

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAÍRA BARBOSA E REIS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OAT1 E OAT3 E PRODUÇÃO DE MCP-1
POR CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS NA PRESENÇA DE TOXINAS
URÊMICAS (*p*-CRESOL E *p*-CRESILSULFATO)

CURITIBA
2015

MAÍRA BARBOSA E REIS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OAT1 E OAT3 E PRODUÇÃO DE MCP-1 POR
CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS NA PRESENÇA DE TOXINAS URÊMICAS (*p*-
CRESOL E *p*-CRESILSULFATO)

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor da Saúde,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza.

CURITIBA
2015

Reis, Máira Barbosa e

Avaliação da expressão de OAT-1 e OAT 3 e produção de MCP – 1 por células endoteliais humanas na presença de toxinas urêmicas (*p* – Cresol e *p* – Cresilsulfato) / Máira Barbosa e Reis – Curitiba, 2015.

69 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Wesley Maurício de Souza

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Doença renal crônica. 2. Toxicidade urêmica. 3. *p* -Cresol. 4. *p* – Cresilsulfato. 5. OAT 1. 6. OAT 3. 7. Probenecida. 8. MCP – 1. I. Souza, Wesley Maurício de. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.61

TERMO DE APROVAÇÃO

MAÍRA BARBOSA E REIS

Título: "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE OAT-1 E OAT-3 POR CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS NA PRESENÇA DE TOXINAS UREMICAS (P-CRESOL E P-CRESILSULFATO) E PRODUÇÃO MCP-1"

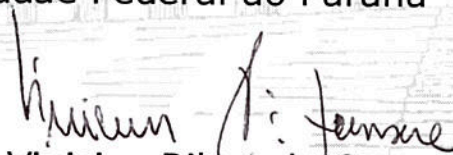
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof. Dr. Wesley Mauricio de Souza
Orientador



Prof. Dr. Sandro Germano
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Vinicius Ribas de Carvalho Duarte Fonseca
Universidade Positivo

Curitiba, 13 de março de 2015.

Dedico este trabalho à minha família, aos meus amigos e ao meu amor.
Graças a vocês, e por vocês, sou uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF - pela oportunidade e desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - pelo apoio financeiro.

Aos docentes do PPGCF-UFPR, em especial à professora Márcia Helena Mendonça, por mostrar a Biologia Celular de forma tão didática, graciosa e fascinante.

Ao professor Roberto Pontarolo, pela disponibilidade e paciência. Pelo apoio e incentivo constantes. Pelos preciosos conselhos e por acreditar na minha capacidade.

À professora Andréa Stinghen, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por um dia ter me recebido em seu laboratório e me ceder materiais e reagentes sem os quais a realização do presente trabalho seria impossível.

Ao professor Wesley Maurício de Souza pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às professoras Larissa Magalhães Alvarenga e Juliana Ferreira de Moura pelas contribuições intelectuais e materiais.

Ao Professor Guilherme Ianzi Sasaki, pelas análises por RMN.

À Maria da Graça Toledo, a Gracinha, pelo auxílio nas análises por CLAE e pela simpatia.

Às lindas Alessandra Finco e Rafaela Fogaça, pela amizade, pelo carinho e cuidado. Por estarem sempre ao meu lado em cada riso e cada lágrima. Ale, você foi minha verdadeira orientadora. À Bruna Bosquetti, pelo companheirismo, conselhos e ensinamentos. E aos outros queridos amigos do Labnefro, do Limq e do PPGCF, Giane, Paulo e Regiane; Carla, Isabel e Sabrina; Jaqueline e Maislian. Por tornarem meu dia-a-dia mais agradável.

À Cláudia Dumans Guedes, minha fada madrinha desde a graduação. Por me ser uma eterna figura de inspiração. Pelo afeto e torcida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais pelo exemplo de caráter, pelo amor, apoio psicológico e financeiro. À minha mãe Cristina, meu anjo da guarda e minha entusiasta, que caminha de mãos dadas comigo por todos os meus sonhos. Ao meu pai Marcos, por ser a voz da razão nessa caminhada.

Ao meu sobrinho Matias, que me ensinou o que é a alegria na sua forma mais sublime e que abençoou nossa família com uma nova e maravilhosa perspectiva de vida.

Aos meus irmãos Mateus e Daniel, pelo amor, amizade e cumplicidade infinitos. À minha mãedrinha Solange, pelo amor incondicional.

Aos inesquecíveis, para sempre amados e saudosos Olga, Ereny e João (*in memoriam*).

À Alice, *la mia artista e poeta preferita, il pezzo di me che abita in Italia.*

Ao Rafa, por esses quinze anos de amor fraterno e amizade incondicional. Pelas infinitas conversas sobre tudo e sobre o nada.

Aos amigos de longa data, da adolescência e da graduação. Distantes fisicamente, porém habitantes eternos do meu coração: Ana, Anna Paula, Bruna, Gustavo, Joana, João Francisco, João Marcos, Mônica, Nunu, Paula, Raoni, Roberta, Rosyelle e Vivian.

A todos os amigos que fizeram de Curitiba uma cidade aprazível e acolhedora. Em especial aos meus queridos conselheiros para assuntos acadêmicos, André, Fabrício e Hilton. À Ana, minha leonina preferida, meu oráculo e meu manual de culinária, estilo e glamour. À Sandra, minha companheira de almoço, de espiritualidade e afeto puro. Ao Pedro, meu irmão, meu pai e meu filho. A Fabi e Almir, pela simpatia e carinho com que me apresentaram a essa família, que hoje, com muito orgulho, sinto-me integrada.

Ao meu amor, Giorgio, pelo zelo e apoio, por me amar e me fazer tão feliz.

“Para contarte, canto / Quiero que sepas / Cuánto me haces bien / Me haces bien / Me haces bien / Te quiero de mil modos / Te quiero sobre todo / Me haces bien / Me haces bien / Me haces bien / Basta ver el reflejo de tus ojos en los míos / Como se lleva el frío / Para entender / Que el corazón no miente / Que afortunadamente / Me haces bien / Me haces bien / Me haces bien”

Jorge Drexler

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais retorna ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) atinge todas as faixas etárias e atualmente é considerada um problema de saúde pública, devido ao constante aumento de sua incidência. O acúmulo de substâncias orgânicas, devido ao comprometimento da excreção renal, ocasiona diversos efeitos deletérios como a inflamação, a progressão da aterosclerose e consequente doença cardiovascular, principal causa de morte nesses pacientes. O *p*-cresol (PC) e seu conjugado *p*-cresilsulfato (PCS) são toxinas urêmicas que se ligam a proteínas plasmáticas e por isso não são facilmente dialisadas. A presença de tais toxinas pode desencadear a produção de várias moléculas pró-inflamatórias, como a quimiocina *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), primordial nos eventos que precedem a aterosclerose. OAT 1 e OAT 3 (do inglês, *organic anion transporter*) são transportadores reconhecidamente importantes na excreção renal de xenobióticos através da secreção tubular. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi a investigação *in vitro* da influência do PC e PCS na produção de MCP-1 e na expressão destes transportadores em células endoteliais humanas. Como modelo experimental foram utilizadas células da linhagem EA.hy926, cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) e antimicrobianos. As células foram submetidas a ensaios com as toxinas nas concentrações normal, urêmica e urêmica máxima, sugeridas pelo *European Uremic Toxins Work Group* (EUTox). As dosagens de MCP-1 foram realizadas através do ensaio de ELISA direto em sobrenadantes de cultura coletados 0, 3 e 6 horas após os tratamentos. A expressão de OAT 1 e OAT 3 foi avaliada através da técnica de Dot Blot, realizada com extratos proteicos de células tratadas com PC e PCS. Estes ensaios foram realizados na presença e ausência do inibidor de transportadores de ânions orgânicos, o Probenecida (Pb). Os resultados obtidos demonstram que a produção de MCP-1 respondeu aos tratamentos de forma dose e tempo dependente, obtendo picos de produção no tempo 6h, na concentração máxima urêmica do PC (646 pg/mL) e na concentração urêmica do PCS (435 pg/mL). No tempo 0h, o Pb suprimiu a produção de MCP-1 consideravelmente em todos os tratamentos, com taxas de inibição de 71%, 66% e 71% nos tratamentos com PC e 58%, 56% e 60% nos tratamentos com PCS na concentração normal, urêmica e urêmica máxima, respectivamente. No tempo 6h foi observada uma taxa de inibição de 37% e 32% nos tratamentos com PC e 36% e 46% nos tratamentos com PCS na concentração urêmica e urêmica máxima, respectivamente. A expressão de OAT 1 nos tratamentos controle, PC e PCS nas concentrações máximas urêmicas foi suprimida por Pb com taxa de inibição de 30%, 23% e 12%, respectivamente. A expressão de OAT 3 nos tratamentos controle, PC e PCS foi suprimida por Pb com taxa de inibição de 45%, 2% e 32%, respectivamente. Como conclusão, os dados obtidos no presente trabalho sugerem que, em células endoteliais humanas, o OAT1 se expressa duas vezes mais que OAT 3. E que, considerando-se a resposta celular relacionada à produção de MCP-1, o OAT 1 tem preferência pelo PC como substrato, enquanto o OAT 3 tem mais afinidade pelo PCS.

