDER, 2008). O grande grupo de toxinas ligadas a proteínas possuem entre elas diferenças quanto à força de ligação às proteínas, o sítio de ligação das proteínas, o padrão de retenção, a natureza da proteína e sua remoção durante a diálise, o que resulta em diferentes padrões patofisiológicos (VANHOLDER, 2011).

A eficiência do procedimento dialítico pode ser avaliada através da capacidade em remover compostos de baixo peso molecular solúveis em água. Entretanto, a uremia não é causada apenas por essas moléculas, mas também pelas que se ligam às proteínas, as quais ficam retidas no organismo (LESSAFER, 2000). Se a taxa de filtração glomerular for  $<15$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, a terapia de substituição renal utilizando diálise pode ser necessária (WESOLY *et al.*, 2010). A remoção ideal de cada tipo de molécula pode ser alcançada com terapias substitutivas da função renal, tais como a diálise peritoneal ou hemodiálise, utilizando-se membranas de grandes poros, dialisadores ou dispositivos de alta adsorção e grande capacidade de remoção de algumas ou várias toxinas urêmicas.

### 1.2.1 *p*-cresol e *p*-cresilsulfato

O *p*-cresol (PC) (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O) também denominado 4-metilfenol (PM 108 Da) é um composto fenólico, lipofílico e volátil, classificado como toxina urêmica de baixo peso molecular, com alta afinidade à proteínas. Seu acúmulo no organismo resulta em vários efeitos tóxicos *in vitro* e correlações clínicas *in vivo*, uma vez que é um importante contribuinte para o desenvolvimento da aterosclerose e suas complicações (BAMMENS, 2003). Um rim normal pode eliminar solutos por secreção tubular, mas as proteínas ligantes prejudicam o *clearance* de PC durante a hemodiálise, que em pacientes em estágio final de DRC muitas vezes excedem os níveis de ureia (MARTINEZ *et al.*, 2005). Em terapias dialíticas são eliminados 70% de ureia e



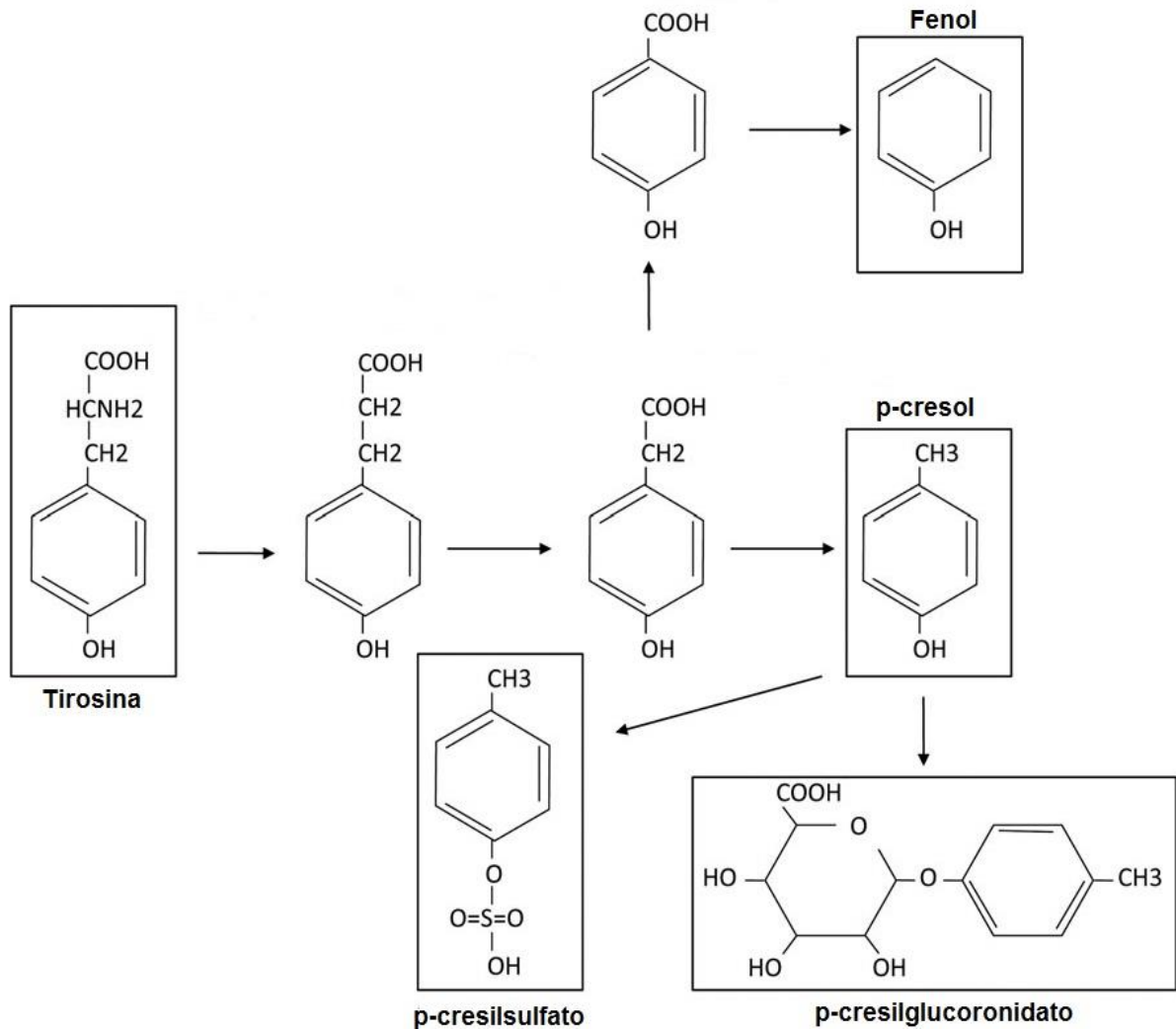
creatinina e apenas 30% de PC após 4 horas de sessão (VANHOLDER, 1999; LESAFFER, 2000). O *clearance* peritoneal é eficaz para ureia, creatinina e fosfato, mas não é eficiente para  $\beta$ 2-microglobulina e menos eficiente ainda para toxinas de baixo peso molecular, tais como PC, pela dificuldade de filtração desse composto por meio da terapia dialítica (BAMMENS, 2003). Esse acúmulo progressivo de PC tem sido associado com o aumento de lesões vasculares, ativação de leucócitos e mortalidade (VANHOLDER, *et al.*, 1999). O PC está envolvido com a imunodeficiência por causar imunodepressão da capacidade funcional dos fagócitos e inibir a liberação pelos macrófagos de vários tipos de fator ativador plaquetário (PAF) (VANHOLDER, 1999). Outra característica relevante do PC é a sua capacidade de suprimir a produção de produtos reativos de leucócitos, tais como radicais livres, os quais têm um papel fundamental por eliminar agentes infecciosos. Por isso, a retenção do PC tem sido considerada como um dos elementos que favorecem a susceptibilidade dos pacientes urêmicos à infecção (DE SMET, 2003). Em indivíduos saudáveis, a concentração plasmática de PC em níveis normais é baixa, cerca de 0,60 mg/L, mas aumenta significativamente para 20,10 mg/L no início da uremia e valores superiores a 40,70 mg/L no estágio final da DRC (SCHEPERS, 2007).

O PC é uma molécula originada do metabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, por fermentação da microbiota bacteriana no intestino grosso (LIABEUF, 2011). As principais bactérias contribuintes para sua formação são as aeróbias, tais como as enterobactérias. Entretanto, algumas anaeróbias, como *Clostridium perfringens*, também possuem uma importante participação no metabolismo desta toxina (HIDA, 1996). Sendo assim, um crescimento abundante da microbiota bacteriana resulta em aumento na concentração de PC no organismo (VANHOLDER, 1995). Por isso, a administração de antimicrobianos reduz a excreção urinária de PC, como resultado da ação do antimicrobiano nas bactérias produtoras da toxina. Estudos demonstraram que a absorção intestinal de PC pode ser reduzida através da influência dos hábitos alimentares ou por administração de quelantes orais, tais como AST-120 e Sevelamer, que são conhecidos pela capacidade de capturar e eliminar as toxinas urêmicas e seus precursores (VANHOLDER, 1999). Algumas fontes ambientais de PC estão presentes no tolueno, mentofurano e fumaça de cigarro. Porém, a preocupação

se justifica em relação ao mentofurano, que está presente em vários medicamentos fitoterápicos usados atualmente, agentes aromatizantes e drogas psicodélicas (VANHOLDER, 1999).

O PC e seus conjugados podem estar presentes no plasma na forma livre ou ligada a proteínas, como albumina e imunoglobulina, por meio de ligações de *Van der Waals* (BERGÉ-LEFRANC, 2010). O PC livre foi encontrado apenas em pacientes com DRC, na concentração máxima de 1 mg/L, mas não foi encontrado em indivíduos saudáveis (VANHOLDER, 1999; DE LOOR *et al.*, 2005). De acordo com a literatura, PC está aumentado em estágios avançados da DRC, porém é a fração livre que está associada com a mortalidade por DCV (LIABEUF *et al.*, 2010; BMMENS, 2006). Alguns estudos relatam que as concentrações de PC livre são mais elevadas em pacientes com hipoalbuminemia do que em normoalbuminemia, sendo que clinicamente PC livre é relatado em pacientes com infecções hospitalares (DE SMET *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos pioneiros com compostos fenólicos iniciou-se somente com o PC. Todavia, descobriu-se que este composto encontra-se em concentrações muito pequenas no organismo, sendo logo metabolizado para seus conjugados pela microbiota intestinal. Durante sua passagem pelas mucosas do cólon e fígado, PC passa por processos de conjugação (sulfatação e glucoronidação) formando dois compostos: o *p*-cresilsulfato (PCS) e o *p*-cresilglucoronidato (PCG) (LIABEUF *et al.*, 2011) (VANHOLDER, 2001) (FIGURA 2). O composto resultante da sulfatação (PCS) é considerado a toxina efetiva, tanto pelo seu nível significativamente aumentado, quanto pelo seu expressivo impacto bioquímico, uma vez que essa molécula afeta a resposta inflamatória, interferindo na ativação de leucócitos polimorfonucleares e resposta endotelial a citocinas (VANHOLDER, 2008) (DOU, 2002). O *p*-cresilsulfato é originado pela adição do ânion sulfato na hidroxila do *p*-cresol.



**FIGURA 2. Origem do *p*-cresol e seus conjugados.** O aminoácido tirosina origina o *p*-cresol, que por sua vez passa por processos de conjugação, formando o *p*-cresilsulfato e o *p*-cresilglucuronidato. FONTE: VANHOLDER, 2011.

Segundo SCHEPERS *et al.* (2007), observa-se um efeito pró-inflamatório do PCS, avaliado pelo aumento da formação de radicais livres produzidos por leucócitos, contribuindo para o dano vascular nos pacientes com DRC. MEIJERS *et al.* (2009), recentemente demonstraram que o PCS induz o desprendimento de micropartículas endoteliais, mesmo na ausência de dano endotelial, sugerindo que esta toxina pode estar envolvida na disfunção endotelial observadas nestes pacientes. Ainda, foi verificado que a atividade do *burst* respiratório de fagócitos é inibida por PC, mas não é inibida por PCS (VANHOLDER *et al.*, 1995). WANG *et al.* (2010) indicaram que PCS está significativamente correlacionado com a patogenese da aterosclerose em

pacientes em estágio avançado da doença renal. Portanto, a investigação da toxicidade urêmica somente com o PC têm se tornado obsoleta, já que seus conjugados são os produtos finais do metabolismo de fenóis (DE LOOR, 2005).

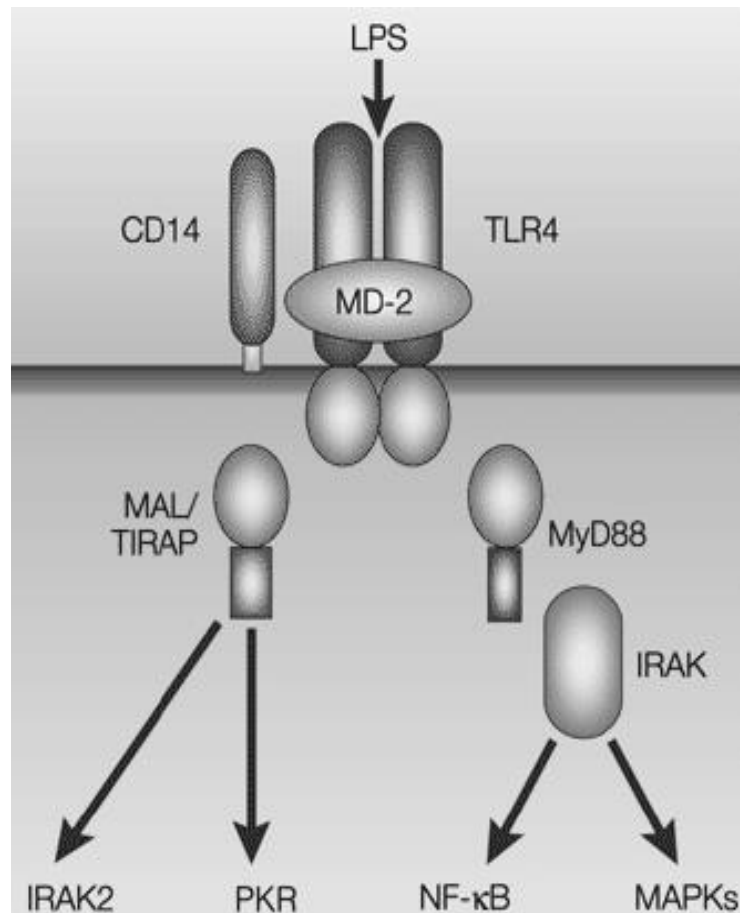
Muitos estudos investigam o mecanismo de ação do PC e seus conjugados. Sugere-se que PC, por ser um composto fenólico pequeno com propriedades lipofílicas, facilmente penetre a membrana celular e desorganize a sua função e conseqüentemente das células como um todo (JIN-ZHOU ZHU *et al.*, 2012). Todavia, alguns trabalhos recentes sugerem que a toxicidade do PC e PCS se deve à presença de um *transporter*, encontrado na membrana basolateral renal tubular, o *organic anion transporter* (OAT), que facilita a excreção de compostos exógenos e endógenos eliminados pelos rins. A família dos OATs contempla seis isoformas: OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, URAT1 e OAT5, sendo que OAT1 interage com 100 compostos e os seus substratos incluem substâncias exógenas, como drogas e compostos ambientais e endógenas, tais como dicarboxilatos, prostaglandinas, uratos e a toxina aniônica PCS. A maioria das toxinas de baixo peso molecular são filtrados pelos glomérulos e eliminados pela urina, porém as que são ligadas a proteínas são filtradas pelos túbulos renais e excretadas pelos OATs. Desta forma é provável que PCS se acumule em diversos órgãos, incluindo os rins, ossos e vasos sanguíneos (ENOMOTO *et al.*, 2007; MIYAMOTO *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Lipopolissacarídeo

O Lipopolissacarídeo (LPS) é constituído por glicerofosfolipídios e lipídio A, conhecida como endotoxinas, as quais são responsáveis pelos principais efeitos tóxicos da molécula. Embora os termos endotoxina e LPS sejam usados como sinônimos, o primeiro visa enfatizar a atividade biológica e o segundo é utilizado para se referir a sua estrutura química e composição da molécula. O envelope celular das bactérias gram negativas é constituído por duas membranas, uma interna composta por uma camada dupla de fosfolipídios e uma externa, formada por fosfolipídios e lipopolissacarídeos (LPS). Altos níveis circulantes de endotoxinas podem ser derivados de várias fontes, como de focos de infecção e de contaminação de tecidos ou corpos estranhos e até

mesmo pela microbiota intestinal humana, que contém de 500 a 1.000 espécies bacterianas e liberam continuamente LPS em pequenas quantidades durante a proliferação e morte celular. Por possuírem uma alta estabilidade térmica, tornam-se resistentes sob condições habituais de esterilização (GORBET, 2005). Os LPS presentes na corrente sanguínea ligam-se rapidamente a proteínas séricas, chamadas de LBP (proteínas ligantes de LPS). A LBP é uma proteína plasmática que se liga com alta afinidade ao lipídeo A dos LPS. É produzida no fígado e intensifica a resposta inflamatória dos LPS (TOBIAS, 1992).

No processo da resposta crônica a estímulos da DRC, os receptores *Toll-like* (TLR) são um dos principais envolvidos na imunidade inata ao reconhecimento de componentes microbianos, como o LPS das endotoxinas. TLRs são proteínas transmembranosas expressas por células do sistema imune inato que reconhecem os microrganismos e ativam vias de sinalização as quais iniciam respostas imunes e inflamatórias com a finalidade de destruir os invasores. Atualmente em humanos foram identificados 11 tipos de receptores do tipo *Toll-like* (TLR1-TLR11), sendo que o TLR4 é o responsável por reconhecer moléculas de LPS, ativando a produção de quimiocinas e apoptose. Contudo, somente o TLR4 não é suficiente para conferir resposta imune. O receptor requer MD-2, uma molécula secretada para interagir funcionalmente com LPS na membrana da célula. Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via NF- $\kappa$ B, que ao se translocar ao núcleo, promove a transcrição de diversos genes de citocinas inflamatórias que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (RAETZ & WHITFIELD, 2002). Esse sinal é mediado através da proteína adaptadora MyD88 (FIGURA 3).

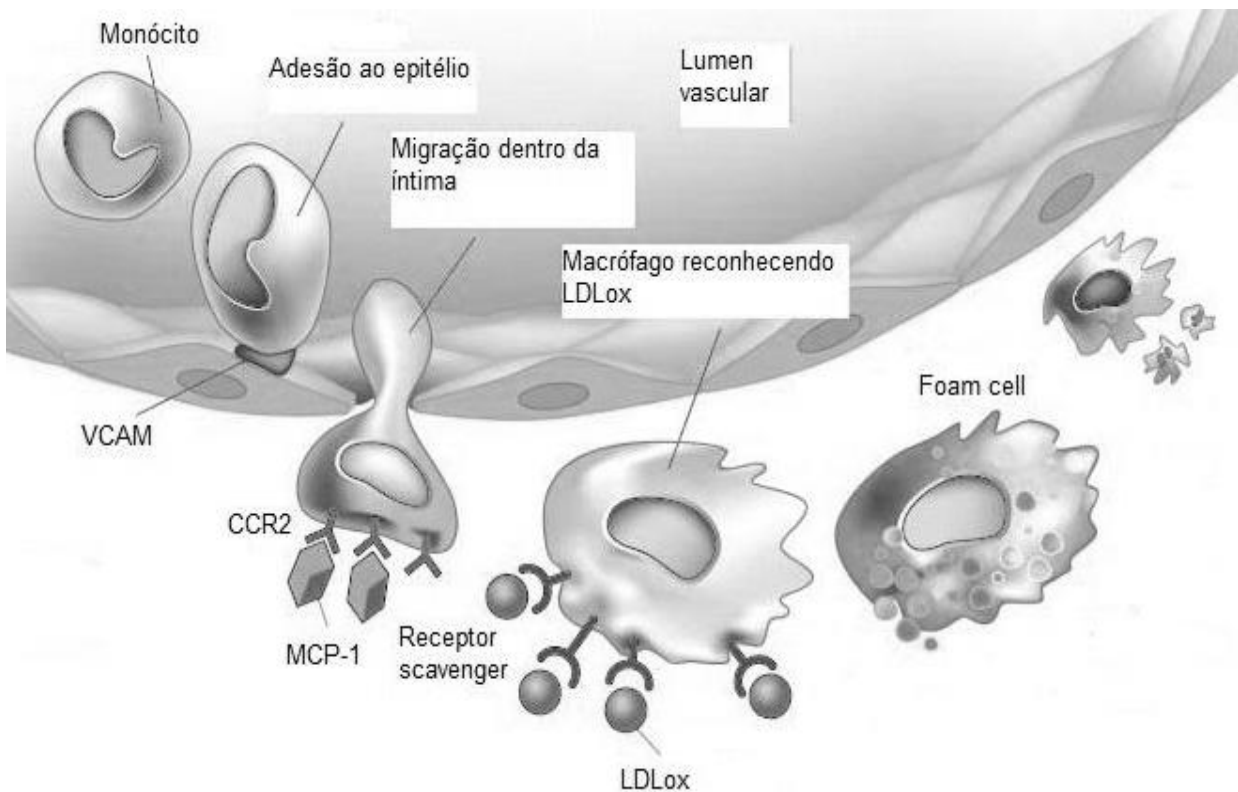


**FIGURA 3. Ativação de LPS.** LPS é reconhecido por receptores TLR4 e ativa a via NF-κB. FONTE: NATURE, 2006.

Estudos desenvolvidos por YANG *et al.* (2005) verificaram que a presença de LPS de bactérias ativou o receptor TLR4 expresso em VSMC e conseqüentemente promoveu a inflamação na parede do vaso durante a aterogênese. Outros estudos demonstraram que pacientes com DRC possuem altos níveis de endotoxinas na circulação sanguínea, o que favorece o surgimento de inflamação crônica sistêmica. Este processo está potencialmente relacionado com a permeabilidade da barreira intestinal alterada, que permite a translocação de endotoxinas para a circulação, do uso de antibióticos sistêmicos, os quais libertam quantidades de LPS durante a bacteriólise e também da utilização de água não-ultrapura para a preparação do dialisado na terapia dialítica (HOLZHEIMER, 1998; HAUSER *et al.*, 2010).

### 1.3 MCP-1

Estudos de THOMPSON (1981) afirmavam que a inflamação sistêmica ocorria somente pelo acúmulo de colesterol LDL no compartimento plasmático em virtude de uma dieta desbalanceada rica em gorduras, da síntese endógena de colesterol ou mesmo da diminuição do catabolismo do LDL pelo fígado, causada por um defeito gênico que promove deficiência na expressão ou na função dos seus receptores, resultando na hipercolesterolemia. Porém, atualmente se sabe que outros fatores importantes contribuem para o surgimento de inflamação sistêmica, como a uremia, que em pacientes renais crônicos favorece significativamente o desenvolvimento da placa aterosclerótica. A aterosclerose é uma doença crônica causada pelo acúmulo de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue, as quais ultrapassam a barreira endotelial. A presença de LDL na circulação ativa os monócitos que saem da corrente sanguínea, diferenciando-os em macrófagos, os quais englobam partículas estranhas. Vários receptores, denominados *scavengers* estão envolvidos na fagocitose da LDL oxidada pelos macrófagos e na conseqüente formação das células espumosas (*foam cells*), as quais constituem a placa aterosclerótica (LUSIS, 2000, LIBBY, 2002; DORAN, 2008) (FIGURA 4).



**FIGURA 4. Processo aterogênico.** Recrutamento de monócitos para a camada íntima do vaso se dá através da quimiocina MCP-1, que se liga aos seus receptores CCR2. Os receptores scavengers estão envolvidos na fagocitose de LDLox e na formação de *foam cells*. FONTE: LIBBY, 2002.

O processo aterosclerótico envolve inúmeras células inflamatórias, que se tornam ativadas e liberam uma variedade de citocinas e quimiocinas, o que amplifica ainda mais o processo e induz o recrutamento de células vasculares de músculo liso (VSMC), acentuando o desenvolvimento da lesão na parede do vaso por estimular a produção excessiva de proteínas de matriz extracelular (WANG *et al.*, 2009). As citocinas mais importantes produzidas pelas VSMC são os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento (TGF- $\beta$ ), fator inibidor de macrófago (MIF), interferon gama (IFN) e *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) (DORAN, 2008).

O *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1 ou CCL2) é uma quimiocina de baixo peso molecular, com 8-10 kD, pertencente à família das C-C citocinas, responsável pela quimiotaxia dos monócitos para áreas de injúria na camada íntima do vaso durante os primeiros estágios do processo aterogênico (BORING *et al.*, 1998; BOISVERT *et al.*, 1998; GERSZTEN *et al.*, 1999; SELZMAN *et al.*, 2002). MCP-1 é



produzida por vários tipos de células, incluindo células endoteliais, fibroblastos, células microgliais, astrócitos, monócitos e VSMC (VIEDT *et al.*, 2002). Esta quimiocina está envolvida no processo inflamatório, sendo conhecida por sua habilidade em recrutar células mononucleares, desempenhar um papel importante na migração, ativar monócitos e células T e ainda regular a proliferação de VSMC (IKEDA, OKADA *et al.*, 1995, SCHECTER *et al.*, 1997). Ou seja, além de agir como sinalizador apresenta também um grande potencial mitogênico para VSMC (SELZMAN *et al.*, 2002). Essas células respondem a esses estímulos mitógenos com a proliferação, migração dentro da camada íntima e com a secreção de produtos da matriz, como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanos (LIBBY, 2000; RENSEN *et al.*, 2007; DORAN *et al.*, 2008).

A regulação do mecanismo de ativação de MCP-1 se dá por meio de um receptor, o CCR2, que ao contrário de MCP-1 tem sua expressão relativamente restrita a certos tipos de células. O CCR2 medeia a migração de neutrófilos, linfócitos, células dendríticas e monócitos/macrófagos. Várias CC quimiocinas ligam-se a CCR2 e estimulam a migração de células, tais como MCP-1/CCL2, CCL7 e CCL13. A localização do receptor durante a migração é variável dependendo do tipo de célula. Nos monócitos os receptores aparecem uniformemente distribuídos sobre sua superfície para permitir a resposta rápida em qualquer direção (VOLPE *et al.*, 2012). HAYES *et al.* (1998) sugeriram que o receptor CCR1 e também o CCR2 são expressos de forma constitutiva em VSMC. SPINETTI *et al.* (2004) demonstraram que MCP-1 ligado ao seu receptor CCR2 aumentou a proliferação e migração de VSMC dentro da íntima da aorta, progredimento para DCV.

Do ponto de vista clínico, pacientes pós-infarto agudo do miocárdio e angina instável apresentam níveis plasmáticos elevados de MCP-1, estando associados a estados inflamatórios, dislipidemias, eventos cardiovasculares e proliferação de VSMC em pacientes submetidos à hemodiálise (IKEDA *et al.*, 2002; PAPAYIANNI *et al.*, 2002; GUNTHER *et al.*, 2009). Sabe-se que respostas inflamatórias mediadas por citocinas são relevantes em todos os estágios da aterosclerose (VIEDT & ORTH, 2002), sendo comprovado que níveis aumentados de MCP-1 têm sido detectados em artérias com aterosclerose e não em artérias normais e também em pacientes com infarto agudo do

miocárdio e inflamação sistêmica (ROLLINS, 1996). Em humanos, níveis séricos de MCP-1 foram encontrados em pacientes com doença arterial coronariana, estimulando os fatores de riscos na progressão de placa aterosclerótica (MARTINOVIC, 2005). Em camundongos deficientes em CCL-2 ou CCR-2 foi demonstrado que na ausência de CCL2 ou de seu receptor, houve redução significativa de deposição de lipídios nas artérias (BORING *et al.*, 1998).

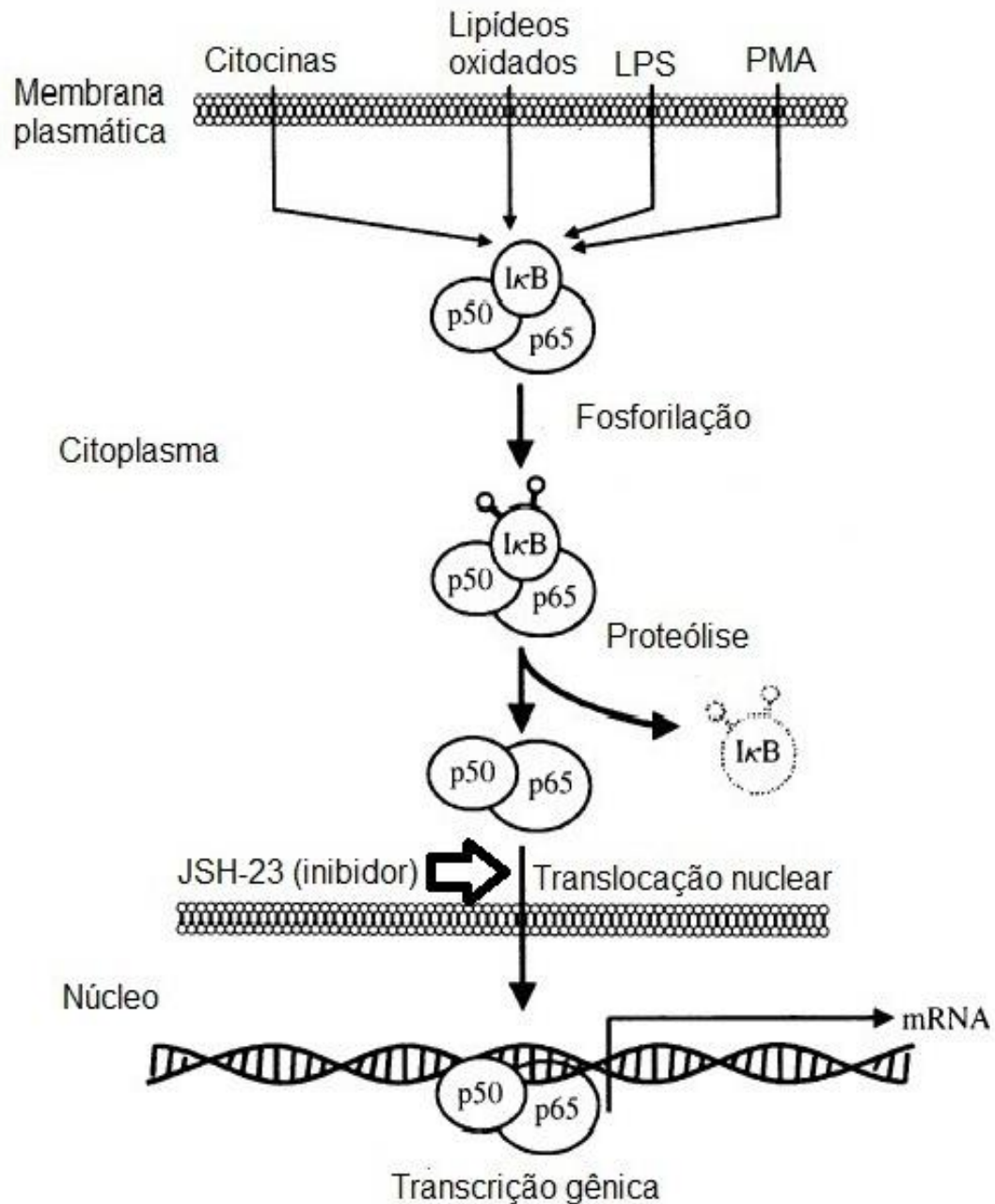
Em estudos desenvolvidos por nosso grupo, verificamos que a agressão constante do endotélio a partir da interação entre toxinas urêmicas e células endoteliais, com alteração do fenótipo celular, pode refletir, ao menos em parte, os níveis plasmáticos elevados de marcadores de inflamação vascular, tais como MCP-1 encontrados em pacientes e participar efetivamente da fisiopatologia da DCV relacionada à DRC (STINGHEN, GONCALVES *et al.*, 2009) (FIGURA 2). Na DRC, vários marcadores de risco cardiovascular têm sido amplamente estudados, tais como: PCR (Proteína C reativa), moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e citocinas como o IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8 e MCP-1 (STENVINKEL *et al.*, 2000; SULIMAN *et al.*, 2006; ADDABBO *et al.*, 2007). Desta forma, a citocina MCP-1 tem grande potencial para ser utilizada como marcador de processos inflamatórios na DRC, uma vez que quanto mais avançada a doença, mais elevado será o nível plasmático deste marcador (OBERG *et al.*, 2004; KUSANO *et al.* 2004).