Palavras chave: doença renal crônica; toxicidade urêmica; *p*-cresol; *p*-cresilsulfato; OAT 1; OAT 3; Probenecida; MCP-1.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) affects all age and is currently considered a public health problem, due to the constant increase in incidence. The accumulation of organic substances due to the impairment of renal excretion causes many deleterious effects such as inflammation, progression of atherosclerosis and subsequent cardiovascular disease, the mainly cause of death in CKD patients. *p*-cresol (PC) and its conjugate *p*-cresilsulfato (PCS) are uremic toxins difficult to eliminate by conventional dialysis due to strong bind to plasma proteins. The high presence of such toxins can trigger the production of various proinflammatory molecules such as chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which is overriding in the events preceding atherosclerosis. OAT1 and OAT3 (organic anion transporter) are known to be important carriers in the renal excretion of xenobiotics by tubular secretion. Thus, the objective of this study was the *in vitro* investigation of the PC and PCS influence on the production of MCP-1 and expression of these transporters and on human endothelial cells. As an experimental model, we used the human endothelial cell line EA.hy926 cultured in DMEM supplemented with fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. The cells were subjected to tests with the toxins in normal, uremic and maximum uremic concentrations, suggested by the European Uremic Toxins Work Group (EuTox). The levels of MCP-1 were evaluated in culture supernatants collected 0, 3 and 6 hours after treatment through ELISA. The expression of OAT 1 and OAT 3 was evaluated through Dot Blot, performed with protein extracts from cells treated with PC and PCS. These assays were performed in the presence and absence of the organic anion transporters inhibitor Probenecid (Pb). The results shown that the secretion of MCP-1 responded to the treatment in a dose and time dependent pattern, resulting in production peaks at 6h in PC maximum uremic concentration (646 pg/ml) and PCS uremic concentration (435 pg / ml). At 0h, Pb suppressed the production of MCP-1 significantly in all treatments, with inhibition rates of 71%, 66% and 71% in treatments with PC and 58%, 56% and 60% in treatments with PCS on the normal, uremic and maximum uremic concentrations, respectively. At 6h, an inhibition rate of 37% and 32% was observed in treatments with PC and 36% and 46% in treatments with PCS in uremic and maximum uremic concentration, respectively. The expression of the OAT 1 in the control, PC and PCS treatments under uremic maximum concentration was suppressed by Pb with a inhibition rate of 30%, 23% and 12%, respectively. The expression of the OAT 3 in the control, PC and PCS treatments under uremic maximum concentration was suppressed by Pb with a inhibition rate of 45%, 2% and 32%, respectively. As a conclusion, the data of the present study suggest that, in human endothelial cells, OAT1 is expressed two times more than OAT 3. And, considering the cell response related to the production of MCP-1, PC is the substrate for OAT 1 and OAT 3 has more affinity for PCS.

Key-words: chronic kidney disease; uremic toxicity; *p*-cresol; *p*-cresilsulfate; OAT 1; OAT 3; Probenecid; MCP-1.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ANATOMIA SIMPLIFICADA DO RIM E DO NÉFRON.....	18
FIGURA 2	PROCESSOS ENVOLVIDOS NA EXCREÇÃO RENAL.....	19
FIGURA 3	SÍTIOS DE LIGAÇÃO DAS TOXINAS UREMICAS NA ALBUMINA.....	24
FIGURA 4	ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FORMAÇÃO DOS SOLUTOS DE RETENÇÃO URÊMICA A PARTIR DO METABOLISMO NO TRATO GASTROINTESTINAL E ROTA BIOSINTÉTICA DO PC E PCS.....	25
FIGURA 5	RELAÇÃO ENTRE A DOENÇA RENAL CRÔNICA E A DOENÇA CARDIOVASCULAR.....	26
FIGURA 6	FORMAÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA.....	28
FIGURA 7	SECREÇÃO DE MCP-1 POR CÉLULAS DO ENDOTÉLIO E MÚSCULO LISO PROMOVEM O RECRUTAMENTO DE MONÓCITOS PARA A CAMADA SUBENDOTELIAL.....	29
FIGURA 8	MODELO DE SECREÇÃO DE ÂNIONS ORGÂNICOS PELAS CÉLULAS DO TÚBULO PROXIMAL.....	32
FIGURA 9	REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DO OAT.....	33
FIGURA 10	ESTRUTURA DO Pb.....	34
FIGURA 11	SÍNTESE DO PCS.....	38
FIGURA 12	ESPECTRO DE RMN 1H DO PCS SINTETIZADO.....	45
FIGURA 13	ESPECTRO DE RMN 1H DO PCS.....	46
FIGURA 14	CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS PCS SINTETIZADO E DO PRECURSOR PC.....	47
FIGURA 15	VIABILIDADE DA LINHAGEM EA.HY926 ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT, APÓS TRATAMENTO COM PC NAS CONCENTRAÇÕES NORMAL, URÊMICA E URÊMICA MÁXIMA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PB.....	48

FIGURA 16	VIABILIDADE DA LINHAGEM EA.HY926 ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT, APÓS TRATAMENTO COM PCS NAS CONCENTRAÇÕES NORMAL, URÊMICA E URÊMICA MÁXIMA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PB.....	49
FIGURA 17	EXPRESSÃO DE OAT 1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926.....	50
FIGURA 18	EXPRESSÃO DE OAT 3 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926.....	51
FIGURA 19	EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926, GRUPOS CONTROLE NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE PB.....	52
FIGURA 20	DOSAGEM DE MCP-1 EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926, APÓS TRATAMENTO COM PC E PB.....	53
FIGURA 21	DOSAGEM DE MCP-1 EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926, APÓS TRATAMENTO COM PCS E PB.....	55
FIGURA 22	ANALISE COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DE MCP-1. ANALISE COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DE MCP-1. TRATAMENTOS COM PC E PCS NA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA UREMICA E NO TEMPO 6H; PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO CONTROLE....	57
FIGURA 23	CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 E A PRODUÇÃO DE MCP-1.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	<i>BOVINE SERUM ALBUMIN</i>
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
DCV	DOENÇA CARDIOVASCULAR
DRC	DOENÇA RENAL CRÔNICA
DMEM	<i>DULBECCOS MODIFIED EAGLE MEDIUM</i>
ECL	<i>ELECTROCHEMILUMINESCENCE</i>
ELISA	<i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i>
EUTOX	<i>EUROPEAN UREMIC TOXIN WORK GROUP</i>
HASMC	<i>HUMAN AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS</i>
HRP	<i>HORSERADISH PEROXIDASE</i>
HUVEC	<i>HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELL</i>
IS	INDOXIL SULFATO
KDOQI	<i>KIDNEY DISEASE OUTCOME QUALITY INITIATIVE</i>
MCP-1	<i>MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN - 1</i>
MTT	3-[4,5-DIMETILTIAZOL-2IL]-2,5-DIFENIL-2H TETRAZOLATO DE BROMO
OAT	<i>ORGANIC ANION TRANSPORTER</i>
PB	PROBENECIDA
PBS	SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM FOSFATO
PC	<i>p</i> -CRESOL
PCS	<i>p</i> -CRESIL SULFATO
PKC	PROTEÍNA QUINASE C
PM	PESO MOLECULAR
RIPA	RADIO-IMMUNOPRECIPITATION ASSAY
RMN	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR
ROS	<i>REACTIVE OXYGEN SPECIES</i>
SFB	SORO FETAL BOVINO
TFG	TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR
TMB	3,3',5,5'-TETRAMETILBENZIDINA
TI	TAXA DE INIBIÇÃO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	FUNÇÃO RENAL.....	18
2.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	20
2.3	TOXINAS UREMICAS.....	22
2.4	PC E PCS.....	25
2.5	MCP-1.....	28
2.6	TRANSPORTADORES DE IONS ORGANICOS.....	31
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	SINTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS PCS.....	38
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PC E PCS.....	39
4.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PB.....	39
4.4	CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DA LINHAGEM EA.hy926.....	40
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT.....	40
4.6	ANALISE DA EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 POR DOT BLOT.....	41
4.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1 ATRAVÉS DO ENSAIO DE ELISA DIRETO.....	42
4.8	ANALISE ESTATISTICA.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO PCS SINTETIZADO.....	45
5.2	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	48
5.3	ANALISE DA EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3.....	49
5.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MCP-1.....	53
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) atinge todas as faixas etárias e é considerada atualmente um problema de saúde pública, devido ao constante aumento de sua incidência (DUTRA *et al.*, 2014). Segundo o último censo realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (2013), estima-se que o número de pacientes em tratamento dialítico no Brasil dobrou nos últimos dez anos. A DRC pode ser basicamente definida como a perda progressiva e irreversível da capacidade dos rins de filtrar o sangue e assim eliminar substâncias orgânicas exógenas e endógenas do organismo. Estas moléculas, em sua maioria resíduos do metabolismo dos alimentos, vão então se acumulando no organismo, sendo neste cenário denominadas solutos de retenção urêmica ou de toxinas urêmicas, quando exercem efeito deletério sobre as funções orgânicas. Este quadro, caracterizado como estado urêmico, afeta as funções fisiológicas de praticamente todos os órgãos e sistemas, uma vez que a composição e o volume dos fluidos corporais são alterados pela retenção de metabólitos tóxicos (NEIRYNCK *et al.*, 2013).

Várias células estão envolvidas na resposta celular relacionada ao estado urêmico, dentre elas as células endoteliais. Estudos recentes demonstraram que a ação das toxinas urêmicas nestas células pode levar ao aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias, tais como quimiocinas e moléculas de adesão, e assim contribuir para a iniciação e propagação da doença cardiovascular, principal causa de morte em pacientes com DRC (STINGHEN *et al.*, 2009).

Os solutos de retenção urêmica pertencentes à classe caracterizada pela ligação a proteínas plasmáticas não são facilmente removíveis através dos processos convencionais de diálise. Embora a grande maioria deles tenha baixo peso molecular, o complexo resultante da ligação soluto-proteína forma uma molécula grande demais para atravessar os poros das membranas, sendo difundida apenas a pequena parcela que se mantém na forma livre (LEKAWANVIJIT *et al.*, 2012; JOURDE-CHICHE *et al.*, 2009). Os estudos indicam que o *p*-cresol (PC) e o *p*-cresil sulfato (PCS) contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, afetando células do endotélio e músculo liso, também os leucócitos e plaquetas de pacientes DRC. Tais dados sugerem que estas toxinas podem ser diretamente responsáveis pelo aumento da morbidade cardiovascular desses pacientes (BRETTSCHEIDER *et al.*, 2013).

O MCP-1 (do inglês, *Monocyte Chemoattractant Protein - 1*) tem sido apontado como grande mediador da inflamação crônica nos vasos sanguíneos de pacientes com DRC, promovendo a formação da placa aterosclerótica. Por este motivo, atualmente o MCP-1 tem sido considerado um importante marcador de inflamação vascular (KOLATTUKUDY e NIU, 2012; ELMARAKBY e SULLIVAN, 2012).

A família OAT (do inglês, *Organic Anion Transporter*) representa a principal via secretória renal de ânions orgânicos e também está envolvida na distribuição destes pelo corpo, nas interações medicamentosas e na toxicidade de substâncias, como as drogas nefrotóxicas e as toxinas urêmicas (LUNGKAPHIN *et al.*, 2012). De fato, a maioria das toxinas urêmicas de baixo PM, como o PC e o PCS, contribuem muito pouco para a filtração glomerular, mas substancialmente para a secreção tubular (MIYAMOTO *et al.*, 2011). Neste contexto, o presente trabalho supõe que tais transportadores estariam envolvidos no transporte destas toxinas não só em células dos túbulos renais, como também no endotélio vascular.