#### 1.4 NF- $\kappa$ B

O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição envolvido na regulação dos genes da resposta inflamatória, na apoptose, na proliferação celular e no aumento da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) (WINTHER *et al.*, 2005). Trata-se de uma das principais vias de ativação da citocina MCP-1, cuja modulação desencadeia uma cascata de eventos de sinalização envolvendo uma sequencia integrada de proteínas reguladas, as quais têm o controle da expressão gênica (GHOSH, 1998). O NF- $\kappa$ B p50/p65 é um heterodímero (também chamado RelA) e é o principal complexo Rel/NF- $\kappa$ B em muitas células. Além dessas, outras subunidades foram descritas, tais como a c-

Rel, RelB, e p52, sendo que dependendo da combinação entre eles, existem diferentes genes capazes de ativar ou bloquear a transcrição do p50/RelA. As subunidades p50 e p52, sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente, formam homodímeros inibitórios da transcrição, pois se ligam a regiões promotoras sem exercer atividade, bloqueando a interação desses genes com o dímero ativo p50/RelA (GHOSH, 1998).

A atividade de NF- $\kappa$ B é fortemente regulada por interações com proteínas I $\kappa$ B (BAEUERLE, 1996). Em células não estimuladas, o NF- $\kappa$ B é encontrado no citoplasma e ligado a I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$ , inibidores da ativação dessa via, o que impede o dímero p50-p65 de entrarem no núcleo e assim iniciarem a transcrição do gene. Quando as células são estimuladas, quinases específicas fosforilam I $\kappa$ B $\beta$  causando a sua rápida degradação por proteosomas (DIDONATO, 1996). Vários estímulos, como as citocinas, lipídios oxidados, LPS e acetato de forbol miristato (PMA) ativam as células resultando em fosforilação e proteólise de inibição protéica I $\kappa$ B, através da translocação nuclear do dímero ativado constituído de subunidades p50 e p65. No núcleo, o dímero liga-se a sequências de DNA regulatórias e iniciam a transcrição de genes (BRAND, 1997) (FIGURA 5).



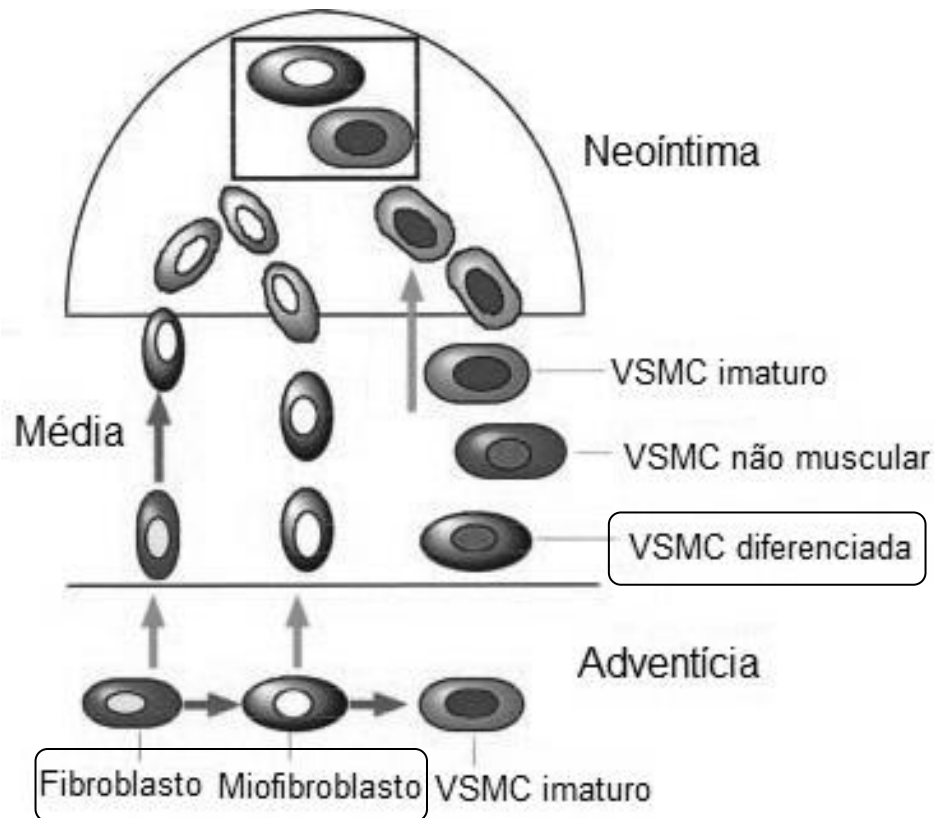
**FIGURA 5. Ativação da via NF-κB.** Vários estímulos, como as citocinas, lipídios oxidados, LPS e PMA ativam as células e com a proteólise de IκB iniciam a transcrição de genes. FONTE: BRAND,1997.

O NF-κB está envolvido principalmente em resposta ao estresse, imunidade e processos inflamatórios, podendo ser ativado pela exposição de células a LPS, fatores de crescimento, linfocinas, radicais livres, partículas inaladas, infecção viral, expressão de certos produtos virais ou bacterianos, radiação UV, células B ou T e citocinas inflamatórias, tais como MCP-1 (BALDWIN, 1996). Existem vários inibidores da via NF-

$\kappa$ B, incluindo o JSH-23, que atua como um bloqueador seletivo de translocação nuclear da porção p65 e da sua atividade de transcrição, sem afetar a degradação de I $\kappa$ B. Além do NF- $\kappa$ B, outros fatores de transcrição como PPARs (*peroxisome-proliferator-activated receptors*) e o LXRs (*liver X receptors*) que regulam a expressão de genes que controlam o metabolismo de lipídios e lipoproteínas e a homeostase da glicose, também atuam na predisposição à aterosclerose e inflamação (GLASS, 2006).

### 1.5 VSMC

A principal característica das VSMC é a contratibilidade, sustentação do tecido e migração, que é normal durante o desenvolvimento do tecido vascular e reparação em resposta a injúria. Entretanto, a migração patogênica é o maior fator em aterosclerose. A distinção entre a migração fisiológica e a patogênica é atribuída à falha na parada da migração quando o tecido já foi reparado (LOUIS, 2010). Além das células endoteliais, as VSMC também têm uma importante participação na formação da placa aterosclerótica, pois desempenham um papel crucial na formação da cápsula fibrosa e estabilidade da placa. Ao contrário do músculo esquelético ou cardíaco, que são terminalmente diferenciadas, as VSMC mantêm uma plasticidade notável e podem sofrer modificações fenotípicas (OWENS, 1995). No processo de morfogênese vascular na formação da neointima, células progenitoras podem ser reprogramadas para terem comportamento estrutural e funcional diferentes da sua origem. Segundo SARTORE *et al.* (2001), postula-se que existem duas grandes vias fenotípicas para a formação da camada neointima: a primeira originada a partir de fibroblastos e VSMC não musculares (miofibroblastos) e a segunda com origem em VSMC diferenciadas. Todos esses tipos celulares convergem para um processo de maturação, gerando células idênticas ou muito semelhantes entre si. Por isso, mediante lesão vascular, a camada média é composta por VSMC imaturas, VSMC não musculares e VSMC diferenciadas (FIGURA 6).



**FIGURA 6. Modelo de morfogênese vascular.** As células vasculares se diferenciam a partir de fibroblastos e miofibroblastos e de VSMC diferenciadas. FONTE: SARTORE *et al.*, 2001.

Embora as células endoteliais sejam o principal tipo celular que interage com os macrófagos, as VSMC também têm essa capacidade, de acordo com a observação por microscopia eletrônica e de imunohistoquímica de material de placa aterosclerótica humana (DORAN, 2008). Além disso, tais como as células endoteliais, as VSMC podem expressar uma variedade de citocinas e moléculas de adesão e contribuir assim para a iniciação e propagação da resposta inflamatória no processo aterogênico atraindo e ativando leucócitos, induzindo proliferação celular, promovendo disfunção endotelial e estimulando produção de componentes da matriz extracelular. As citocinas mais importantes produzidas pelas VSMC são: fator derivado de plaquetas (PDGF), fator de inibição de macrófagos (MIF), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e MCP-1 (DORAN, 2008). Outro fato interessante é que regiões específicas do sistema circulatório são mais susceptíveis ao desenvolvimento de aterosclerose que outras, fato que pode ser explicado pela abundante presença de VSMC na camada íntima (DORAN, MELLER *et al.*, 2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estudos desenvolvidos por nosso grupo vêm demonstrando que com o desenvolvimento da DRC e conseqüente acúmulo de toxinas urêmicas, tais como PC e PCS, ocorra ativação da resposta inflamatória sistêmica (mediada por citocinas pró-inflamatórias) e especialmente vascular (STINGHEN, GONCALVES *et al.*, 2009). Além disso, endotoxinas, também conhecidas como LPS, são potentes ativadores da resposta imune inata, via ativação de TLR, como também demonstramos em trabalhos prévios (STINGHEN *et al.*, 2010; HAUSER *et al.*, 2010). A interação da camada íntima e média do vaso com as toxinas urêmicas pode hipoteticamente, via fator de transcrição NF- $\kappa$ B, refletir ao menos em parte, os níveis plasmáticos elevados de marcadores de inflamação vascular, tais como o MCP-1, encontrados nestes pacientes. Desta forma, esclarecer os mecanismos envolvidos na aceleração da DCV nos pacientes com DRC, através do modelo que estamos propondo, pode contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na toxicidade urêmica, permitindo a descoberta de novos alvos para intervenções terapêuticas levando, por conseguinte, a uma maior sobrevida do paciente.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a expressão *in vitro* de MCP-1 por células musculares lisas humanas (VSMC) via NF- $\kappa$ B após estímulo por PC e PCS.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar VSMC extraídas de veia de cordão umbilical humano;
- Avaliar através de ELISA a expressão da quimiocina MCP-1 em sobrenadante de cultura de VSMC após tratamento com PC, PCS e LPS;
- Avaliar a ativação e subsequente bloqueio da via do NF- $\kappa$ B em cultura de VSMC após tratamento com PC, PCS e LPS;
- Avaliar as diferenças nos níveis de expressão de MCP-1 pelas VSMC quando estimuladas com PC e PCS, com as VSMC estimuladas com LPS.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 EXTRAÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS

As células foram extraídas de veia de cordão umbilical humano cedidos pelo Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral, mediante aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UFPR) (APÊNDICE I), condicionado à autorização das parturientes através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE II). Somente após os procedimentos usuais de parto é que o cordão foi cedido pelo obstetra, sem causar nenhum dano físico ou moral à mãe e ao bebê. Os cordões umbilicais foram coletados sob condições estéreis e colocados em um frasco com solução tampão salino-fosfato (PBS) também estéril, com antibióticos. Os cordões foram então lavados com PBS a fim de retirar qualquer resquício de sangue ou coágulos e após limpos foram deixados em imersão numa solução de PBS com 10 mg/mL penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) por 24 horas a 4°C a fim de eliminar qualquer possível contaminação proveniente do parto. A extração foi feita após digestão da camada íntima e média do vaso com 0,2% de Colagenase Tipo I (Sigma-Aldrich) diluídos em MEM199 com 1,0 g/mL de glicose (Gibco), num sistema fechado, o qual foi mantido por 20 minutos a 37°C (FIGURA 7). A solução de colagenase com a suspensão de células foi retirada do cordão e centrifugada a 700 x g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido lentamente em meio DMEM (Himedia) com 4,5 g/mL de glicose, 110 mg/L de piruvato de sódio, 584 mg/L de glutamina e 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, suplementado com 15% SFB (Gibco), 10 mg/mL penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em frascos de cultivo com área de superfície de 25 cm<sup>2</sup>. O meio foi trocado a cada 2 dias, até as células atingirem 80% de confluência, quando então foram tripsinizadas (MARTIN DE LLANO, 2007).



**FIGURA 7. Sistema de extração de células da veia do cordão umbilical por digestão enzimática.** A colagenase foi incubada dentro da veia do cordão umbilical num sistema fechado. FONTE: O AUTOR (2011).

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

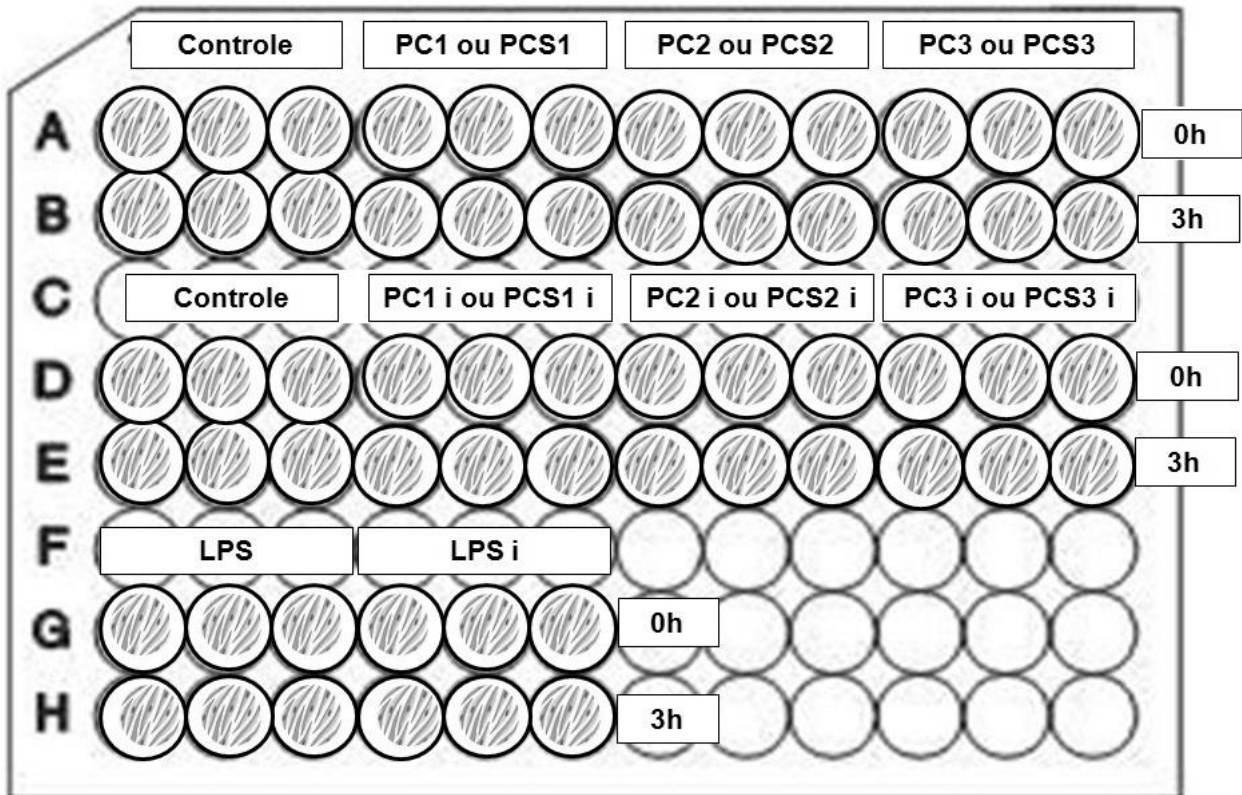
Foram plaqueadas  $10^4$  células/mL em placas de 24 poços, sob lamínulas redondas. As células foram então cultivadas em meio DMEM suplementado com 15% SFB por 24 horas, até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Em seguida foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4%. A reação foi bloqueada com PBS e BSA. Na sequência as células foram tratadas com 10  $\mu$ g/mL de Anticorpo Monoclonal Anti  $\alpha$ - actina (Sigma-Aldrich) e anticorpo secundário marcado com FITC (1:2000) (Sigma-Aldrich). As lamínulas foram observadas sob microscópio fluorescente em aumento de 40X.