Desta forma, o presente trabalho busca uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta celular mediada por PC e PCS, objetivando contribuir para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na toxicidade urêmica e suas consequências cardiovasculares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FUNÇÃO RENAL

O sistema urinário é composto pelos rins, a pelve renal, os ureteres, a bexiga e a uretra. Cada rim possui aproximadamente 1,2 milhão de néfrons, que são suas unidades funcionais e estruturais, capazes de filtrar e formar a urina de forma independente uns dos outros. Cada néfron, por sua vez, é constituído pela cápsula de Bowman, o glomérulo e um longo túbulo que desemboca nos ductos coletores (GUYTON E HALL, 2011) (FIGURA 1).

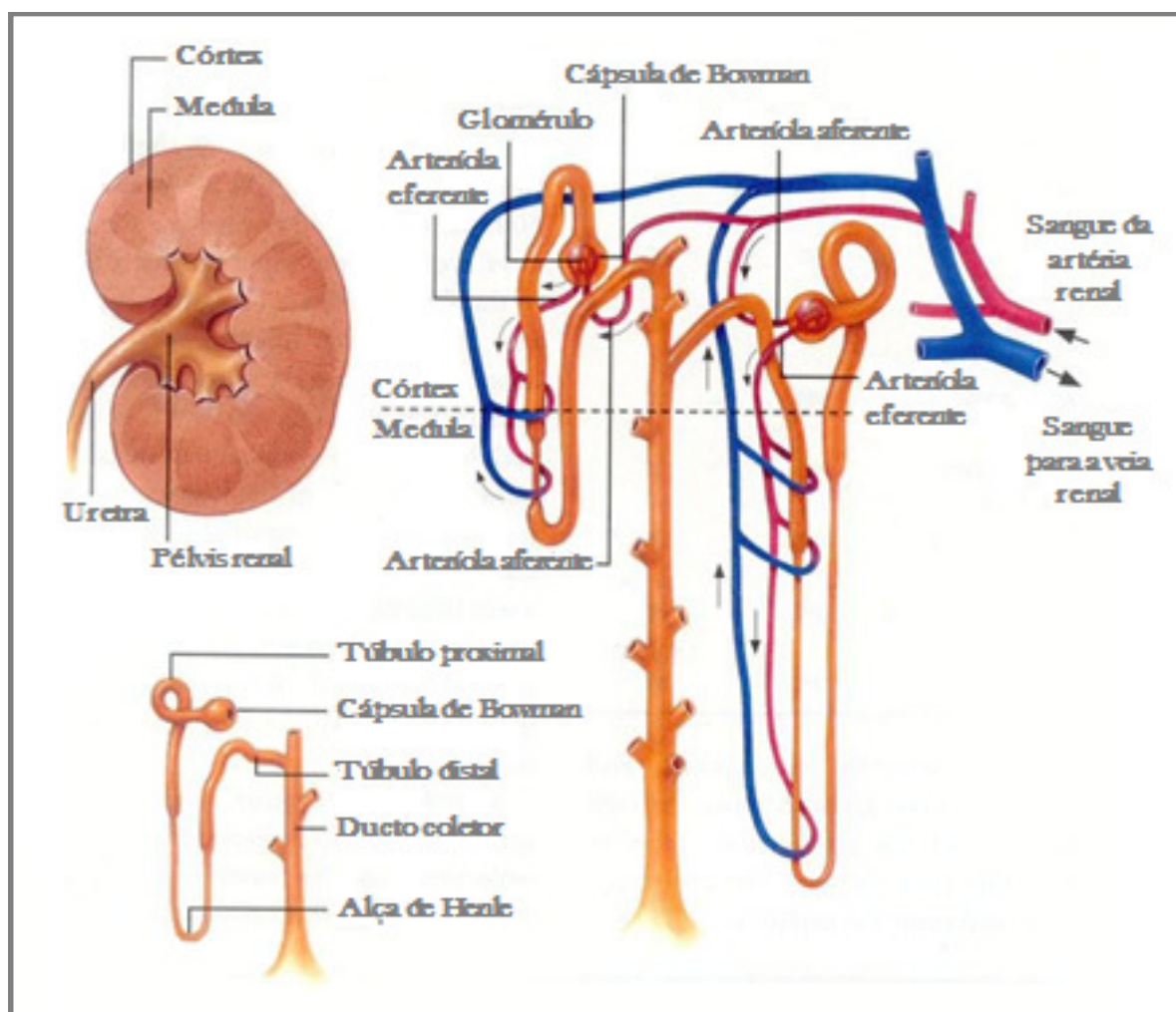


FIGURA 1 – ANATOMIA SIMPLIFICADA DO RIM E DO NÉFRON.
FONTE: GANONG (2012), ADAPTADO PELA AUTORA

A excreção das mais diversas substâncias na urina representa a soma de três processos renais: a filtração glomerular, a reabsorção de substâncias dos túbulos renais para o sangue dos capilares peritubulares e a secreção de substâncias do sangue dos capilares peritubulares para os túbulos (FIGURA 2). A reabsorção e a secreção dos vários solutos através do epitélio renal são feitas por mecanismos específicos, passivos ou ativos, localizados nas membranas da célula tubular (GUYTON E HALL, 2011).

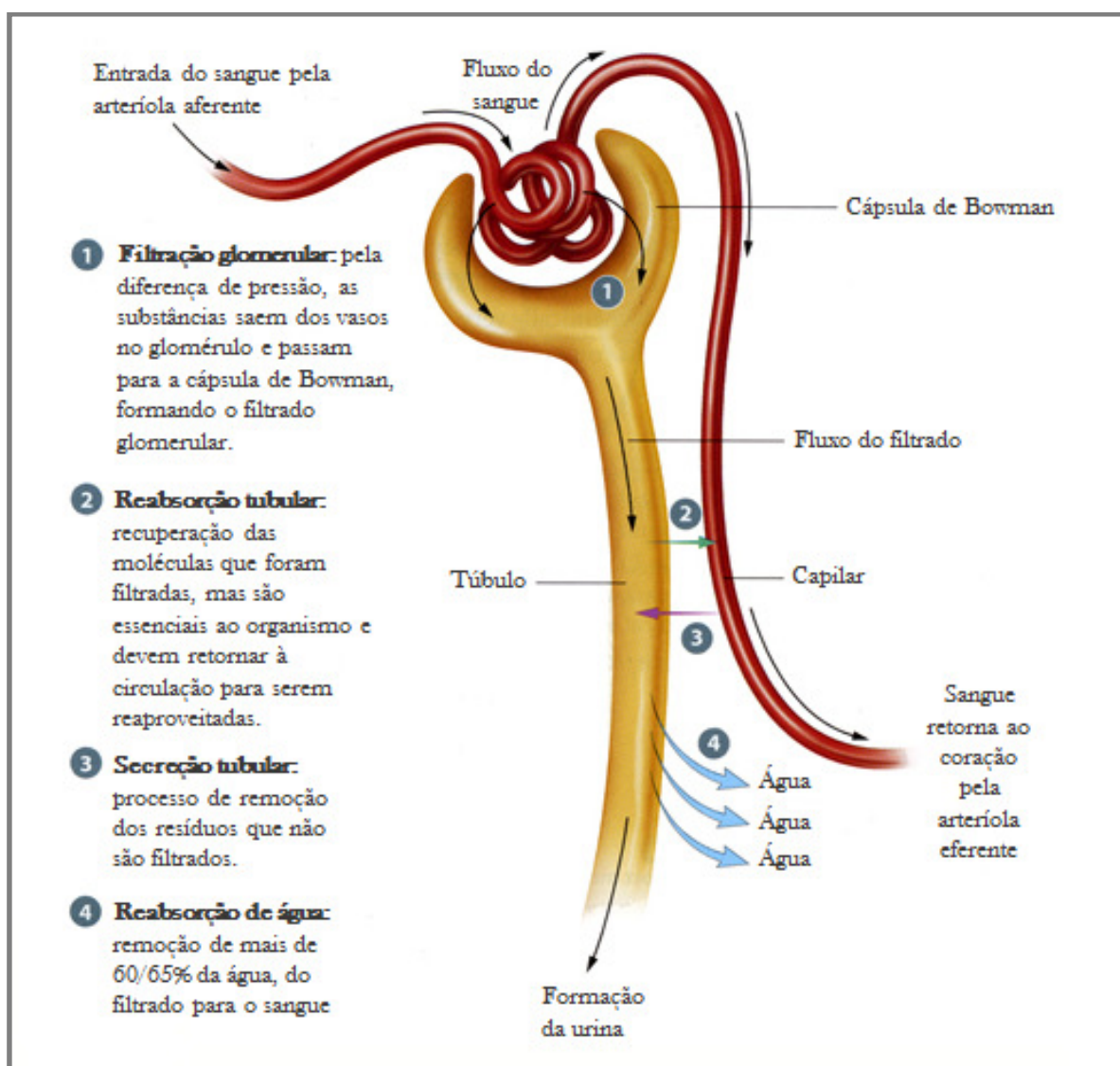


FIGURA 2 – PROCESSOS ENVOLVIDOS NA EXCREÇÃO RENAL.
FONTE: GANONG (2012), ADAPTADO PELA AUTORA

2.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A Doença Renal Crônica (DRC) atinge todas as faixas etárias e atualmente é considerada um problema de saúde pública, devido ao constante aumento de sua incidência (DUTRA *et al.*, 2014). Segundo dados do último censo realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, o número estimado de pacientes em tratamento dialítico no Brasil aumentou de 42.695 para 100.397, entre 2000 e 2013 (SBN, 2013).

A definição mundialmente mais aceita e utilizada para o diagnóstico da DRC, proposta pela *Kidney Disease Outcome Quality Initiative* (KDOQI), se baseia em três componentes: um componente anatômico ou estrutural (marcadores de dano renal), um componente funcional, baseado na taxa de filtração glomerular (TFG) e um componente temporal. Assim sendo, é portador de DRC qualquer indivíduo que, independente da causa, apresente $TFG < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ou a $TFG > 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ associada a pelo menos um marcador de dano renal parenquimatoso presente há pelo menos 3 meses. O marcador de dano renal mais frequentemente utilizado é a proteinúria (ou albuminúria), mas outras alterações no sedimento urinário, histopatológicas ou estruturais, evidenciadas através de exames de imagens ou biópsias renais, também servem para este fim de diagnóstico. (BASTOS E KIRSZTAJN, 2011; KDOQI, 2002) De acordo com esta definição, a DRC também pode ser classificada em estágios, conforme descrito na TABELA 1.