### 4.3 PREPARO DAS TOXINAS

O PC (Sigma-Aldrich) foi diluído em metanol 100% a partir de uma solução mãe de 5000 mg/L (FAURE, CERINI *et al.*, 2006). A partir dessa solução foi feita uma solução estoque 100 mg/L, a qual foi diluída com o tampão Krebs-Ringer-Fosfato (KRP) nas concentrações de uso para tratamento, descritas abaixo. A toxina *p*-cresilsulfato foi sintetizada por sulfatação do *p*-cresol conforme amplamente descrito por FEIGENBAUM & NEUBERG (1941), SCHEPERS *et al.* (2006), VANHOLDER *et al.* (2007) e MEIJERS *et al.* (2009), resultando no sal potássio do composto. Basicamente *p*-cresol foi dissolvido em formamida e piridina, tomando cuidado para não hidratar o sistema, através de uma boa vedação. Após completa dissolução, a mistura reacional foi colocada em banho de gelo a 4°C, adicionando-se ácido clorosulfônico gota a gota, evitando a entrada de umidade no sistema. Após a completa adição do ácido clorosulfônico, a agitação e o banho de gelo foram mantidas por mais 12 horas a 4°C. O bloqueio da reação foi realizado através da adição de gelo no meio e a neutralização com solução de bicarbonato de sódio, até a completa liberação de CO<sub>2</sub> formado. PCS foi purificado por recristalização por 90% de etanol e 10% de água. A síntese foi monitorada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), utilizando como fase móvel o metanol e clorofórmio (1:9) e a estrutura confirmada por métodos cromatográficos. A solução mãe sintetizada foi de 1870 g/L e a partir dessa solução foi feita uma solução estoque 18,7 g/L, a qual foi diluída com o tampão KRP nas concentrações de uso para tratamento. O LPS sonificado (Sigma-Aldrich) na concentração de 1000 µg/mL foi diluído em PBS para uma solução mãe de 30 µg/mL e posteriormente diluído em KRP para a concentração de tratamento de 1 µg/mL.

Para o tratamento das células, PC e PCS foram diluídos em tampão KRP, de modo que as concentrações utilizadas foram: concentrações normais (PC1: 0,60 mg/L e PCS1: 2,87 mg/L); concentrações mínima urêmica (PC2: 20,10 mg/L e PCS2: 15,60 mg/L); concentrações máxima urêmica (PC3: 40,70 mg/L e PCS3: 47,20 mg/L), de acordo com *European Uremic Toxin – EuTox* (HIDA, 1996; ARONOV, 2011). Para o tratamento das células com LPS, o mesmo foi diluído em tampão KRP na concentração de 1 µg/mL, valor que segundo a literatura estimula significativamente a produção de

MCP-1 (JIANG *et al.*, 2010). Os ensaios foram realizados na presença ou ausência de 30  $\mu$ M do inibidor seletivo da porção p65 da via NF- $\kappa$ B [JSH-23 (4-Metil-N1-(3-fenil-propil)-benzeno-1,2-diamina)] (Sigma-Aldrich) (JIANG *et al.*, 2010). Todos os tratamentos foram realizados em 0 horas e em 3 horas, como previamente padronizados por nosso grupo (STINGHEN, 2009) (FIGURA 8).



**FIGURA 8. Representação esquemática do tratamento das VSMC.** As células foram tratadas com PC, PCS nas concentrações normais (PC1/PCS1) e urêmicas (PC2/PCS2; PC3/PCS3) e LPS, sem e com inibidor (i), numa cinética de 0h e 3h. FONTE: O AUTOR (2013).

#### 4.4 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR

Para este ensaio, foram plaqueadas  $10^4$  células/poço numa placa de 96 poços. As células foram mantidas em cultura com o meio DMEM, 15% SFB a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 80% a 90% de confluência. As células foram incubadas com PC1, PC2, PC3 e PCS1, PCS2, PCS3 por 24 horas. Após esse período, acrescentou-se uma

solução a 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich) deixando as células incubadas por mais 4 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para a incorporação do MTT e consequente formação dos cristais de formazan. Posteriormente, todo o meio foi retirado e os cristais foram solubilizados em DMSO. A absorbância foi lida a 570 nm (MOSMANN, 1983). Foram realizados três experimentos em triplicata.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1

A dosagem de MCP-1 foi realizada em sobrenadante de cultura após os tratamentos com PC ou PCS nas concentrações normal, mínima urêmica e máxima urêmica já descritas acima ou LPS (1 µg/mL), através do método de ELISA *sandwich*, onde foram utilizados os anticorpos de captura ou primário (2 µg/mL), recombinante (100 ng/mL) e de detecção ou secundário biotilado (50 ng/mL) (R&D Systems), sendo essas concentrações previamente padronizadas em nosso laboratório. As concentrações de MCP-1 (pg/mL) foram calculadas com base na curva de calibração correspondente realizada com o anticorpo recombinante. O limite de detecção mínimo e máximo desta metodologia foram 31,25 a 2000 pg/mL. A absorbância foi lida em espectrofotômetro em 450 nm (STINGHEN, 2009). Foram realizados três experimentos em triplicata.

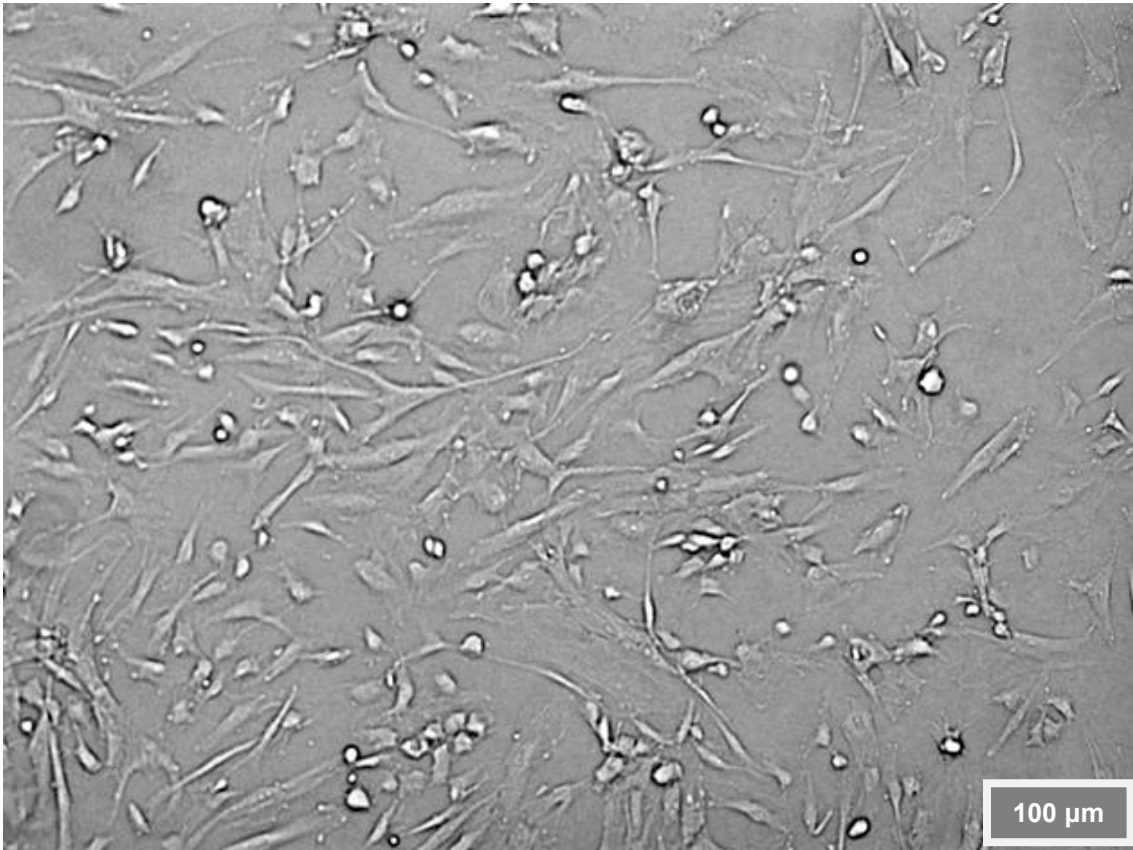
#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

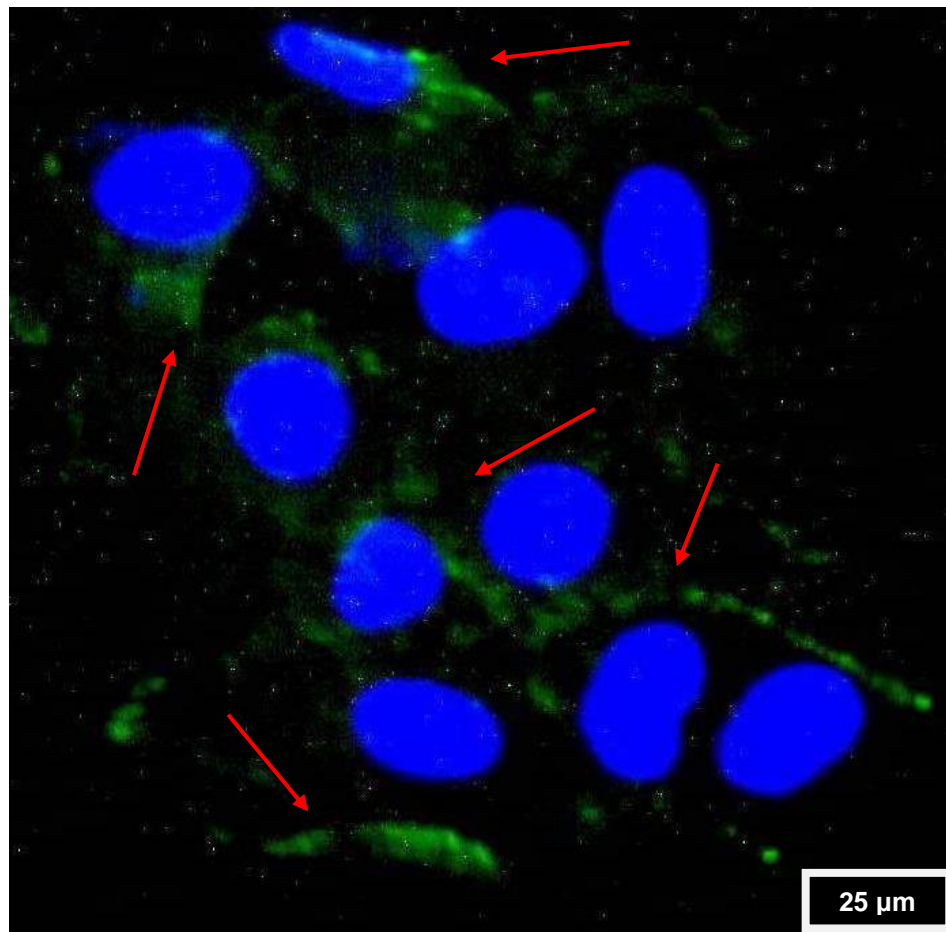
### 5.1 EXTRAÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Neste trabalho optamos por realizar a extração de VSMC a partir de veia de cordão umbilical. Este modelo oferece vantagens sobre o clássico modelo de explante (MOZAR, 2011), pois o cordão umbilical é um material biológico normalmente descartado após o parto e não oferece riscos a parturiente e ao bebê. Desta forma, a fim de se obter uma cultura primária de VSMC, foram extraídas células da veia de cordão umbilical por meio de digestão enzimática por ação da collagenase, enzima que degrada colágeno e ligações intercelulares. As células cultivadas foram visualizadas por meio da microscopia óptica, demonstrando as seguintes características morfológicas: células longas, fusiformes, sem estrias transversais, com núcleo único e central, sugerindo VSMC (FIGURA 9). Muitos estudos sugerem a extração de VSMC por meio do cordão umbilical, como MERZENICH *et al.* (2002), que extraíram simultaneamente endotélio e células de músculo liso de artéria e veia de cordão umbilical, com a finalidade de tratar esses dois tipos celulares com LDL oxidado. MARTIN DE LLANO *et al.* (2007) também extraíram células musculares lisas de veia e artéria de cordão umbilical a fim de entender suas bases moleculares e celulares.



**FIGURA 9. Microfotografia de células extraídas de cordão umbilical humano.** Aumento de 10X.  
FONTE: O AUTOR (2012).

Após a extração e cultivo, as células foram caracterizadas pela detecção do filamento  $\alpha$ -actina, proteína do citoesqueleto característica de células musculares lisas, sendo responsável por facilitar a contração e migração. Para essa caracterização, foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti  $\alpha$ -actina (Sigma-Aldrich) e o anticorpo secundário marcado com FITC (Sigma-Aldrich). O DAPI foi inserido na reação a fim de localizar o núcleo e consequentemente a presença de células (Sigma-Aldrich). A visualização das células foi feita em microscópio de imunofluorescência, onde observou-se a presença da fluorescência azul (DAPI), que marca o núcleo e da fluorescência verde (FITC), que marca o filamento  $\alpha$ -actina no citoesqueleto (FIGURA 10).



**FIGURA 10. Microfotografia de imunofluorescência com anticorpo monoclonal anti  $\alpha$ -actina.** A cor azul indica o núcleo da célula (DAPI). As setas indicam a presença do filamento  $\alpha$ -actina em verde (FITC). Aumento de 40X. FONTE: O AUTOR (2012).

Os filamentos de actina, sobretudo a  $\alpha$ -actina são estruturas abundantes nos músculos lisos, pois são constituintes do seu citoesqueleto e respondem pela contração desse tecido. Durante a formação de vasos sanguíneos, o fenótipo de VSMC na camada média muda de tal modo que a secreção de proteínas de matriz extracelular é reduzida e a formação de filamentos intracelular é aumentado. Porém, em lesão vascular, elas desempenham um papel importante na reparação tecidual com o aumento da proliferação celular, migração e síntese de matriz extracelular, fato que favorece a presença de algumas doenças, como a aterosclerose, em que as VSMC se proliferam e danificam o tecido (OWENS, 1995). No processo de morfogênese vascular há uma constante modificação celular fenotípica, contemplando os seguintes tipos celulares: mioblastos, miofibroblastos, VSMC imaturas e VSMC diferenciadas



(SARTORE, 2001). Todas essas células apresentam o filamento  $\alpha$ -actina em seu citoesqueleto (FIGURA 11). As células vasculares não musculares, como os fibroblastos, não contêm esse filamento. Além disso, exclui-se a possibilidade de serem células endoteliais, pois estas são muito exigentes e precisam de diversos fatores de crescimento e suplementos para se desenvolverem e crescerem. Sendo assim, sugere-se que as células extraídas de cordão umbilical por digestão enzimática são pertencentes à linhagem muscular lisa.