TABELA 1 – ESTADIAMENTO DA DRC

Estágio	TFG (mL/min/1,73m²)	Dano renal
1	≥90	Presente
2	60-89	Presente
3	30-59	Presente ou ausente
4	15-29	Presente ou ausente
5	<15	Presente ou ausente

FONTE: KDOQI (2002)

Considerando a fisiopatologia, a DRC pode surgir devido a uma variedade de insultos à função renal. No entanto, apesar da ampla gama de processos patológicos que podem induzir a lesão renal, a perda substancial de néfrons provoca uma síndrome caracterizada clinicamente por um quadro de hipertensão arterial sistêmica, proteinúria e um declínio progressivo na taxa de filtração glomerular (TFG) e patofisiologicamente por fibrose intersticial progressiva, perda de capilares peritubulares com hipóxia e destruição de néfrons devido à atrofia tubular (EDDY, 2005). No Brasil, as principais etiologias da DRC em estágio 5 são a nefrosclerose hipertensiva e nefropatia diabética (VARELA e PECOITS, 2006).

O dano permanente e progressivo compromete a capacidade dos rins de eliminar substâncias orgânicas, exógenas e endógenas, do sangue para a urina. Estas moléculas, em sua maioria, resíduos do metabolismo dos alimentos, vão então se acumulando no organismo. Neste cenário, estes compostos passam a ser denominados solutos de retenção urêmica ou, quando exercem efeito negativo sobre as funções biológicas, toxinas urêmicas. E este quadro é caracterizado como estado urêmico, ou uremia (literalmente, “urina no sangue”) (LUNGKAPHIN *et al.*, 2006; BOELAERT *et al.* 2013, MEIJERS *et al.*,2014; BARRETO *et al.*, 2014).

Desta forma, o estado urêmico afeta as funções fisiológicas de praticamente todos os órgãos e sistemas, uma vez que a composição e o volume dos fluidos corporais são alterados pela retenção de metabólitos tóxicos (NEIRYNCK *et al.*, 2013). Já foram descritos inúmeros efeitos deletérios decorrentes da uremia. Dentre outros, cita-se: anemia, atrofia dérmica, polineurite, osteodistrofia renal, hiperparatireoidismo, pericardite, resistência à insulina, desordens de coagulação, falência cardíaca, anorexia, desnutrição, hipertensão, disfunção imune, inflamação e doenças cardiovasculares (DCV) (VANHOLDER *et al.*, 2008).

2.3 TOXINAS URÊMICAS

As toxinas urêmicas não podem ser definidas simplesmente como substâncias presentes nos fluidos corporais do paciente urêmico, sendo necessária a evidencia de uma relação entre a substância tóxica e um ou mais aspectos clínicos ou patológicos da síndrome urêmica. Para estabelecer esta relação e, portanto, ser classificada como uma toxina urêmica, a substância deve obedecer aos seguintes critérios:

- Ser quimicamente identificada e dosada de forma precisa;
- Os níveis plasmáticos/corporais totais deverão ser mais altos em indivíduos urêmicos do que em não-urêmicos;
- Correlação entre altas concentrações e disfunções/sintomas específicos, que desapareçam à medida que as concentrações são reduzidas; Atividade biológica comprovada em estudos *ex vivo*, *in vivo* ou *in vitro*, que demonstrem concentrações experimentais compatíveis com aquelas encontradas nos fluidos corporais ou tecidos de pacientes urêmicos. (GLASSOCK 2008; BARRETO *et al.*, 2014). As pesquisas do Grupo de Trabalho Europeu em Toxinas Urêmicas (EUTox) contribuíram substancialmente para a aceitação do conceito e da demonstração do papel das toxinas urêmicas. No momento, seu banco de dados (<http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>) conta com uma lista de 152 solutos de retenção urêmica identificados e divididos em 3 classes, de acordo com suas características físico-químicas e remoção por diálise (BARRETO *et al.*, 2014) (TABELA 2).

TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS SOLUTOS DE RETENÇÃO URÊMICA

Classificação	Características	Toxicidade
Moléculas pequenas, solúveis em água	Peso molecular < 500 Da; facilmente removíveis por diálise	Não necessariamente tóxicas
Moléculas médias	Peso molecular < 500 Da	Afetam um grande número de órgãos e sistemas
Moléculas ligadas a proteínas	Geralmente de baixo peso molecular; difíceis de remover por diálise	Afetam um grande número de órgãos e sistemas

FONTE: VANHOLDER *et al.* 2003; VANHOLDER *et al.*, 2008.

Os solutos de retenção urêmica pertencentes à classe caracterizada pela ligação a proteínas plasmáticas não são facilmente removíveis através dos processos convencionais de diálise. Embora a grande maioria deles tenha baixo peso molecular (PM), o complexo resultante da ligação soluto-proteína forma uma molécula grande demais para atravessar os poros das membranas, sendo difundida apenas a pequena parcela que se mantém na forma livre (LEKAWANVIJIT *et al.*, 2012; JOURDE-CHICHE *et al.*, 2009).

Estudos anteriores com a albumina do soro humano (PM 68 kDa), a proteína mais abundante no plasma e que apresenta afinidade por uma variedade de compostos endógenos e exógenos (CHUANG, 2006), já comprovaram que esta proteína se liga aos dois solutos de retenção urêmica em foco no presente trabalho, o *p*-cresol (PC) e seu derivado sulfatado, o *p*-cresil sulfato (PCS) (LESAFFER *et al.*, 2000; MEIJERS *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2005; BARRETO *et al.*, 2014).

O primeiro estudo a investigar a afinidade de ligação do PC e PCS pela albumina, especificamente, foi realizado por Bergé-Lefranc *et al.* (2010), através de técnicas microcalorimetria. Embora tenham encontrado uma afinidade pela albumina de moderada a baixa, o que pode ser discutido em relação à metodologia empregada e às concentrações utilizadas das toxinas, os resultados demonstraram que essas duas toxinas se ligam à albumina envolvendo interações do tipo van der Waals e que o sítio de ligação seria o mesmo ou muito próximo.

Em um outro estudo, Watanabe *et al.* (2012) também investigaram as características da ligação do PCS à albumina utilizando técnicas de ultrafiltração e sondas fluorescentes e demonstraram que existem dois sítios de ligação para o PCS na albumina, um de baixa e outro de alta afinidade, denominado sítio II (FIGURA 3), e que o PCS compete por estes sítios com outra toxina urêmica, o indoxil sulfato (IS). Ao contrário da pesquisa anterior, a taxa de ligação do PCS a albumina neste estudo foi de 90%, sob condições que reproduziam os estágios 4 e 5 da DRC.

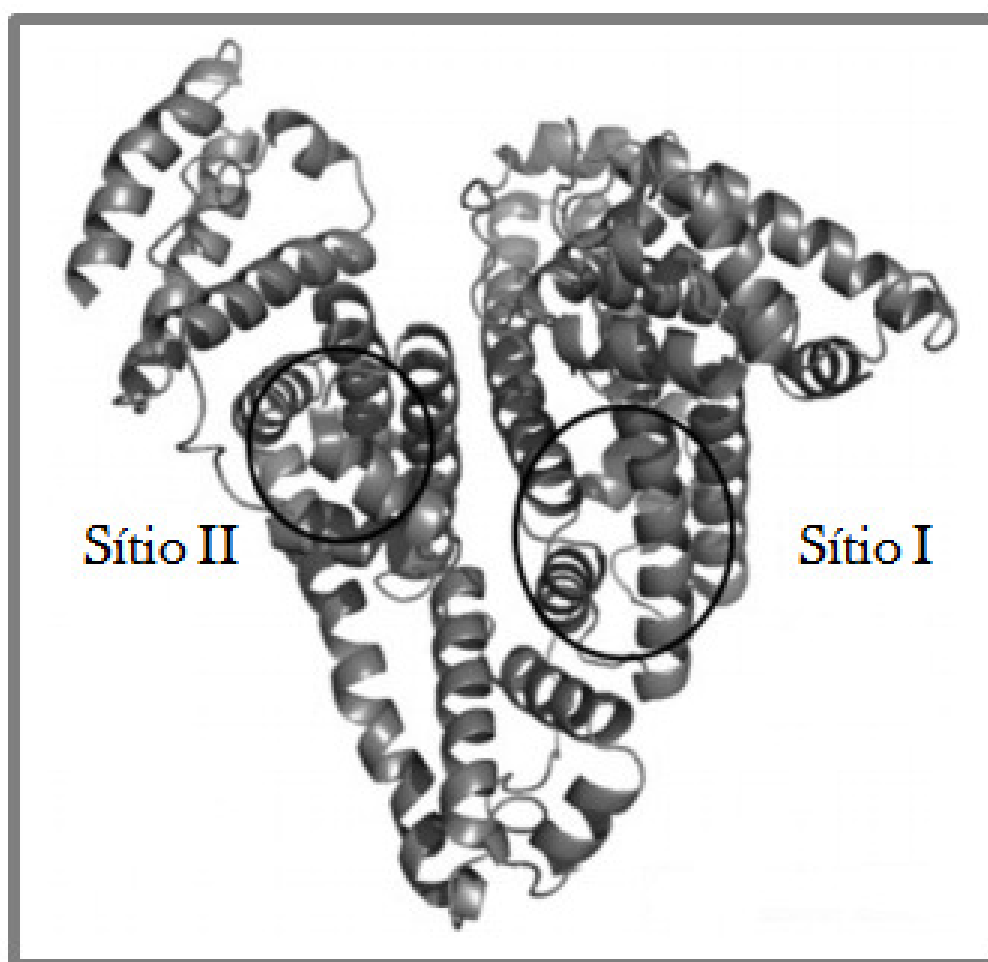


FIGURA 3 – SÍTIOS DE LIGAÇÃO DAS TOXINAS UREMICAS NA ALBUMINA
FONTE: WATANABE *et al.* (2012), ADAPTADO PELA AUTORA

A seguir Vieane *et al.* (2013) utilizaram-se de ultrafiltração, diálise de equilíbrio e modelos teóricos para analisar a ligação da albumina às mesmas toxinas do estudo anterior. Os resultados deste estudo confirmaram as altas taxas de ligação do PCS ao sítio de maior afinidade e ainda sugerem que a albumina é de fato o principal carreador do PCS, tanto em indivíduos saudáveis com em pacientes dialíticos.