	Vimentina	Miosina não muscular	$\alpha$ -actina	<i>Smoothelin</i>
Células não musculares - Fibroblastos/VSMCs não musculares	+	+	-	-
Células com propriedades antigênicas de VSMC - Mioblastos - Miofibroblastos	+	+	+	-
Células musculares lisas - VSMCs imaturos - VSMCs diferenciados	+	+	+	+

**FIGURA 11. Algumas proteínas do citoesqueleto de principais tipos celulares vasculares.** A  $\alpha$ -actina está presente em mioblastos, miofibroblastos, VSMC imaturas e diferenciadas. FONTE: SARTORE *et al.*, 2001.

As citocinas mais importantes produzidas pelas VSMC são: fator derivado de plaquetas (PDGF), fator de inibição de macrófagos (MIF), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e MCP-1 (DORAN, 2008). NAVAB *et al.* (1991) demonstraram em estudos envolvendo células endoteliais e VSMC de aorta humana a indução da produção de MCP-1 e da migração dos monócitos para o espaço subendotelial estimulados pela LDL oxidada. Três importantes estudos já investigaram a influência de MCP-1 na proliferação de VSMC *in vitro*: IKEDA *et al.* (1995) observaram um efeito inibitório de VSMC induzido por MCP-1 e independente de prostaglandinas e óxido nítrico; SEINO *et al.* (1995) avaliaram a expressão gênica de MCP-1 em VSMC de vasos ateroscleróticos, demonstrando assim que MCP-1 é expressada pelas VSMC, bem como por células endoteliais e macrófagos, contribuindo dessa forma para a patogênese da aterosclerose. PORRECA *et al.* (1997) verificaram um aumento na proliferação de

VSMC após incubação com MCP-1 em presença de soro fetal bovino e WATANABE *et al.* (2001) sugeriram que MCP-1 amplifica o efeito mitogênico da serotonina nas VSMC.

## 5.2 SÍNTESE DE PCS

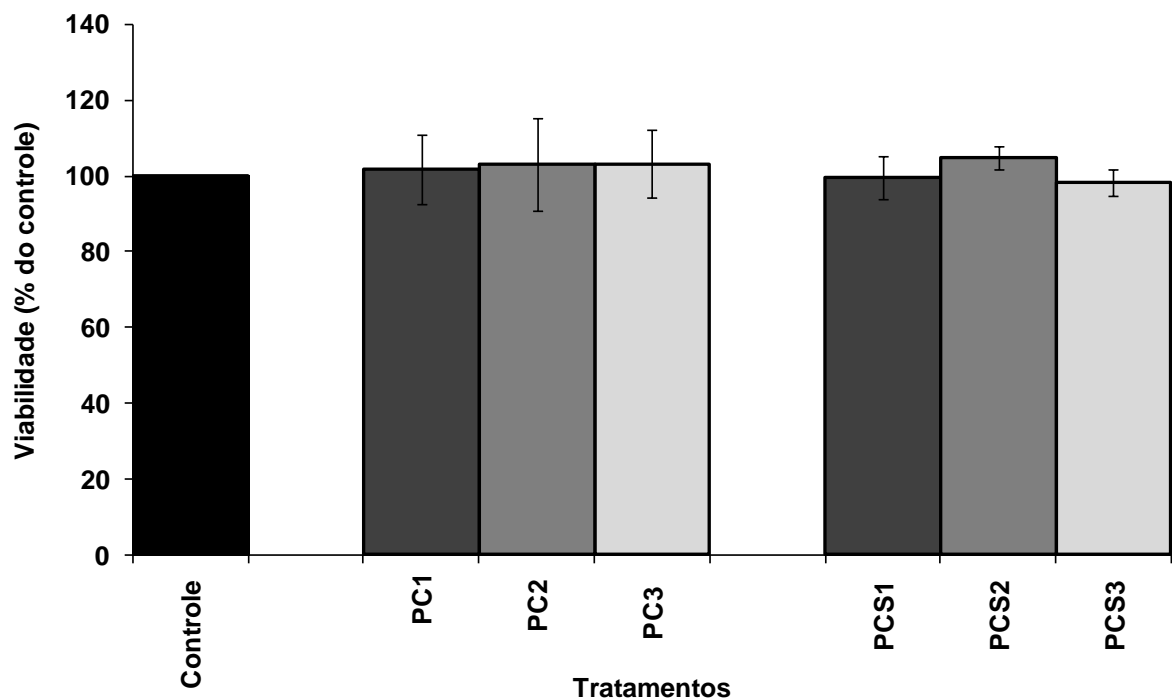
O *p*-cresol dissolvido em pirimidina é convertido a *p*-cresilsulfato pela adição de ácido clorosulfônico. O uso do ácido clorosulfônico como agente sulfatante apresenta desvantagens, sobretudo por ser tóxico, dificultando seu manuseio (TURVEY, 1965). A formamida tem a função de melhorar a dissolução do PC no sistema, permanecendo inerte no meio reacional (ALBAN *et al.*, 1992). A umidade foi evitada no sistema reacional, pois a água reage com o ácido clorosulfônico inativando-o. O composto formado foi monitorado por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e identificado por espectrometria. A síntese do sal de potássio do *p*-cresilsulfato descrita inicialmente por FEIGENBAUM & NEUBERG (1941) está bem padronizada, sendo reproduzida por diversos estudos que sulfatam o PC através do ácido clorosulfônico em altas concentrações, como VANHOLDER *et al.* (2007), que sintetizaram PCS para avaliar a atividade do *burst* respiratório em leucócitos e MEIJERS *et al.* (2009) que através do tratamento de células endoteliais com PCS, avaliaram o sítio de ligação da toxina com a albumina.

## 5.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Este ensaio baseia-se na comprovação da citotoxicidade induzida por um determinado composto ou toxina no metabolismo celular de glicídeos, usualmente através da avaliação da atividade de enzimas desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial e conseqüentemente a viabilidade celular são quantificadas pela redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (um sal de coloração roxa e insolúvel em água). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. Em

24 horas de exposição das VSMC com PC e PCS nas suas respectivas concentrações normal (PC1/PCS1), mínima urêmica (PC2/PCS2) e máxima urêmica (PC3/PCS3), não houve diferença significativa na viabilidade celular (GRÁFICO 1). Em todos esses ensaios a viabilidade se manteve próximo dos 100%, em relação ao controle, ou seja, PC e PCS não danificaram a estrutura e integridade das VSMC, corroborando com estudos de SCHEPERS *et al.* (2007), que após tratarem leucócitos com PC e PCS observaram que a viabilidade das células foi maior que 95%. Ainda, DOU *et al.* (2004) e YING *et al.* (2011) demonstraram que apesar de não induzir a morte celular, PC inibe a proliferação de células endoteliais e reparação a lesão, diminuindo a angiogênese. Em outro estudo desenvolvido por nosso grupo, verificou-se que as concentrações normal e urêmicas de PC não apresentaram citotoxicidade celular, porém foi capaz de induzir aumento no stress oxidativo em macrófagos (MORENO, 2012).

GRÁFICO 1. Avaliação da Viabilidade Celular por MTT em 24 horas



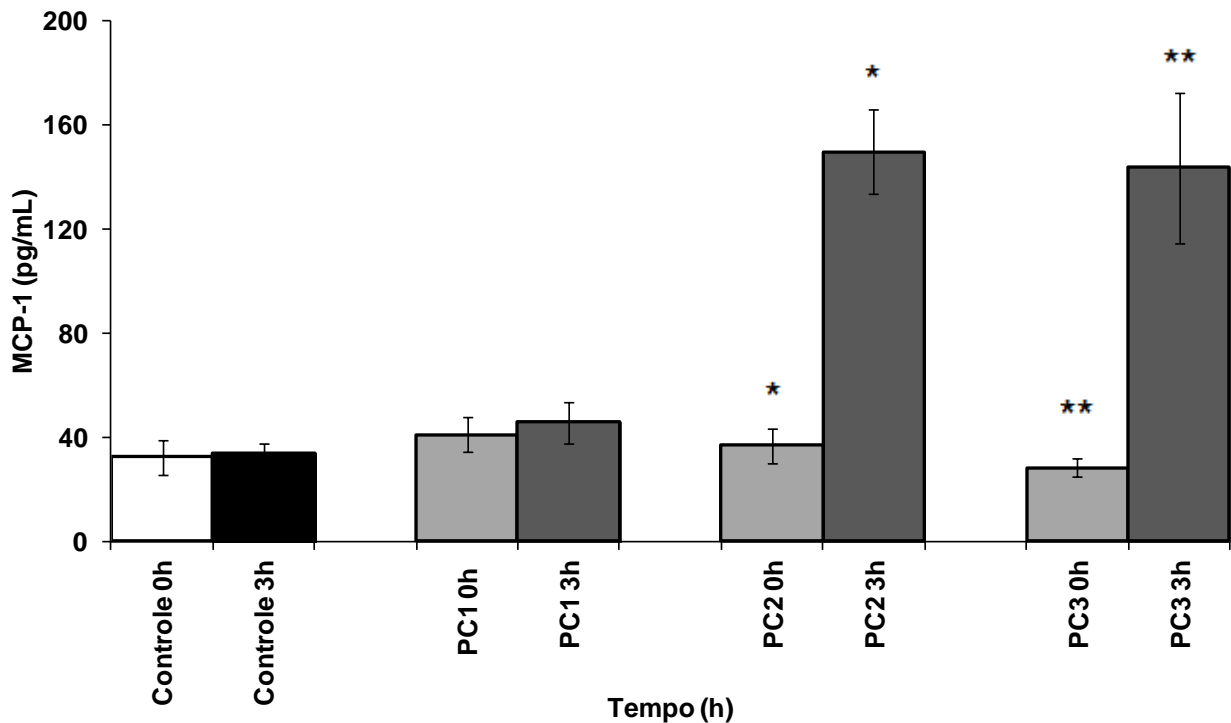
FONTE: O AUTOR (2013)

NOTA: Controle: células sem toxinas; PC1: *p*-cresol na concentração normal (0,60 mg/L); PC2: *p*-cresol na concentração mínima urêmica (20,10 mg/L); PC3: *p*-cresol na concentração máxima urêmica (40,70 mg/L); PCS1: *p*-cresilsulfato na concentração normal (2,87 mg/L); PCS2: *p*-cresilsulfato na concentração mínima urêmica (15,60 mg/L); PCS3: *p*-cresilsulfato na concentração máxima urêmica (47,20 mg/L).

#### 5.4 EXPRESSÃO *IN VITRO* DE MCP-1

As células tratadas com PC em níveis basais (0h) tiveram a expressão de MCP-1 semelhantes ao controle ( $36,7 \pm 6,5$  pg/mL vs  $32,26 \pm 6,38$  pg/mL). Nas VSMC tratadas com PC1 não houve diferença significativa nos níveis de MCP-1 produzidos após 0h e 3h, já que essa concentração é normal e baixa. Nas VSMC tratadas com PC2 e PC3 verificamos um aumento significativo de MCP-1 após 3h de tratamento ( $149,8 \pm 16$  pg/mL,  $p < 0,001$  e  $143,5 \pm 28,7$  pg/mL,  $p < 0,05$  respectivamente), quando comparados ao tempo 0h ( $41 \pm 6,6$  pg/mL) (GRÁFICO 2). Estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo demonstraram que o MCP-1 encontra-se elevado em estágios mais avançados de DRC (STINGHEN *et al.*, 2009), em tempo e concentração urêmica dependentes. Esse aumento acontece mediante o processo de agressão ao endotélio por toxinas urêmicas, onde se inicia o processo de inflamação sistêmica, envolvendo inúmeras células inflamatórias que se tornam ativadas e liberam uma variedade de citocinas, tais como MCP-1, uma das mais importantes produzidas pelas VSMC e envolvida na patofisiologia da aterosclerose. As VSMC podem expressar uma variedade de citocinas e moléculas de adesão e contribuir assim para a iniciação e propagação da resposta inflamatória no processo aterogênico atraindo e ativando leucócitos, induzindo proliferação celular, promovendo disfunção endotelial e estimulando produção de componentes da matriz extracelular (WANG *et al.*, 2007; DORAN, 2008). Além de PC, ocorre estimulação na produção de MCP-1 em VSMC tratadas também com lipoproteínas pró-aterogênicas (DOMOTO *et al.*, 2003). Ainda, CHANG *et al.* (2011) verificaram que PC pode potencialmente dificultar a formação do coágulo de sangue, causando desordens hemorrágicas através da inibição da agregação plaquetária. MEIJERS *et al.* (2010) sugeriram que níveis de PC mensurados no plasma de pacientes com DRC podem ajudar a prever o risco de DCV, além de ser útil como marcador tradicional de filtração glomerular.

GRÁFICO 2. Expressão de MCP-1 por VSMC tratadas com PC



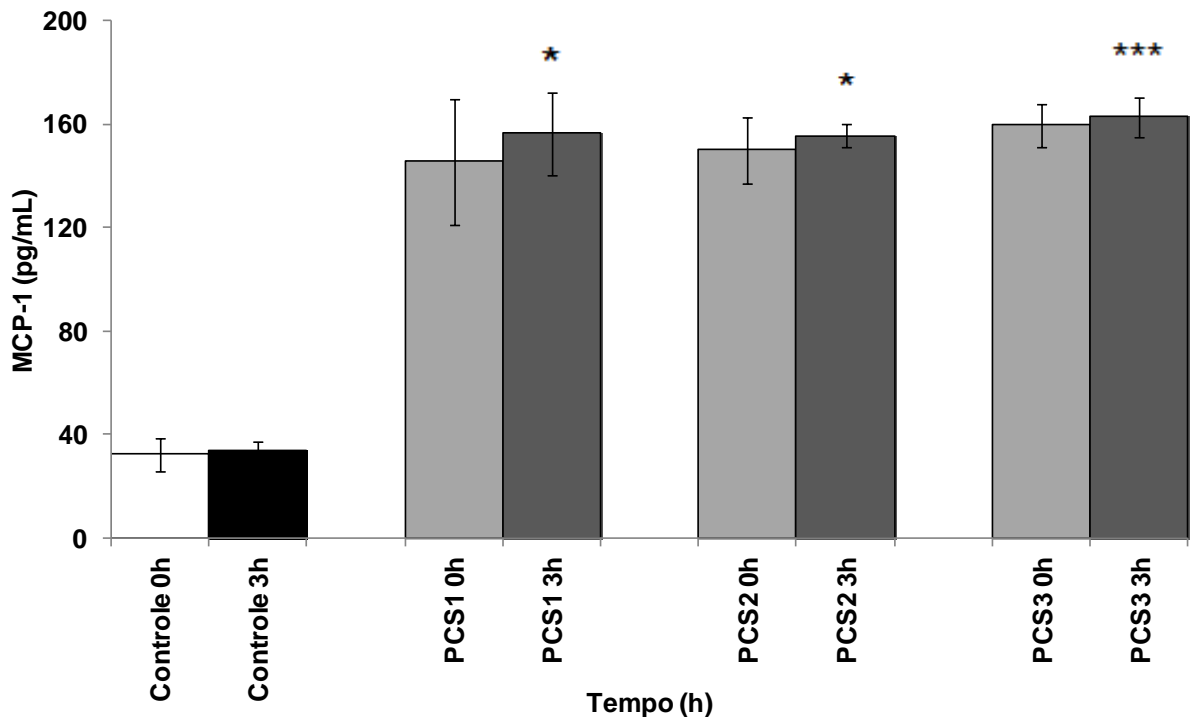
FONTE: O AUTOR (2013)

NOTA: Controle: células sem toxina; PC1: *p*-cresol na concentração normal (0,6 mg/L); PC2: *p*-cresol na concentração mínima urêmica (20,10 mg/L); PC3: *p*-cresol na concentração máxima urêmica (40,70 mg/L). \* $P < 0,001$ : PC2 vs controle ; \*\*  $P < 0,05$ : PC3 vs controle.