2.4 P-CRESOL E P-CRESIL SULFATO

O PC (C_7H_8O , PM 108 Da) é produto da fermentação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina pela microbiota bacteriana no intestino grosso. Esses aminoácidos são oriundos da dieta proteica e metabolizados a ácido 4-hidroxifenilacético, que depois é descarboxilado, gerando o PC. Através de processos de conjugação/sulfatação realizados por uma sulfotransferase citoplasmática durante sua passagem pela mucosa do cólon e do fígado, o PC é convertido a PCS ($C_7H_8O_4S$, PM 187 Da) (FIGURA 4) (JOURDE-CHICHE *et al.*, 2009, LIABEUF *et al.*, 2011). Os primeiros estudos com compostos fenólicos focaram na investigação da concentração e toxicidade do PC. Porém, estudos mais recentes revelaram que este composto é rapidamente metabolizado, sendo o PCS o conjugado encontrado em maior quantidade no plasma (DE LOOR *et al.*, 2005; MARTINEZ *et al.* 2005; BARRETO *et al.*, 2014).

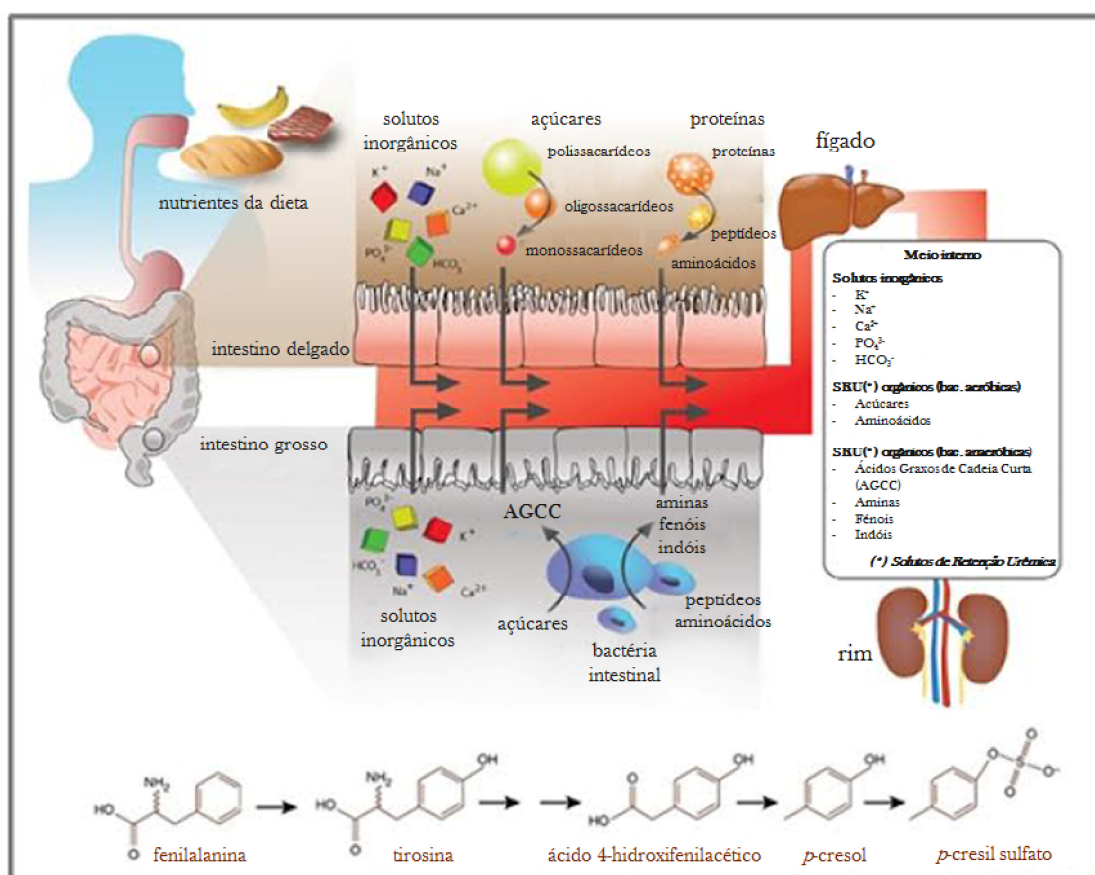


FIGURA 4 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FORMAÇÃO DOS SOLUTOS DE RETENÇÃO URÊMICA A PARTIR DO METABOLISMO NO TRATO GASTROINTESTINAL E ROTA BIOSINTÉTICA DO PC E PCS. FONTE: MEIJEIS *et al.* (2014), ADAPTADO PELA AUTORA

Embora a síndrome urêmica pareça afetar todos os órgãos e sistemas, como citado acima, o foco do presente trabalho são os efeitos deletérios relacionados ao sistema cardiovascular, a maior causa de morbimortalidade dos pacientes DRC (VANHOLDER *et al.* 2005). De fato, a DCV é responsável por cerca de 50% das mortes prematuras ocorridas na Europa Ocidental e América do Norte em pacientes que se submetem à diálise. Pode-se considerar que o risco de DCV em um paciente DRC de 30 anos de idade é similar ao de um indivíduo de 80 anos sem doença renal estabelecida (VARELA e PECOITS, 2006). A DRC está associada a um estado inflamatório crônico que, através de múltiplos mecanismos e em associação com o estresse oxidativo, promove múltiplas consequências patológicas como a disfunção endotelial, aceleração da aterosclerose, indução de calcificação vascular, alterações do estado nutricional, anemia e a disfunção imune (GALLI, 2007) (FIGURA 5).

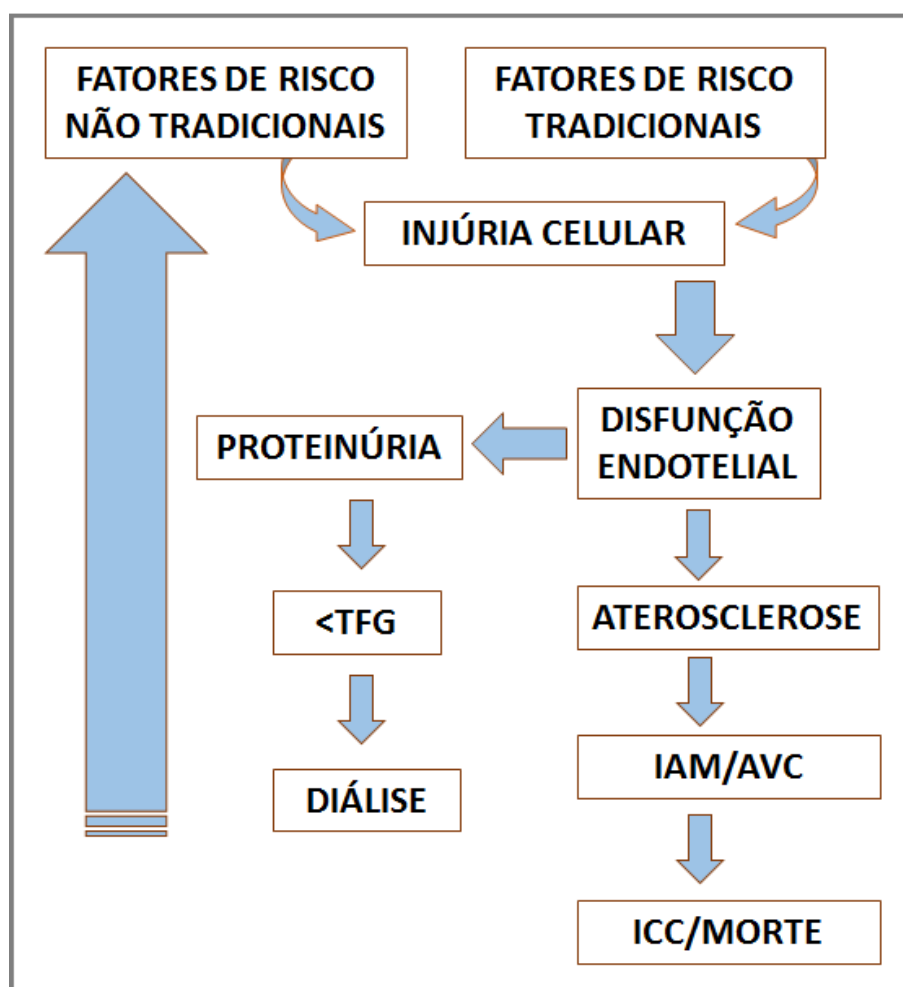


FIGURA 5 – RELAÇÃO ENTRE A DOENÇA RENAL CRÔNICA E A DOENÇA CARDIOVASCULAR (TFG: Taxa de Filtração Glomerular; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; AVC: Acidente Vascular Cerebral; ICC: Insuficiência Cardíaca).
 FONTE: VARELA e PECOITS, 2006.

Devido à lipofilicidade e consequente ligação a proteínas plasmáticas, a remoção do PC e PCS por hemodiálise é notadamente menos eficiente do que a da uréia e creatinina (NIWA, 1993). Em terapias dialíticas são eliminados 70% de uréia e creatinina e apenas 30% de PC após 4 horas de sessão (VANHOLDER e DE SMET, 1999; LESAFFER *et al.*, 2000). Esse acúmulo progressivo de PC tem sido associado com o aumento de lesões vasculares, ativação de leucócitos e mortalidade (VANHOLDER e DE SMET, 1999).

Outros estudos indicaram que o PC e o PCS contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, afetando células do endotélio e músculo liso, também os leucócitos e plaquetas de pacientes DRC. Tais dados sugerem que estas toxinas podem ser diretamente responsáveis pelo aumento da morbidade cardiovascular desses pacientes (BRETTSCHEIDER *et al.*, 2013; BRUNET *et al.*, 2003; MEIJERS *et al.*, 2008). De acordo com a literatura, as concentrações de PC e PCS total e livre (não ligadas à albumina) estão aumentadas em estágios avançados da DRC, porém, é a fração livre que está associada à mortalidade por DCV (LIABEU *et al.*, 2010; BAMMENS *et al.*, 2006).

Schepers *et al.* (2007) observaram 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) demonstraram que o PCS induz a liberação de micropartículas endoteliais, mesmo na ausência de dano endotelial, sugerindo que esta toxina pode estar envolvida na disfunção endotelial.

Estes dados foram recentemente confirmados por Watanabe *et al.* (2014), que relataram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) e HASMC (*human aortic smooth muscle cells*), induzida por PCS, com consequente aumento da secreção de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), um importante mediador do processo inflamatório vascular.

2.5 MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1

Sabe-se que as respostas inflamatórias mediadas por citocinas e quimiocinas são relevantes em todos os estágios da aterosclerose (VIEDT e ORTH, 2002).

O MCP-1, cujo receptor é o CCL2, é um membro da família de quimiocinas CC (nas quais resíduos de cisteína são adjacentes), pertencente ao grupo das quimiocinas inflamatórias (NAVRATILOVA *et al.* 2006). Grandes quantidades de MCP-1 podem ser encontradas em células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e células do músculo liso vascular (SEINO, *et al.*, 1995).

É considerada a quimiocina mais potente no recrutamento de monócitos para a camada subendotelial, determinante na iniciação e no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas (FIGURA 6) (HARRINGTON, 2000).

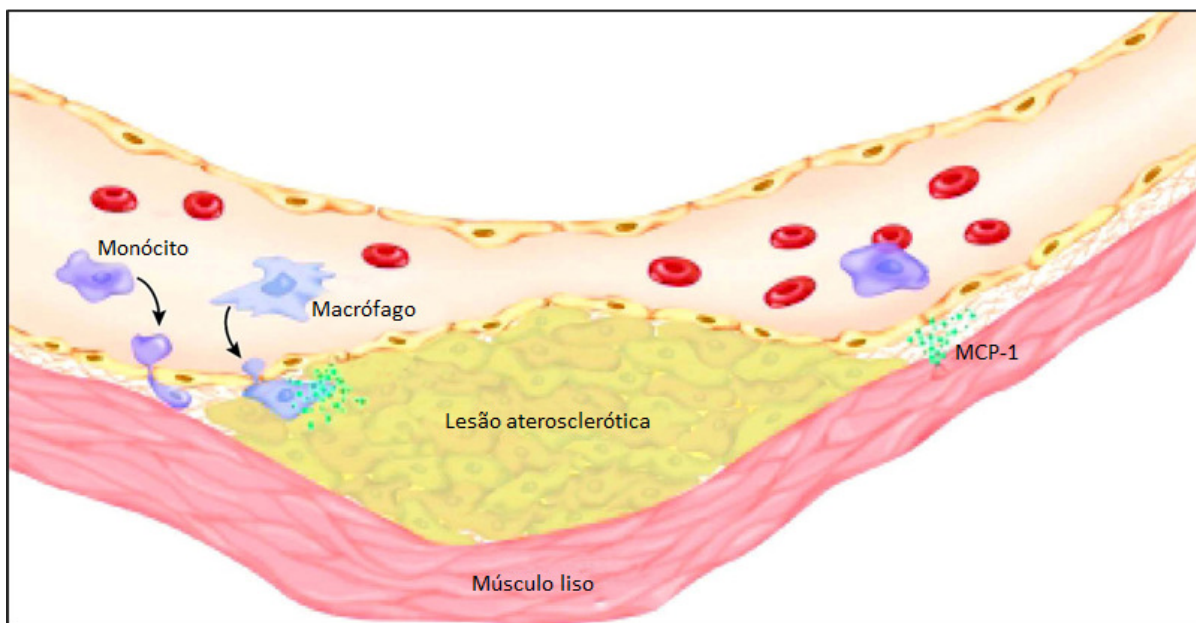


FIGURA 6 – FORMAÇÃO DA LESÃO ATEROSCLERÓTICA.
FONTE: HARRINGTON (2000), ADAPTADO PELA AUTORA

A interação dos monócitos com o endotélio vascular durante a inflamação ocorre através de várias etapas envolvendo o rolamento mediado pelas selectinas, adesão leve mediada por moléculas de adesão como a VCAM-1 (do inglês, *vascular cell adhesion molecule-1*) e a ICAM-1 (do inglês, *intercellular cell adhesion molecule-1*) e subsequente adesão firme mediada por quimiocinas, como o MCP-1 e a interleucina-8 (IL-8). Monócitos ligados ao endotélio migram através da camada íntima, transformam-se em macrófagos e fagocitam lipídios oxidados, tornando-se células espumosas ou *foam cells* (FIGURA 7).

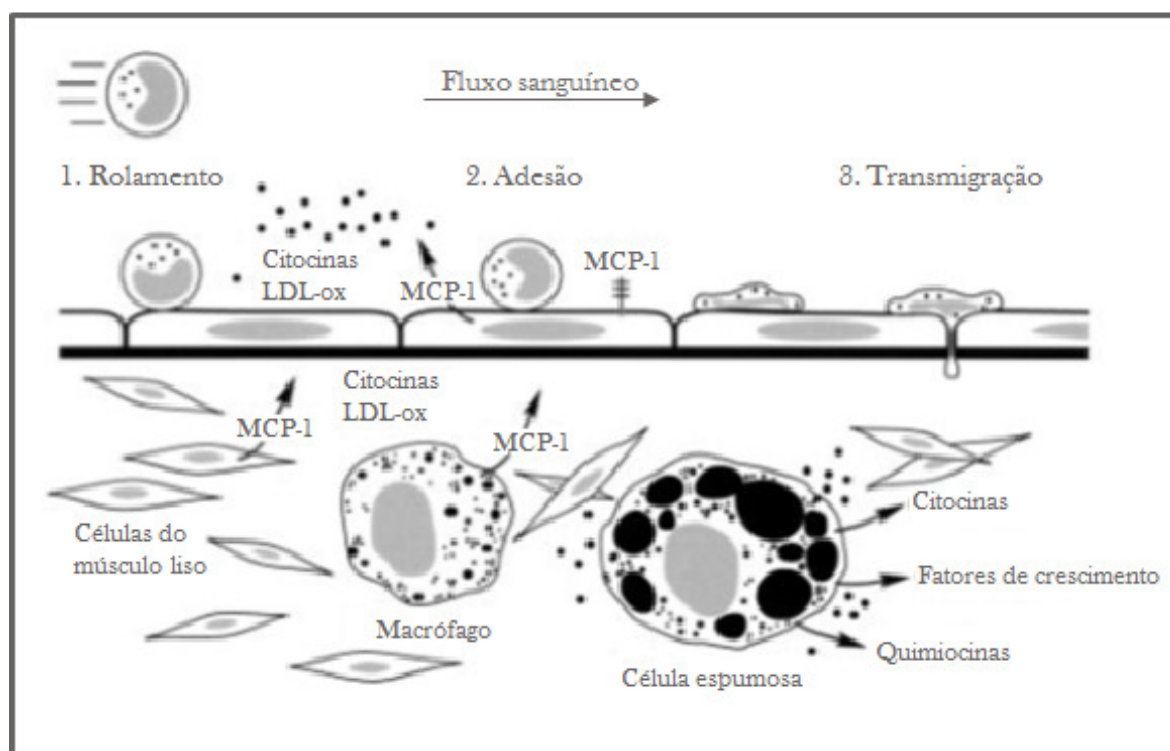


FIGURA 7 – SECREÇÃO DE MCP-1 POR CÉLULAS DO ENDOTÉLIO E MÚSCULO LISO PROMOVEM O RECRUTAMENTO DE MONÓCITOS PARA A CAMADA SUBENDOTELIAL. FONTE: CHARO e TAUBMAN (2004), ADAPTADO PÉLA AUTORA.

Este dinâmico e controlado mecanismo, contribui para o crescimento e expansão das lesões, e o recrutamento de monócitos participa diretamente na desestabilização da placa aterosclerótica, resultando em complicações associadas a taxas significativas de morbidade e mortalidade (LI e GLASS, 2002).

Portanto, a agressão constante do endotélio a partir da interação entre as toxinas urêmicas e as células endoteliais, com alteração do fenótipo celular, pode refletir, ao menos em parte, os níveis plasmáticos elevados de marcadores de inflamação vascular como o MCP-1 e outras quimiocinas encontradas nestes pacientes e participar efetivamente da fisiopatologia da DCV relacionada à DRC

(SEGAL, 2006; DIAZ-BUXO, 2006). Mediante estes fatos, a resposta inflamatória da DRC não somente representa um evento fisiopatológico importante na relação com a DCV, mas também abre perspectivas de identificação de múltiplos biomarcadores deste processo que vem se consolidando como ferramentas de utilidade no entendimento dos mecanismos de doença, na identificação de pacientes sob alto risco de complicações e na monitoração de tratamentos de redução de risco cardiovascular (CLARO, 2012).

2.6 OS TRANSPORTADORES DE ÂNIOS ORGÂNICOS

No néfron, os túbulos proximais e distais têm duas funções importantes: remover os produtos residuais do sangue para a urina e, ao mesmo tempo, regular as concentrações plasmáticas de substâncias importantes (ANZAI, 2005). A secreção tubular via sistemas de transporte de ânions orgânicos tem sido o principal foco de interesse científico, devido às suas funções na excreção de muitos fármacos clinicamente importantes. Nos túbulos do nefrón, transportadores são expressos na membrana de borda em escova e na membrana basolateral das células epiteliais tubulares e estão envolvidos no transporte de várias substâncias, tais como íons inorgânicos, uréia, fósforo, hormônios esteroides, ácidos graxos, aminoácidos, açúcares, peptídeos e toxinas urêmicas (ENOMOTO e NIWA, 2007).

Durante a última década, abordagens de clonagem molecular identificaram vários membros das famílias de transportadores de ânions orgânicos que intermediam a eliminação renal e hepática de xenobióticos, como a famílias dos transportadores de ânions orgânicos (OAT, *organic anion transporter*) (BURCKHARDT, 2012; DANTZLER e WRIGHT, 2003; ENOMOTO E NIWA, 2007). A família OAT representa a principal via secretória renal de ânions orgânicos e também está envolvida na distribuição destes pelo corpo, nas interações medicamentosas e na toxicidade de substâncias como as drogas nefrotóxicas e as toxinas urêmicas (LUNGKAPHIN *et al.*, 2012). De fato, a maioria das toxinas urêmicas de baixo PM são excretadas pela urina. Neste processo de excreção, as toxinas urêmicas que se ligam a proteínas plasmáticas, como o PC e o PCS, contribuem muito pouco para a filtração glomerular, mas substancialmente para a secreção tubular (MIYAMOTO *et al.*, 2011). A secreção tubular de ânions orgânicos é realizada em duas etapas: a primeira é o transporte de ânions orgânicos do plasma do capilar peritubular através da membrana basolateral para dentro da célula do túbulo proximal. A segunda etapa é a saída dos ânions orgânicos através da membrana de borda em escova para o lúmen do túbulo (ANZAI *et al.*, 2005).

Do ponto de vista energético, os ânions orgânicos hidrofílicos são transportados através da membrana basolateral contra um gradiente eletroquímico em troca de α -cetogluturato intracelular, que passa do citosol para o sangue circulante ao longo do seu gradiente de concentração. O gradiente externamente dirigido do α -cetogluturato é mantido, pelo menos em parte, por um transportador de Na^+ - dicarboxilato (NaDC3) basolateral. O gradiente de Na^+ que impulsiona o NaDC3 é mantido pela Na^+ , K^+ - APTase. Do lado da membrana de borda em escova, a saída dos ânions orgânicos para o lúmen do túbulo ocorre através de cotransporte em troca de íons urato e hidroxila (FIGURA 8). Em muitos estudos realizados em vesículas isoladas da membrana basolateral, foi demonstrado o transporte acoplado do α -cetogluturato e de ânions orgânicos de pequeno PM, com o PC e o PCS (BRUNTON *et al.*, 2012; WILCOX, 2002).