Observou-se também que as VSMC tratadas em 3h com PCS3 estimularam de forma mais intensa ( $162,7 \pm 7,5$  pg/mL;  $p < 0,005$ ) a produção de MCP-1 do que as VSMC tratadas com PC3 ( $143,7 \pm 28$  pg/mL), principalmente após 3 horas quando comparadas ao tempo 0h de tratamento (GRAFICO 3), o que corrobora com a literatura e confirma que o conjugado é a toxina efetiva, pelo seu expressivo impacto bioquímico, afetando a resposta inflamatória, interferindo na ativação de leucócitos polimorfonucleares e resposta vascular a citocinas (DOU, 2002; VANHOLDER, 2008). O PCS tem sido descrito como efector do processo pró-inflamatório em leucócitos e consequente aumento da produção de radicais livres. Este efeito pode contribuir para o desenvolvimento da DCV na população urêmica (SCHEPERS, 2007; CHANG, 2011). Ainda, o PCS também foi descrito como toxina que altera a função endotelial em pacientes que se encontram em terapia dialítica (MEIJERS, 2009). Altos níveis de PCS estão associados com a patogênese da DCV, sobretudo aterosclerose em pacientes

com falência renal (WANG *et al.*, 2010). MEIJERS *et al.* (2009) sugeriram que PCS e indoxil sulfato podem ser dois marcadores válidos para monitorar o comportamento de solutos ligados às proteínas durante a diálise. Entretanto, ambos são inibidores de ligação competitiva para o mesmo sítio de ligação de albumina, por isso a técnica pode ser útil, mas não específica.

GRÁFICO 3. Expressão de MCP-1 em VSMC tratadas com PCS



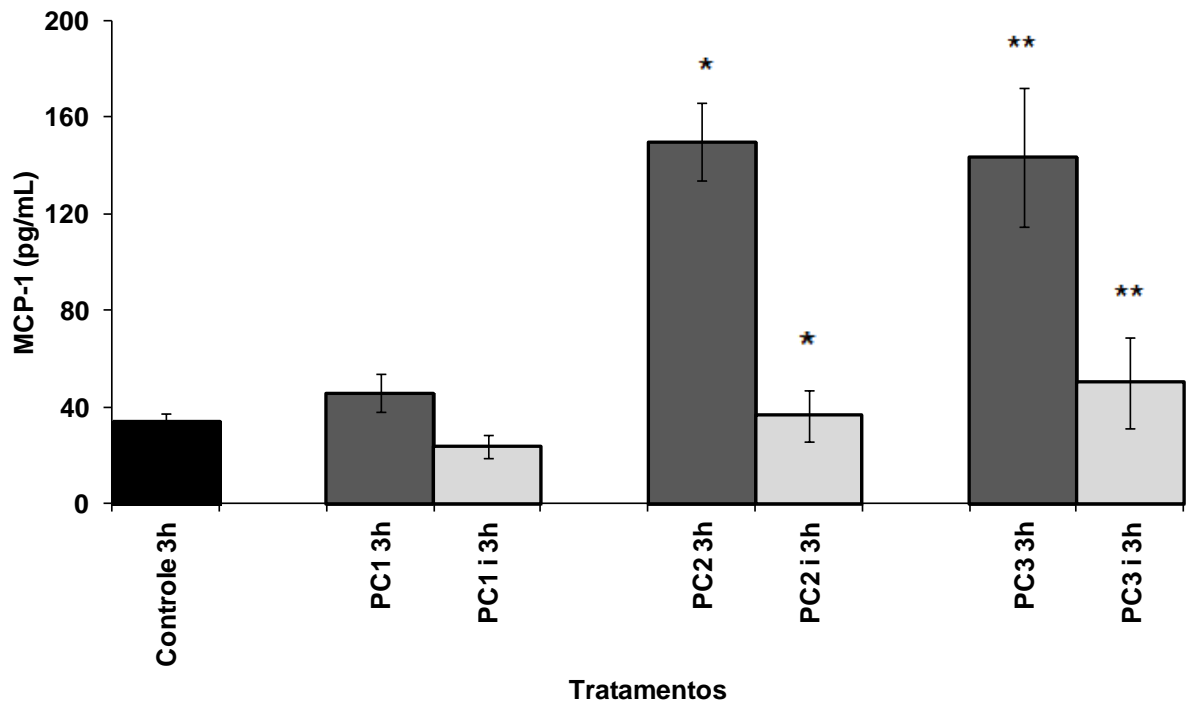
FONTE: O AUTOR (2013)

NOTA: Controle: células sem toxina; PCS1: *p*-cresilsulfato na concentração normal (2,87 mg/L); PCS2: *p*-cresilsulfato na concentração mínima urêmica (15,60 mg/L); PCS3: *p*-cresilsulfato na concentração máxima urêmica (47,20 mg/L). \* $p < 0,001$ : PCS1 e PCS2 vs controle; \*\*\*  $p < 0,005$ : PCS3 vs controle.

Após 3h de tratamento das VSMC com PC e inibidor seletivo de translocação nuclear da porção p65 do NF- $\kappa$ B, houve uma diminuição significativa na produção de MCP-1 em comparação as células tratadas somente com as toxinas, principalmente nas concentrações urêmicas: PC2 x PC2i ( $149,8 \pm 16$  pg/mL vs  $36,4 \pm 10,5$  pg/mL;  $p < 0,001$ ;) e PC3 x PC3i ( $143,6 \pm 28$  pg/mL vs  $50 \pm 18$  pg/mL;  $p < 0,05$ ;) (GRAFICO 4). Segundo GHOSH (1998), uma das principais vias de ativação da quimiocina MCP-1 é a via NF- $\kappa$ B, cuja modulação desencadeia uma cascata de eventos de sinalização, os

quais possuem o controle da expressão gênica. Assim como indoxil sulfato, PC também regula a expressão de moléculas de adesão e MCP-1 através de ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meios da ativação de NF- $\kappa$ B em células endoteliais vasculares (TUMUR *et al.*, 2010). Pelo fato de NF- $\kappa$ B ser um indutor bem conhecido dos genes inflamatórios e aterogênicos, estratégias eficazes para interromper essa via podem ser hipoteticamente usadas para atenuar as doenças inflamatórias, tais como aterosclerose, que estão associadas com aumento da ativação do NF- $\kappa$ B. Entretanto, uma vez que NF- $\kappa$ B é conhecida como um sinal de sobrevivência para maior parte das células, uma redução crônica, a longo prazo, do seu nível basal, poderia levar a morte celular (DWARAKANATH *et al.*, 2004).

GRÁFICO 4. Expressão de MCP-1 por VSMC tratadas com PC e inibidor da via NF- $\kappa$ B em 3 horas



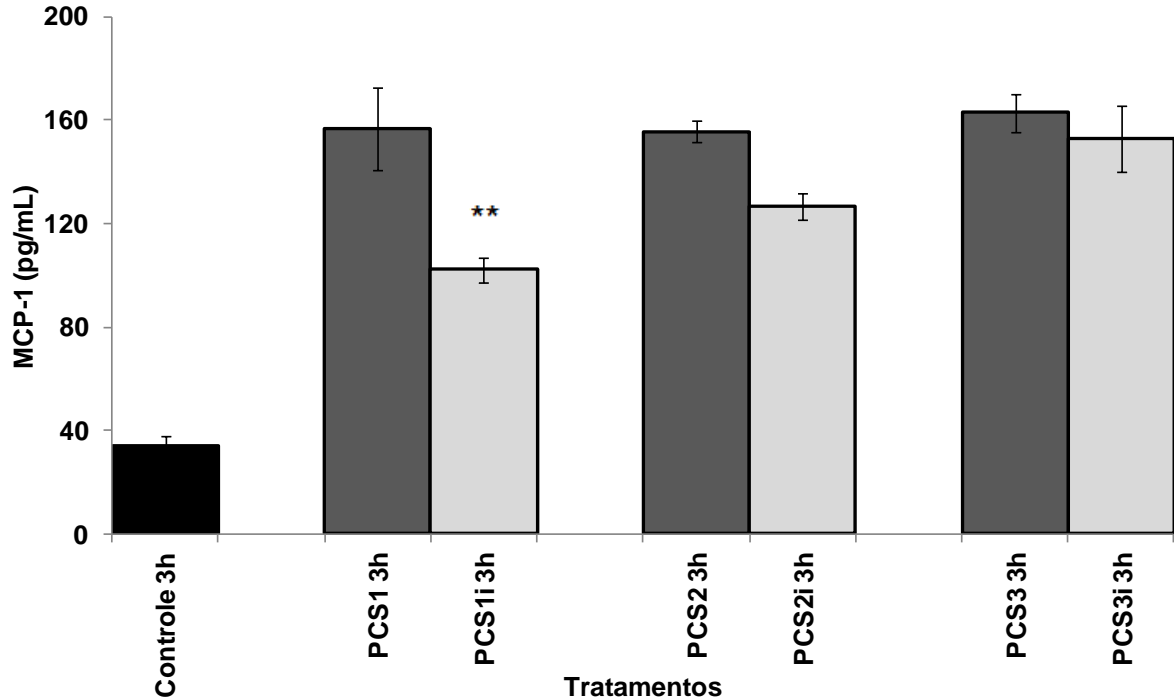
FONTE: O AUTOR (2013)

NOTA: Controle: células sem toxina; PC1: *p*-cresol na concentração normal (0,60 mg/L); PC2: *p*-cresol na concentração mínima urêmica (20,10 mg/L); PC3: *p*-cresol na concentração máxima urêmica (40,70 mg/L); PC1i: *p*-cresol na concentração normal (0,60 mg/L) + inibidor da via NF- $\kappa$ B (30  $\mu$ M); PC2i: *p*-cresol na concentração mínima urêmica (20,10 mg/L) + inibidor da via NF- $\kappa$ B (30  $\mu$ M); PC3i: *p*-cresol na concentração máxima urêmica (40,70 mg/L) + inibidor da via NF- $\kappa$ B (30  $\mu$ M). \*  $p < 0,001$ ; PC2 vs PC2i; \*\*  $p < 0,05$ ; PC3 vs PC3i.

Nos tratamentos das VSMC com PCS, o inibidor da via NF- $\kappa$ B também atuou de forma a inibir a produção de MCP-1, principalmente na concentração normal PCS1 x PCS1i ( $156,49 \pm 15,9$  pg/mL vs  $102,3 \pm 4,6$  pg/mL;  $p < 0,05$ ). Esse efeito da atuação do inibidor foi menor de acordo com o aumento da concentração da toxina, uma vez que com PC2 e PC3 a inibição não foi significativa (GRAFICO 5). Este achado sugere que a via NF- $\kappa$ B contribua de forma menos efetiva para a produção de MCP-1 após o tratamento das células com PCS, sobretudo com as concentrações urêmicas, do que seu precursor PC. Além da porção p65 do NF- $\kappa$ B, outros subprodutos de NF- $\kappa$ B, tais como a p53 podem estar diretamente envolvidos na regulação de MCP-1 (HACKE *et al.*, 2010). DWARAKANATH *et al.* (2004) descrevem que é importante, nesse caso, desenvolver uma terapia que iniba não somente a atividade do NF- $\kappa$ B p65, mas também a regulação de genes específicos da via e qualquer outro gene pró-inflamatório expresso em VSMC, além de outras vias de transcrição de citocinas.



GRÁFICO 5. Expressão de MCP-1 em VSMC tratadas com PCS e inibidor da via NF-κB em 3 horas



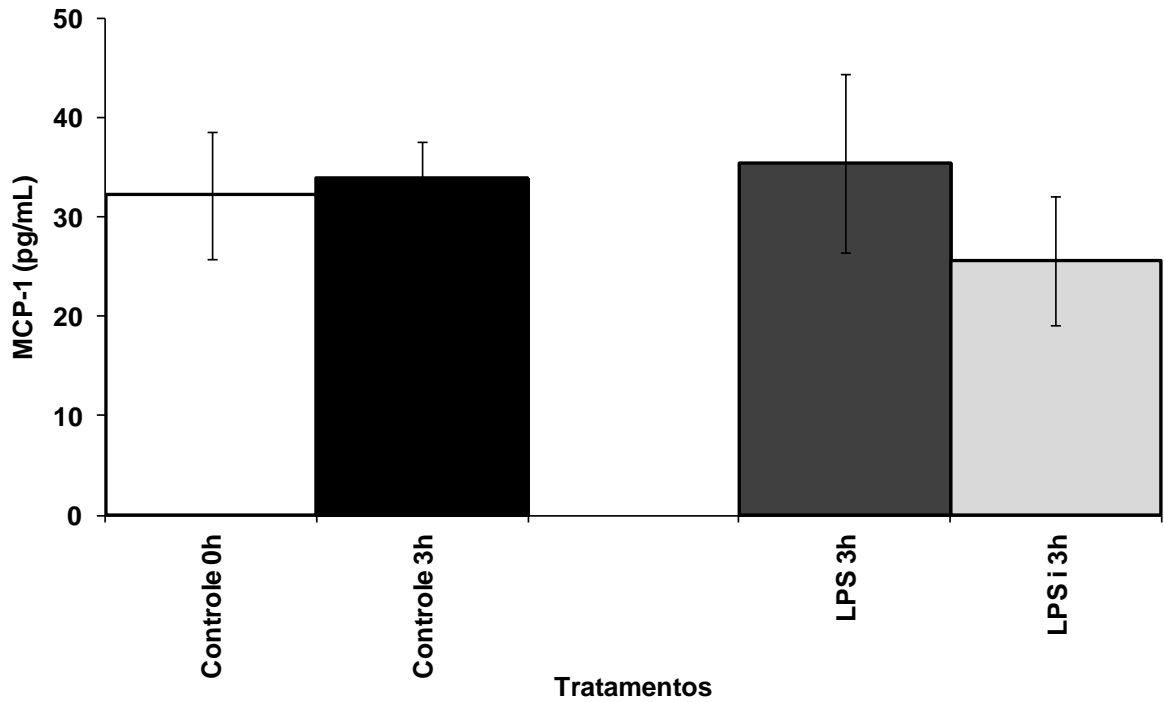
FONTE: O AUTOR (2013)

NOTA: Controle: células sem toxina; PCS1: *p*-cresilsulfato na concentração normal (2,87 mg/L); PCS2: *p*-cresilsulfato na concentração mínima urêmica (15,60 mg/L); PCS3: *p*-cresilsulfato na concentração máxima urêmica (47,20 mg/L); PCS1i: *p*-cresilsulfato na concentração normal (2,87 mg/L) + inibidor da via NF-κB (30 μM); PCS2i: *p*-cresilsulfato na concentração mínima urêmica (15,60 mg/L) + inibidor da via NF-κB (30 μM); PCS3i: *p*-cresilsulfato na concentração máxima urêmica (47,20 mg/L) + inibidor da via NF-κB (30 μM). \*\*  $p < 0,005$ : PCS1 vs PCS1i.

Na tentativa de termos um controle positivo, tratamos as VSMC com LPS, uma toxina urêmica de baixo peso molecular e amplamente conhecida por ativar a via NF-κB (RAETZ & WHITFIELD, 2002). Porém, nesse caso, verificamos que a mesma não serve como controle, uma vez que sua via de reconhecimento pela célula se dá através de receptores *Toll-like* (TLR) e não de um *transporter* (OAT), como é o caso de PC e PCS. Por ativarem a via NF-κB por mecanismos diferentes, não podem ser comparados em relação a sua expressão e dosagens de citocinas em sobrenadantes celulares. Contudo, LPS é uma toxina comum na circulação sanguínea de pacientes com DRC e seu estudo também é relevante para avaliarmos a influência dessa toxina na progressão da DCV. Após 3h de tratamento não houve produção significativa de MCP-1

por estímulo ao LPS x controle ( $35,5 \pm 8,9$  pg/mL vs  $34 \pm 8,9$  pg/mL). Ainda, na presença do inibidor da via NF- $\kappa$ B, a toxina induziu uma expressão menor de MCP-1 pelas VSMC quando comparado com as VSMC tratadas somente com LPS, porém não em níveis significativos, LPS x LPSi ( $35,5 \pm 8,9$  pg/mL vs  $25,6 \pm 6,5$  pg/mL) (GRAFICO 6). Sugere-se que essa toxina precise de mais tempo de exposição com as VSMC para que níveis significativos de MCP-1 sejam produzidos pela via NF- $\kappa$ B com maior expressão. Em pacientes com DRC, o aumento de LPS está relacionado com a permeabilidade da barreira intestinal alterada, permitindo a translocação de endotoxinas para a circulação, do uso de antibióticos sistêmicos, que libertam quantidades de LPS durante a bacteriólise e também da utilização de água não-ultrapura para a preparação do dialisado no procedimento de diálise (HOLZHEIMER *et al.*, 1998; HAUSER *et al.*, 2010). Segundo GUHA *et al.* (2001), endotoxinas estimulam monócitos e macrófagos e induzem muitos genes que expressam mediadores inflamatórios. Além disso, a via NF- $\kappa$ B foi inibida após 3h de tratamento, mantendo o nível até mais baixo do que o controle, o que evidencia o envolvimento dessa via na produção da quimiocina, concordando com estudos que afirmam que essa via é uma das principais ativadas pelo LPS (RAETZ & WHITFIELD, 2002). Baixos níveis de LPS são combatidos pelo sistema de defesa do organismo humano, entretanto excesso de endotoxina circulante ou uma reação exacerbada pode levar a um aumento da resposta inflamatória sistêmica (GUHA *et al.*, 2001). Pelo fato de PC e PCS terem a capacidade de suprimir a produção de produtos reativos de leucócitos, a retenção de PC e PCS tem sido considerada como um dos elementos que favorecem a susceptibilidade dos pacientes urêmicos à infecção. Esse quadro favorece ainda mais o desenvolvimento de inflamação crônica persistente e conseqüentemente a progressão da aterosclerose (DE SMET *et al.*, 2003).

GRÁFICO 6. Expressão de MCP-1 em VSMC tratadas com LPS e inibidor da via NF- $\kappa$ B em 3 horas



FONTE: O AUTOR (2013)

NOTA: Controle: células sem toxina; LPS: lipopolissacarídeo (1  $\mu$ g/mL); LPSi: lipopolissacarídeo (1  $\mu$ g/mL) + inibidor da via NF- $\kappa$ B (30  $\mu$ M).

## 6 CONCLUSÃO

Após a extração das células de cordão umbilical humano foi realizada a caracterização celular pela detecção do filamento de  $\alpha$ -actina, característico de VSMC, confirmando a presença exclusivamente de VSMC. Após o tratamento das VSMC com as toxinas PC e PCS, nas três concentrações testadas (PC1, PC2, PC3, PCS1, PCS2, PCS3), a viabilidade celular se manteve próximo de 100%, demonstrando que nesse caso a toxicidade não envolve mecanismos de morte celular. As VSMC expostas a PC expressaram um aumento significativo na produção de MCP-1 de forma dose e tempo dependente, o que corrobora com estudos anteriores do nosso grupo, onde MCP-1 encontra-se em soro de pacientes em estágios mais avançados da DRC. O PCS estimulou de forma mais significativa a produção de MCP-1 do que seu precursor PC, demonstrando que o conjugado é a toxina efetiva. A toxina LPS também estimula a produção de MCP-1 por VSMC e também é um fator que favorece a progressão da DCV. O bloqueio da via NF- $\kappa$ B (porção p65) reduziu significativamente a expressão de MCP-1 em VSMC tratadas com PC em todas as concentrações testadas, atuando com maior expressão no tratamento com PC e com menor expressão no tratamento com PCS e LPS, sugerindo a ação de outras vias importantes na produção de MCP-1.

## 7 ENSAIOS ADICIONAIS

- Repetir algumas dosagens de MCP-1 com PCS após nova síntese;
- Realização de Western Blot para detecção do NF- $\kappa$ B p65;
- Análise de expressão de receptor para MCP-1 (CCR2) em VSMC.

## REFERÊNCIAS

- ADDABBO F, MALLAMACI F *et al.* **Searching for biomarker patterns characterizing carotid atherosclerotic burden in patients with reduced renal function.** Nephrol Dial Transplant, Jul 21. 2007.
- ALBAN S, KRAUS J, FRANZ G. **Synthesis of laminarin sulfates with anticoagulant activity.** Drug Res., Aulendorf, v.42(II), n. 8, p. 1005-1008, 1992.
- ARONOV P, LUO F, PLUMMER N, QUAN Z, HOLMES S, HOSTETTER T, MEYER T. **Colonic Contribution to Uremic Solutes.** J Am Soc Nephrol 22: 1769–1776, 2011.
- BAEUERLE P, BALTIMORE D. **NF- $\kappa$ B: Ten years after.** Cell 87:13-20. 1996.
- BALDWIN A, S JR. **The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights.** Annu Rev Immunol, v.14, p.649-83. 1996.
- BAMMENS B. *et al.* **Removal of middle molecules and protein-bound solutes by peritoneal dialysis and relation with uremic symptoms.** Kidney International, Vol. 64, pp. 2238–2243. 2003.
- BAMMENS B, EVENEPOELP *et al.* **Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients.** Kidney Int. 2006 Mar;69(6):1081-7.
- BERGÉ-LEFRANC D, CHASPOUL F *et al.* **Binding of p-cresylsulfate and p-cresol to human serum albumin studied by microcalorimetry.** J Phys Chem B, v.114, n.4, Feb 4, p.1661-5.
- BOISVERT W. A., Santiago R. *et al.* **A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.** J Clin Invest, v.101, n.2, Jan 15, p.353-63. 1998.
- BORING L, GOSLING J *et al.* **Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.** Nature, v.394, n.6696, Aug 27, p.894-7. 1998.
- BRAND K, PAGE S, WALLI A, NEUMEIER D, BAEUERLE P. **Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis.** Exp Physiol. Mar;82(2):297-304. 1997.
- CHANG M, MEIWANG T, YUETYEUNG S, YUANJENG P, HUILIAOD C, YUNGLIN T, LIN C, RULIN B, HUEIJENG J. **Antiplatelet effect by p-cresol, a uremic and environmental toxicant, is related to inhibition of reactive oxygen species,**

**ERK/p38 signaling and thromboxane A<sub>2</sub> production.** *Atherosclerosis* 219 (2011) 559–565

COHEN G, GLORIEUX G. *et al.* **Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro towards a standardized approach for research on uraemia.** *Nephrol Dial Transplant*, Aug 27. 2007.

DE LOOR H, BAMMENS B *et al.* **Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum.** *Clin Chem*, v.51, n.8, Aug, p.1535-8. 2005.

DE SMET *et al.* **Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis.** *Clinical Chemistry* 49:3 470–478. 2003.

DIAZ-BUXO J, WOODS E. **Protecting the endothelium: a new focus for management of chronic kidney disease.** *Hemodial Int*, v.10, n.1, Jan, p.42-8. 2006.

DIDONATO J, MERCURIO F, ROSETTE C *et al.* **Mapping of the inducible I $\kappa$ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation.** *Mol Cell Biol*.16:1295-304. 1996.

DOMOTO K, TANIGUCHI T, TAKAISHI H, TAKAHASHI T, FUJIOKA Y, TAKAHASHI A, ISHIKAWA Y, YOKOYAMA M. **Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells.** *Atherosclerosis* 2003;171:193–200.

DORAN A, MELLER N *et al.* **Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.28, n.5, May, p.812-9. 2008.

DOU L, CERINI C *et al.* **P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines.** *Kidney Int*, v.62, n.6, Dec, p.1999-2009. 2002.

DOU L, BERTRAND E, CERINI C, FAURE V, SAMPOL J, VANHOLDER R, BERLAND Y, BRUNET P. **The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair.** *Kidney International*, Vol. 65 (2004), pp. 442–451

DWARAKANATH R, SAHAR S, REDDY M, CASTANOTTO D, ROSSI J, NATARAJAN R. **Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by the oxidized lipid, 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid, in vascular smooth muscle cells via nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B).** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 36 (2004) 585–595.

EL NAHAS M. **Cardio-Kidney-Damage: a unifying concept.** *Kidney Int*, v.78, n.1, Jul, p.14-8. 2010.

ENOMOTO A, NIWA T. **Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure.** *Ther Apher Dial* 2007; 11:S27–S31

FAURE V, CERINI C *et al.* **The uremic solute p-cresol decreases leukocyte transendothelial migration in vitro.** *Int Immunol*, v.18, n.10, Oct, p.1453-9. 2006.

FEIGENBAUM & NEUBERG J. Simplified Method for the Preparation of Aromatic Sulfuric Acid Esters. *J Am Chem Soc*, v.63, 1941, p.02. 1941.

GERSZTEN R, GARCIA-ZEPEDA E *et al.* **MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.** *Nature*, v.398, n.6729, Apr 22, p.718-23. 1999.

GHOSH S, MAY M, KOPP E. **NF- $\kappa$ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses.** *Annu Rev Immunol*;16:225-60. 1998.

GLASS C, OGAWA S. **Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity.** *Nat Rev Immunol* 2006;6(1):44-55. 2006.

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

GORBET M, SEFTON M. **“Endotoxin: the uninvited guest”.** *Biomaterials*. 26: 6811-6817 (2005).

GROYER E, CALIGIURI G, LASCHET-KHALLOU J, NICOLETTI A. **Immunological aspects of atherosclerosis.** *Presse Med*. Mar;35(3 Pt 2):475-86. 2006.

GUHA M, MACKMAN N. **LPS induction of gene expression in human monocytes.** *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):85-94.

GUNTHER T, JANKOWSKI V *et al.* **Endothelium and vascular smooth muscle cells in the context of uremia.** *Semin Dial*, v.22, n.4, Jul-Aug, p.428-32. 2009.

HACKE K, RINCON-OROZCO B, BUCHWALTER G, SIEHLER S, WASYLYK B, WIESMÜLLER L, RÖSL F. **Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53.** *Molecular Cancer* 2010, 9:82

HAUSER A, STINGHEN A, GONÇALVES S, BUCHARLES S, PECOITS-FILHO R. **A Gut Feeling on Endotoxemia: Causes and Consequences in Chronic Kidney Disease.** *Nephron Clin Pract* 2011;118:c165–c172.

HAYES I, JORDAN N, TOWERS S, SMITH G, PATERSON J, EARNSHAW J, ROACH A, WESTWICK J, WILLIAMS R. **Human Vascular Smooth Muscle Cells Express Receptors for CC Chemokines.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18:397-403.

HIDA M, AIBA Y, SAWAMURA S, *et al.* **Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of**



**Lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis.** *Nephron* 74:349-355, 1996.

HIMMELFARB J. **Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy.** *Semin Dial*, v.22, n.6, Nov-Dec, p.636-43. 2009.

HOLZHEIMER R. **The significance of endotoxin release in experimental and clinical sepsis in surgical patients – evidence for antibiotic-induced endotoxin release?** *Infection* 1998. 26: 77–84.

IKEDA, U, OKADA K *et al.* **Monocyte chemoattractant protein 1 inhibits growth of rat vascular smooth muscle cells.** *Am J Physiol*, v.268, n.3 Pt 2, Mar, p.H1021-6. 1995.

IKEDA, U, MATSUI K *et al.* **Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease.** *Clin Cardiol*, v.25, n.4, Apr, p.143-7. 2002.

JIANG P, XU J, ZHENG S, HUANG J *et al.* **17 $\beta$ -estradiol down-regulates lipopolysaccharide-induced MCP-1 production and cell migration in vascular smooth muscle cells.** *Journal of Molecular Endocrinology* 45, 87–97. 2010.

JIN-ZHOU ZHU *et al.* **p-cresol, but not p-cresylsulphate, disrupts endothelial progenitor cell function in vitro.** *Nephrol Dial Transplant* 0:1-8. 2012.

KUSANO K, NAKAMURA K *et al.* **Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis.** *Circ J*, v.68, n.7, Jul, p.671-6. 2004.

LESAFFER G, DE SMET R *et al.* **Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane.** *Nephrol Dial Transplant*, v.15, n.1, Jan, p.50-7. 2000.

LIABEUF S, BARRETO D *et al.* **Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease.** *Nephrol Dial Transplant*, v.25, n.4, Apr, p.1183-91. 2010.

LIABEUF S, DRÜEKE B, MASSY Z. **Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies.** *Toxins (Basel)*. July; 3(7): 911–919. 2011.

LIBBY P. **Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization.** *Am J Cardiol* 86: 3–8, 2000.

LIBBY P, RIDKER P, MASERI A. **Inflammation and atherosclerosis.** *Circulation*.105:1135-1143. 2002.

LUSIS A. **Atherosclerosis.** *Nature*. Sep 14;407(6801):233-41. 2000.

LOUIS S., ZAHRADKA P. **Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion.** *Exp Clin Cardiol.* 2010 Winter; 15(4): e75–e85

MARTIN DE LLANO J, FUERTES G *et al.* **Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels.** *Transl Res*, v.149, n.1, Jan, p.1-9. 2007.

MARTINEZ A, RECHT N *et al.* **Removal of P-cresol sulfate by hemodialysis.** *J Am Soc Nephrol*, v.16, n.11, Nov, p.3430-6. 2005.

MARTINOVIC I, ABEGUNWARDENE N, SEUL M, *et al.* **Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease.** *Circ J.*; 69: 1484–1489. 2005.

MASSRY S. **Is parathyroid hormone a uremic toxin?** *Nephron*, v.19, n.3, p.125-30. 1977.

MEERT N, SCHEPERS E, GLORIEUX G *et al.* **Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications.** *Nephrol Dial Transplant.* 0: 1–8. 2011.

MEIJERS B, VAN KERCKHOVEN *et al.* **The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage.** *Am J Kidney Dis*, v.54, n.5, Nov, p.891-901. 2009.

MEIJERS B, CLAES *et al.* **p-cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease.** *Clin J Am Soc Nephrol*, v.5, n.7, Jul, p.1182-9. 2010.

MERZENICH G, METZNER C, BHONDE R, MALSCH G, SCHIERMEYER B, VETTER H. **Simultaneous isolation of endothelial and smooth muscle cells from human umbilical artery or vein and their growth response to low-density lipoproteins.** *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 38:265-272, May 2002.

MIYAMOTO Y, WATANABE H, NOGUCHI T, KOTANI S, NAKAJIMA M, KADOWAKI D, OTAGIRI M, MARUYAMA T. **Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney.** *Nephrol Dial Transplant* (2011) 26: 2498–2502. 2011.

MORENO A, BORTOLINI B. IMU01. **Efeito de p-cresol na ativação de células da linhagem THP-1.** *Escola de Saúde e Biociências 2012.* PUC/PR. <http://www2.pucpr.br/reol/semic/trabalho.php?dd0:6677&dd90:f5a8af2e26>

MOSMANN T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

MOZAR A, LOUVET L *et al.* **Uremic Toxin Indoxyl Sulfate Inhibits Human Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation.** *Therapeutic Apheresis and Dialysis.* 15(2):135–139. 2011.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION: **KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, classification, and stratification.** *Am J Kidney Dis* 39:S1-S266, 2002 (suppl 1).