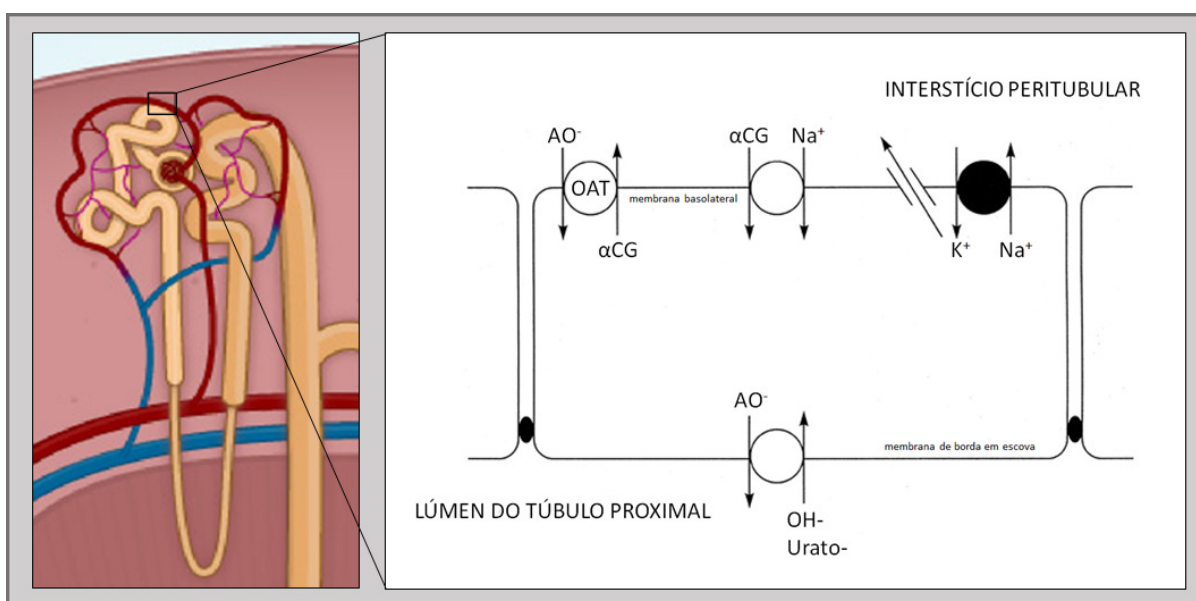


FIGURA 8 – MODELO DE SECREÇÃO DE ÂNIONS ORGÂNICOS PELAS CÉLULAS DO TÚBULO PROXIMAL. AO⁻, ânions orgânicos; OAT, *organic anion transporter*; αCG, α -cetogluturato. FONTE: WILCOX (2002), ADAPTADO PELA AUTORA

Em termos de regulação, além da transcricional, vários estudos indicam que existe uma regulação pós-translacional dos OATs mediada por proteínas quinases. De fato, todas as isoformas da família OAT clonadas apresentam sítios de fosforilação para proteína quinase C (PKC) (FIGURA 9), na alça intracelular entre os domínios 6 e 7 (LEE, 2006; ZHANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2012).

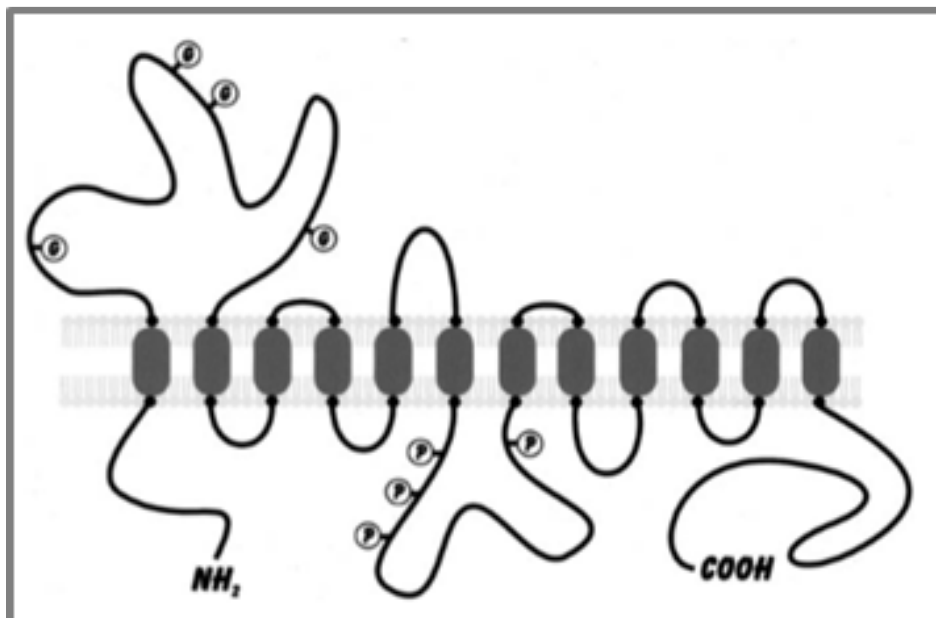


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM OAT.
FONTE: LEE, 2006.

Dentre as isoformas da família de OATs já identificadas, o foco do presente estudo foi direcionado ao OAT1 e OAT 3. O OAT 1 é expresso predominantemente nos rins, na membrana basolateral de células do túbulo proximal, onde é responsável pela captação de substratos oriundos dos capilares peritubulares (SEKINE *et al.*, 1997). O OAT 3 já foi encontrado nos rins, fígado, cérebro e olhos (KUSUHARA *et al.*, 1999). Nos rins o OAT 3 se localiza na membrana basolateral de células do túbulo proximal, e no cérebro foi encontrado em células do plexo coroide (NAGATA *et al.*, 2002; SWEET *et al.* 2004; OHTSUKI *et al.* 2004).

Estudos mais recentes demonstraram a captação de PCS em células tubulares proximais humanas da linhagem HK-2 via OAT 1 e OAT 3, sendo esta captação suprimida por inibidores de transportadores de ânions orgânicos, entre outros, o Probenecida (Pb). Ainda no mesmo estudo, foi mostrado que a presença de outras toxinas, dentre essas o IS, também acarretava em inibição significativa do transporte de PCS, sugerindo que estas duas toxinas competem pelo mesmo sítio de ligação na molécula OAT (MIYAMOTO *et al.*, 2011). Ito *et al.* (2010) demonstraram a existência

de OAT 1 e OAT 3 em HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*), através da técnica de rt-PCR e que a ativação celular mediada pela toxina urêmica IS foi suprimida pelo Pb.

O Pb (fórmula molecular $C_{13}H_{19}NO_4S$, nome químico oficial ácido 4-[(dipropilamino) sulfonil] benzoico; FIGURA 10) é um derivado do ácido benzóico, altamente lipossolúvel, planejado por Beyer *et al.* (1951) a fim de reduzir a secreção tubular da penicilina, por esta possuir uma meia-vida muito curta. Sua ação limita-se basicamente à inibição do transporte de ânions orgânicos através das barreiras epiteliais, por isso é amplamente utilizado como ferramenta farmacológica em estudos *in vitro* de análise de sistemas de transporte (LACY *et al.*, 1998; ENOMOTO *et al.*, 2002).

Nos túbulos proximal e distal, o Pb inibe competitivamente a secreção e de muitos ácidos orgânicos fracos, aumentando substancialmente as concentrações plasmáticas destes compostos, eliminados principalmente por secreção renal. Na clínica é tradicionalmente utilizado como agente uricosúrico, por facilitar a excreção de ácido úrico e assim diminuir as concentrações plasmáticas de urato, uma vez que também é capaz de inibir a reabsorção tubular pós-secreção. Doses mais elevadas de Pb são utilizadas como adjuvantes para prolongar a ação ou reduzir a nefrotoxicidade de antibióticos e antivirais de caráter aniônico (McEVOY, 1993).

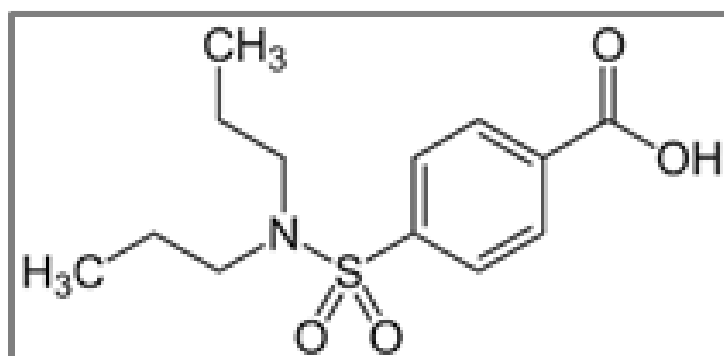


FIGURA 10: ESTRUTURA DO Pb.
FONTE: HARDMAN, 2003

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Avaliar a expressão de OAT-1 e OAT3 em células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 na presença de toxinas urêmicas (PC e PCS) e produção de MCP-1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Sintetizar o PCS, a partir da sulfatação do PC;
- Avaliar a viabilidade celular das células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 após tratamento com PC e PCS;
- Avaliar a expressão de OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 após tratamento com PC e PCS;
- Quantificar a quimiocitocina MCP-1 em sobrenadantes de cultivo de células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926, após tratamento com PC e PCS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PCS:

O conjugado PCS foi sintetizado conforme previamente descrito por Feigenbaum e Neuberg (1941). Tal síntese, realizada no Laboratório de Química da Universidade Tuiuti do Paraná, se baseia na reação de sulfatação do precursor PC em piridina com ácido clorosulfônico, alcalinizada com hidróxido de potássio, até a formação de cristais do sal ácido de éster de potássio (FIGURA 11). A confirmação do produto sintetizado foi feita através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e seu grau de pureza foi obtido através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance® 400 (Bruker; Karlsruhe, Alemanha), operando a 400 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) são dados em ppm, utilizando-se água deuterada (D_2O) como solvente e padrão interno.

Os espectros de CLAE foram obtidos em cromatógrafo Varian Pro Star® 410 (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos) usando coluna LiChrosorb RP-18 como fase estacionária e formiato de amônio 50 mM e metanol 100% como fase móvel, num gradiente de concentração com o formiato de amônio 50 mM variando de 65-25% (0-15 min) e 25-65% (15-20 min), com tempo de equilíbrio entre os gradientes de concentração de 2 min. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min e comprimento de onda de excitação/emissão de 214/306 nm (MARTINEZ *et al.*, 2005).