NAVAB M, IMES S, HAMA S, HOUGH G, ROSS L, BORK R, VALENTE A, BERLINER J, DRINKWATER D, LAKS H, FOGELMAN A. **Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in co-cultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein.** *J Clin Invest.*;88:2039-2046. 1991.

OBERG B, MCMENAMIN E *et al.* **Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease.** *Kidney Int*, v.65, n.3, Mar, p.1009-16. 2004.

OWENS G. **Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells.** *Physiol Rev* 75: 487–517, 1995.

PAPAYIANNI A, ALEXOPOULOS E, GIAMALIS P, GIONANLIS L, BELECHRI AM, KOUKLOUDIS P, *et al.* **Circulating levels of ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1 are increased in haemodialysis patients: association with inflammation, dyslipidaemia, and vascular events.** *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 435–441.

PORRECA E, DI FEBBO C *et al.* **Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells.** *J Vasc Res*, v.34, n.1, Jan-Feb, p.58-65. 1997.

RAETZ C, WHITFIELD C. **Lipopolysaccharide endotoxins.** *Annu Rev Biochem.* 71: 635-700. 2002.

RENSEN S, DOEVENDANS M, VAN EYS, G. **Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity.** *Netherlands Heart Journal*, Volume 15, Number 3. 2007.

ROLLINS B. **Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease.** *Mol Med Today*, v.2, n.5, May, p.198-204. 1996.

SARNAK W, LEVEY A. **Cardiovascular disease and chronic renal disease: A new paradigm.** *Am J Kidney Dis* 2000; 35(Suppl 1):S117-S31.

SARTORE S *et al.* **Contribution of Adventitial Fibroblasts to Neointima Formation and Vascular Remodeling: From Innocent Bystander to Active Participant.** *Circ Res.* 89:1111-1121, 2001.

SCHECTER A *et al.* **Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells.** J Biol Chem. Vol. 272, No. 45, pp. 28568–28573. 1997.

SCHEPERS E, MEERT N *et al.* **P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production.** Nephrol Dial Transplant, v.22, n.2, Feb, p.592-6. 2007.

SEGAL M, BAYLIS C *et al.* **Endothelial health and diversity in the kidney.** J Am Soc Nephrol, v.17, n.2, Feb, p.323-4. 2006.

SEINO Y, IKEDA U, TAKAHASHI M, HOJO Y, IROKAWA M, KASAHARA T, SHIMADA K. **Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue.** Cytokine. 1995 Aug;7(6):575-9.

SELZMAN, C. H., S. A. MILLER, *et al.* **Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation.** Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.283, n.4, Oct, p.H1455-61. 2002.

SERRADELL M, DÍAZ-RICART M, ZURBANO M, LÓPEZ-PEDRET J, ORDINAS A, ESCOLAR G, CASES A. **Uremic media affects hemostatic properties of human endothelial cells in culture and increases the production of von Willebrand factor.** Nefrologia. 2002;22(1):33-41

SESSO R *et al.* **Relatório do censo brasileiro de diálise de 2010.** J Bras Nefrol;33(4):442-447. 2011.

SPINETTI G, WANG M, MONTICONE R, ZHANG J, ZHAO D, LAKATTA EG. **Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:1397-1402.

STENVINKEL P, LINDHOLM B *et al.* **Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease.** Nephrol Dial Transplant, v.15, n.10, p.1624-30. 2000.

STINGHEN A, GONCALVES S, *et al.* **Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease.** Nephron Clin Pract, v.111, n.2, p.c117-26. 2009.

STINGHEN A, GONÇALVES S, BUCHARLES S, BRANCO F, GRUBER B, HAUSER A, PECOITS-FILHO R. **Sevelamer Decreases Systemic Inflammation in Parallel to a Reduction in Endotoxemia.** Blood Purification, v. 29, p. 352-356, 2010.

SULIMAN M, QURESHI A *et al.* **Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: a predictor of outcome.** Nephrol Dial Transplant, v.21, n.6, Jun, p.1603-10. 2006.

THOMPSON G, SOUTAR A, SPENGLER F, JADHAV A, GAVIGANSJ, MYANT N. **Defects of receptor-mediated low density lipoprotein catabolism in homozygous familial hypercholesterolemia and hypothyroidism in vivo.** Acad Sci U S A; 78(4):2591-5. 1981.

TOBIAS P, MATHISON J, MINTZ D, LEE J, KRAV-CHENKO V, KATO K *et al.* **Participation of lipopoly-saccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation.** Am J Resp Cell Mol Biol. 1992;7:1456-66.

TUMUR, Z, SHIMIZU H *et al.* **Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation.** Am J Nephrol, v.31, n.5, p.435-41.

TURVEY J. R. **Sulfates of the simple sugars.** Adv. Carbohydr. Chem., New York, v.20, p.183-218, 1965.

VANHOLDER R, DE SMET R *et al.* **Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: Characterization of the role of p-cresol.** Kidney Int;47:510-517. 1995.

VANHOLDER R, DE SMET R, LESAFFER G. **p-Cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of uraemic toxicity.** Nephrol. Dial. Transplant. (1999)14 (12): 2813-2815.

VANHOLDER R, ARGILES A *et al.* **Uremic toxicity: present state of the art.** Int J Artif Organs, v.24, n.10, Oct, p.695-725. 2001.

VANHOLDER R, DE SMET R *et al.* **Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability.** Kidney Int, v.63, n.5, May, p.1934-43. 2003.

VANHOLDER R, VAN LAECKE S *et al.* **What is new in uremic toxicity?** Pediatr Nephrol, v.23, n.8, Aug, p.1211-21. 2008.

VANHOLDER R, BAMMENS B, DE LOOR H, GLORIEUX G, MEIJERS B, SCHEPERS E, MASSY Z, EVENEPOEL P. **Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin.** Nephrol Dial Transplant 0: 1–4. 2011.

VIEDT C, ORTH S. **Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the kidney: does it more than simply attract monocytes?** Nephrol Dial Transplant, v.17, n.12, Dec, p.2043-7. 2002.

VIEDT C, VOGEL, ATHANASIOU T, SHEN W, ORTH S, KÜBLER W, KREUZER J. **Monocyte Chemoattractant Protein-1 Induces Proliferation and Interleukin-6 Production in Human Smooth Muscle Cells by Differential Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Activator Protein-1.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:914-920.

VOLPE S, CAMERONI E, MOEPPS B, THELEN S, APUZZO T, *et al.* **CCR2 Acts as Scavenger for CCL2 during Monocyte Chemotaxis.** *PLoS ONE* 7(5): e37208 (2012).

WANG C, LU L, YU T, HUNG W, CHIU C, CHUNG F, YEH L, CHEN H, LEE Y, HOUNG J. **Serum levels of total p-cresylsulphate are associated with angiographic coronary atherosclerosis severity in stable angina patients with early stage of renal failure.** *Atherosclerosis* [2010, 211(2):579-583]

WANG C, ZHANG Y, YANG Q, YANG Y, GU Y, WANG M, WU K. **A novel cultured tissue model of rat aorta: VSMC proliferation mechanism in relationship to atherosclerosis.** *Exp Mol Pathol.* 2007 Dec;83(3):453-8.

WATANABE T, PAKALA R *et al.* **Monocyte chemotactic protein 1 amplifies serotonin-induced vascular smooth muscle cell proliferation.** *J Vasc Res*, v.38, n.4, Jul-Aug, p.341-9. 2001.

WINTHER M, KANTERS E, KRAAL G, HOFKER M. **Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;25(5):904-14. 2005.

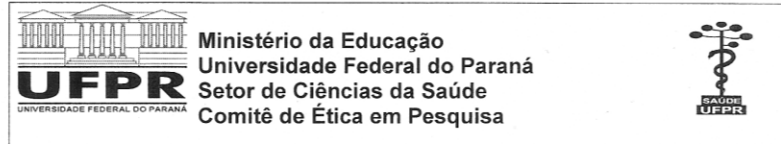
WESOLY J, SIKORSKI K, LEE C, BLUYSSSEN H. **Suppressor of cytokine signaling and accelerated atherosclerosis.** *Acta biochimica Polonica.* 01/2010; 57(3):251-60. 2010.

YANG X, CORIOLAN D, MURTHY V, SCHULTZ K, GOLENBOCK D, BEASLEY D. **Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1069–H1076, 2005.

YING Y, YANG K, LIU Y, CHEN Q, SHEN W, LU L, ZHANG R. **A uremic solute, P-cresol, inhibits the proliferation of endothelial progenitor cells via the p38 pathway.** *Circ J.* 2011;75(9):2252-9.

## APÊNDICES

### APÊNDICE I



Curitiba, 11 de outubro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Andréa Emília Marques Stinghen**  
**Rayana Ariane Pereira**  
**Roberto Pecoits-Filho**  
**Wesley Maurício de Souza**  
**Lígia Maria Claro**  
**Vanessa Ribeiro**  
**Liandra Kondrat**  
**Geison Tibera**

**Nesta**

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação da toxicidade urêmica (cresol e seus conjugados) na expressão de MCP-1 via ativação do NF-B em células musculares lisas humanas**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 29 de junho de 2011 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 11 de outubro de 2011.

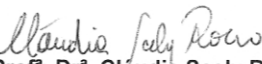
Registro CEP/SD: 1140.065.11.06

CAAE: 0063.0.091.000-11

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do 1º relatório parcial e/ou de conclusão: 11/04/2012.**

Atenciosamente

  
**Prof. Dr.ª Cláudia Seely Rocco**  
Coordenadora do Comitê de Ética em  
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

**Prof. Dr.ª Cláudia Seely Rocco**  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - SD/UFPR

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

## APÊNDICE II

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

Você, mulher em trabalho de parto, maior de 18 anos, que não apresenta pressão alta, sinais clínicos de inflamação, doença infecciosa, histórico de câncer, doenças auto-imunes, doenças do fígado, que não está usando medicamentos que baixam suas defesas (imunossupressores), que não tem histórico de abuso de álcool ou drogas ilícitas, está sendo convidada a participar dos estudos: “Avaliação da resposta inflamatória frente à toxicidade urêmica e expressão da citocina CXCL12 em pacientes com Doença Renal Crônica” e “Avaliação da toxicidade urêmica ( $p$ -cresol e seus conjugados) na expressão de MCP-1 via ativação do NF- $\kappa$ B em células musculares lisas humanas” e outras pesquisas correlatas. Para isto, estamos solicitando sua colaboração para que autorize a coleta do cordão umbilical, após o nascimento do seu bebê.

- (i) O objetivo desta pesquisa é avaliar, através das células obtidas do cordão umbilical o processo de inflamação, um processo que ocorre nos pacientes com Doença Renal Crônica, uma vez que seus rins não funcionam corretamente;
- (ii) Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor entendimento da Doença Renal Crônica e futuramente melhorar o diagnóstico da doença. Por isso, a utilização de células da veia do cordão umbilical poderá beneficiar outras pessoas portadoras da doença a um médio-longo prazo;
- (iii) A pesquisa não visa beneficiar diretamente a mãe e/ou seu bebê e sim os pacientes com Doença Renal Crônica;
- (iv) O cordão umbilical, que a princípio seria descartado, será cortado por seu/sua obstetra ou membro de sua equipe e somente após os procedimentos usuais de parto será utilizado, sem causar nenhum dano físico ou moral, a você ou a seu bebê;
- (v) Sua privacidade está garantida quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa;
- (vi) Você está cedendo e não vendendo o cordão umbilical, portanto não receberá nenhuma forma de pagamento por tal ato;
- (vii) Você poderá a qualquer momento em que a pesquisa estará sendo desenvolvida (março de 2012 a fevereiro de 2013) solicitar esclarecimentos sobre a pesquisa, tendo a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento - via telefone, via email ou até mesmo pessoalmente - sem penalização alguma e sem prejuízo;
- (viii) As pesquisadoras Andréa E. M. STINGHEN e Rayana Ariane Pereira podem ser encontradas na Universidade Federal do Paraná - Centro Politécnico, Jardim das Américas - Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Patologia Básica, sala 143A, pelo telefone: (41) 3361-1691 das 8:30 às 17:30 hrs, ou pelos emails: andreaSTINGHEN@ufpr.br e rayanaariane@ufpr.br, para esclarecer eventuais dúvidas a respeito da pesquisa;
- (ix) As células extraídas do cordão umbilical poderão ser armazenadas e utilizadas em outros estudos correlatos, de acordo com sua aceitação abaixo:
  - ( ) Aceito o armazenamento e a utilização de células do cordão umbilical em outros estudos correlatos;
  - ( ) Não aceito o armazenamento e a utilização de células do cordão umbilical em outros estudos correlatos.

Eu, \_\_\_\_\_, portadora do RG \_\_\_\_\_, manifesto aqui meu consentimento em doar o cordão umbilical e participar das pesquisas acima citadas, sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa E. M. Stinghen e sua orientada de pós-graduação Rayana Ariane Pereira, na Universidade Federal do Paraná, UFPR.

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

Dra. Andréa \_\_\_\_\_

Mestranda Rayana \_\_\_\_\_

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



## APÊNDICE III

## PRODUÇÃO RELACIONADA AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO:

1. Resumo publicado em formato de pôster no XXVIII Congresso Brasileiro de Nefrologia (2012), com o título: **“Papel da via PKC- $\beta$  na expressão de MCP-1 após exposição a produtos de glicação avançada (AGES)”**.
2. Resumo publicado com o título: **“Advanced glycation end products and MCP-1 expression by endothelial cell through PKC- $\beta$  pathway”** no *Abstract Supplement 2012 - Journal of the American Society of Nephrology (JASN)* e no *Kidney Week 2012 Program Builder* – Disponível no endereço eletrônico: <http://www.asn-online.org>
3. Aceite de publicação do manuscrito **“Evaluation of Uleine in Cellular Adhesion of Murine Melanoma (B16F-10) and Human Gastric Carcinoma Cells (KATO III and MKN)”** - *Latin American Journal of Pharmacy*, por Wesley M. Souza, Lisienny C. T. Rempel, Rayana A. P. Maciel, Cid A. M. Santos & Andréa E. M. Stinghen, conforme ANEXO I.
4. Submissão do manuscrito intitulado **“Soro urêmico inibe a expressão da quimiocina SDF-1: possível impacto da toxicidade urêmica na lesão endotelial”** por Vanessa R. Heidemann, Bruna Bosquetti, Lisienny C. T. Rempel, Rayana A. P. Maciel, Simone M. Gonçalves, Sérgio G. E. Bucharles, Roberto Pecoits-Filho, Rodrigo B. Oliveira & Andréa E. M. Stinghen, ao *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, conforme ANEXO II.
5. Submissão do resumo intitulado como: **“p-cresol (PC) and p-cresyl sulfate (PCS) stimulate chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human vascular smooth muscle cells (VSMC)”** - *Kidney Week 2013, American Society of Nephrology (ASN)*.

**ANEXOS**

## ANEXO I

## CARTA DE ACEITE DE PUBLICAÇÃO DE MANUSCRITO:

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

May 18th, 2013

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

Dear author:

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

Many thanks for your interest in our journal.

Reviewer's comments:

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

Yours sincerely,

Prof. Néstor O. Caffini, Editor

Latin American Journal of Pharmacy

E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

## ANEXO II

## CARTA DE SUBMISSÃO DE PUBLICAÇÃO DE MANUSCRITO:

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

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

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

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

Obrigado por submeter seu trabalho no Jornal Brasileiro de Nefrologia.

Atenciosamente,

Dr. João Egídio Romão Junior

Editor

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