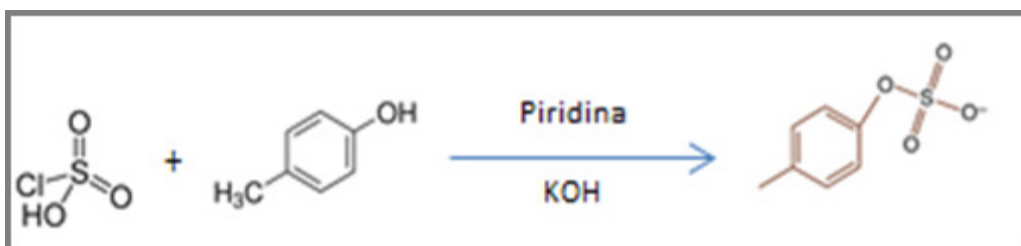


FIGURA 11 – SÍNTESE DO PCS. FONTE: A AUTORA (2015).

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PC E PCS:

O *p*-cresol 99% (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos) foi diluído em metanol, gerando uma solução mãe na concentração de 5000 mg/L e, a partir desta, foram feitas diluições em água ultrapura nas concentrações de 1000 mg/L e 100 mg/L. Os cristais de *p*-cresil sulfato sintetizado foram solubilizados em 2 mL de água para injetáveis e, partindo-se desta solução, foram feitas diluições na concentração de 100 mg/L. Todas as soluções foram armazenadas em alíquotas de 1 mL e congeladas a -30 °C. Para os ensaios, estas soluções contendo as toxinas PC e PCS foram diluídas em meio de cultura nas concentrações sugeridas pelas diretrizes do *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox) (TABELA 3).

TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DE PC E PCS UTILIZADAS NOS ENSAIOS

	Concentração normal (mg/L)	Concentração urêmica (mg/L)	Concentração urêmica máxima (mg/L)
<i>p</i>-cresol	0,60 (PCn)	20,1 (PCu)	40,7 (PCm)
<i>p</i>-cresilsulfato	0,08 (PCSn)	1,75 (PCSu)	2,6 (PCSm)

FONTE: EUTox, 2010.

4.3 PREPARO DA SOLUÇÃO DE Pb:

Solução estoque de Pb a 25mM: 0,072 g de Probenecida (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos) foi solubilizado em 0,3 mL de NaOH 1M e depois diluído em 9,7 mL de solução HHBS (solução salina balanceada de Hank + Hapes 20 mM). Alíquotas de 1 mL desta solução foram armazenadas ao abrigo da luz e congeladas a -30 °C. Para os ensaios, esta solução foi diluída na proporção 1:10 em meio de cultura (concentração de uso de 2,5 mM) (TAHARA *et al.*, 2006). Para os tratamentos com o Pb e as toxinas, as células foram incubadas com meio de cultura contendo 2,5 mM de Pb 1 hora antes dos tratamentos propriamente ditos, em meio de cultura contendo Pb, PC e PCS.

4.4 CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926

A linhagem endotelial EA.hy926, um hibridoma resultante da fusão de HUVEC (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) com célula epitelial tumoral A549 (EDGEALL *et al.*, 1983), foi obtida comercialmente junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ. O meio de cultura utilizado foi *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, GIBCO, Baltimore, Estados Unidos) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Baltimore, Estados Unidos) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO, Baltimore, Estados Unidos). As células foram cultivadas em frascos de 75 cm², a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias, até atingir confluência, quando então as células eram submetidas à tripsinização. Tal procedimento consiste no descolamento das células da garrafa, com o intuito de repique destas para outros frascos ou placas de cultivo. Assim sendo, as células eram primeiramente lavadas com tampão salino fosfato (PBS) e em seguida descoladas com 700-1000 µL de Tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO, Baltimore, Estados Unidos). A suspensão celular era transferida para um tubo de 15 mL contendo 1-2 mL de meio DMEM com 10% de SFB, para inativar a Tripsina, e centrifugada por 5-7 min a 1200 rpm. Em seguida o centrifugado celular era ressuspendido em 3 mL de meio de cultura e a contagem de células feita em Câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán.

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT:

A viabilidade celular da linhagem EA.hy926 foi determinada por ensaios de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo), segundo previamente descrito (MOSMANN, 1983). As células foram cultivadas em placas de 96 poços (10⁴ células/poço), em meio de cultura DMEM suplementado, sempre com volume final de 100 µL/poço e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Assim sendo, passadas 24 h a partir da transferência para as placas, as células foram incubadas com meio de cultura contendo, ou não, as toxinas PC e PCS e o inibidor Pb, nas concentrações acima descritas, por mais 24 h. Em seguida o meio de cultura foi trocado novamente, por outro contendo 0,5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos), desta vez com período de incubação de 4 h. Por fim, o meio foi

substituído por 100 μ L/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) e a mensuração foi feita em leitor de microplacas (BIO-RAD 550) a 570 nm.

4.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 POR DOT BLOT:

Tratamento das células e obtenção dos extratos celulares: As células foram cultivadas em 6 frascos de 75 cm² em meio de cultura DMEM suplementado e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Atingida a confluência máxima, as células foram incubadas por 24 h em meio de cultura contendo, ou não, as toxinas PC e PCS e o inibidor Pb, nas concentrações acima descritas. Após este período, as células foram lavadas com PBS e em seguida desprendidas dos frascos com o auxílio de um raspador de células em 2 mL de PBS gelado, com os frascos mantidos sobre gelo, evitando-se assim a degradação das proteínas. As suspensões de células foram então transferidas para tubos de 15 mL e centrifugadas por 5 min a 1200 rpm. Os centrifugados foram ressuspensos com 100 μ L de tampão de lise celular RIPA (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% de desoxicolato de sódio, 1% de NP-40, 0,1% dodecilsulfato de sódio) acrescido dos inibidores de proteases e fosfatases (complete Mini e PhosStop, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Estas suspensões foram mantidas no gelo por 20 min e em seguida centrifugadas por 30 min a 13000 rpm e 4°C. Os sobrenadantes foram recuperados. O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

DOT BLOT. O equivalente a 10 μ g de proteínas contidas nos extratos foi diluído em RIPA e pipetado em 2 membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra). Após secagem, as membranas foram coradas com Ponceau Red para confirmar a impregnação das proteínas. Em seguida as membranas foram lavadas em água corrente e depois bloqueadas (1 h, TA, agitação constante) com solução de bloqueio (0,3% de Tween em TBS 1x). Após esta etapa, as membranas foram submetidas a 4 lavagens (10 min cada, TA, agitação constante) com solução de lavagem (0,05% de Tween em TBS 1x). As membranas foram então incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos anti-OAT1 e anti-OAT3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), diluídos em solução de bloqueio na proporção 1:1000. Após esta etapa, as membranas foram novamente lavadas, conforme descrito acima, para então serem incubadas (1 h, 37°C e agitação constante) com anticorpo anti-goat marcado com

peroxidase (HRP, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), diluído em solução de lavagem na proporção 1:20000. Em seguida as membranas foram submetidas a uma última etapa de lavagem, depois preparadas no cassete para a revelação por eletroquimioluminescência (do inglês, Electrochemiluminescence - ECL) (Thermo Scientific, Rockford, EUA) em filme ultrasensível (GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra). Após digitalização, as imagens foram analisadas através do programa Image Studio Lite (LI-COR® Biosciences) e a intensidade dos sinais obtidos foram posteriormente calculadas em relação ao controle.

4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA QUIMIOCINA MCP-1 ATRAVÉS DO ENSAIO DE ELISA DIRETO:

A dosagem de MCP-1 foi realizada em sobrenadante de cultura através do método de ELISA direto, segundo protocolo fornecido pelo fabricante dos anticorpos utilizados (R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos). As concentrações de MCP-1 (pg/mL) foram calculadas com base na curva de calibração correspondente, realizada com o anticorpo recombinante, obtendo uma faixa de detecção entre 31,25 e 2000 pg/mL.

Tratamento das células e coleta dos sobrenadantes de cultura: As células foram cultivadas em placas de 96 poços (10^4 células/poço), em meio de cultura DMEM suplementado com volume final de 100 μ L/poço e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Passadas 24 h a partir da transferência das células para as placas, o meio de cultura foi trocado por outro contendo, ou não, as toxinas PC e PCS e o inibidor Pb, nas concentrações acima descritas. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 0h, 3h e 6h de incubação e armazenados em microtubos a -20 °C, para posterior dosagem da molécula MCP-1.

Dosagem de MCP-1 em sobrenadantes de cultura pelo método de ELISA direto: Uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 100 μ L do anticorpo de captura na concentração 2 μ g/ml em solução diluente e incubada *overnight* a temperatura ambiente (TA). Posteriormente os poços foram lavados com solução de lavagem contendo 0,05% de Tween em PBS 1x (4 repetições, 300 μ L/poço) e em seguida foi feito o bloqueio com 1% de BSA em PBS 1x (150 μ L/poço, 1h, TA). Após outro processo de lavagem, a placa está pronta para a incubação das amostras e do

anticorpo recombinante (100 μ L/poço, 2h, TA). A seguir a placa foi novamente lavada, para a incubação do anticorpo de detecção na concentração de 50 ng/mL (100 μ L/poço, 2h, TA). Após outro processo de lavagem, foi adicionada a enzima HRP 1:2500 (100 μ L/poço, 20min, TA, ao abrigo da luz). Posteriormente foi feita a última lavagem da placa, seguida da adição do substrato TBM (100 μ L/poço, 30min, TA, ao abrigo da luz). Finalmente, foi adicionada a solução STOP (H_2SO_4 1M, 50 μ L/poço) e a mensuração feita em leitor de microplacas (BIO-RAD 680) a 450nm.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados obtidos foram digitados em planilhas no programa Microsoft® Excel. Os resultados foram expressos em médias \pm desvio padrão ou erro padrão. Para avaliar o resultado entre os grupos foram realizados os testes *t* de Student ou Anova para dados pareados e Mann-Whitney e Anova on Rank's para dados não pareados. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de *P* for $< 0,05$. 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 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO PCS SINTETIZADO:

O espectro resultante das análises por RMN ^1H (400 MHz, D_2O) comprovou a identidade do composto sintetizado PCS. Na FIGURA 12 podem ser evidenciados 4 picos significativos: um singleto 2,31 ppm, dois dupletos em 7,18 ppm e 7,24 ppm e um outro singleto em 8,42 ppm.

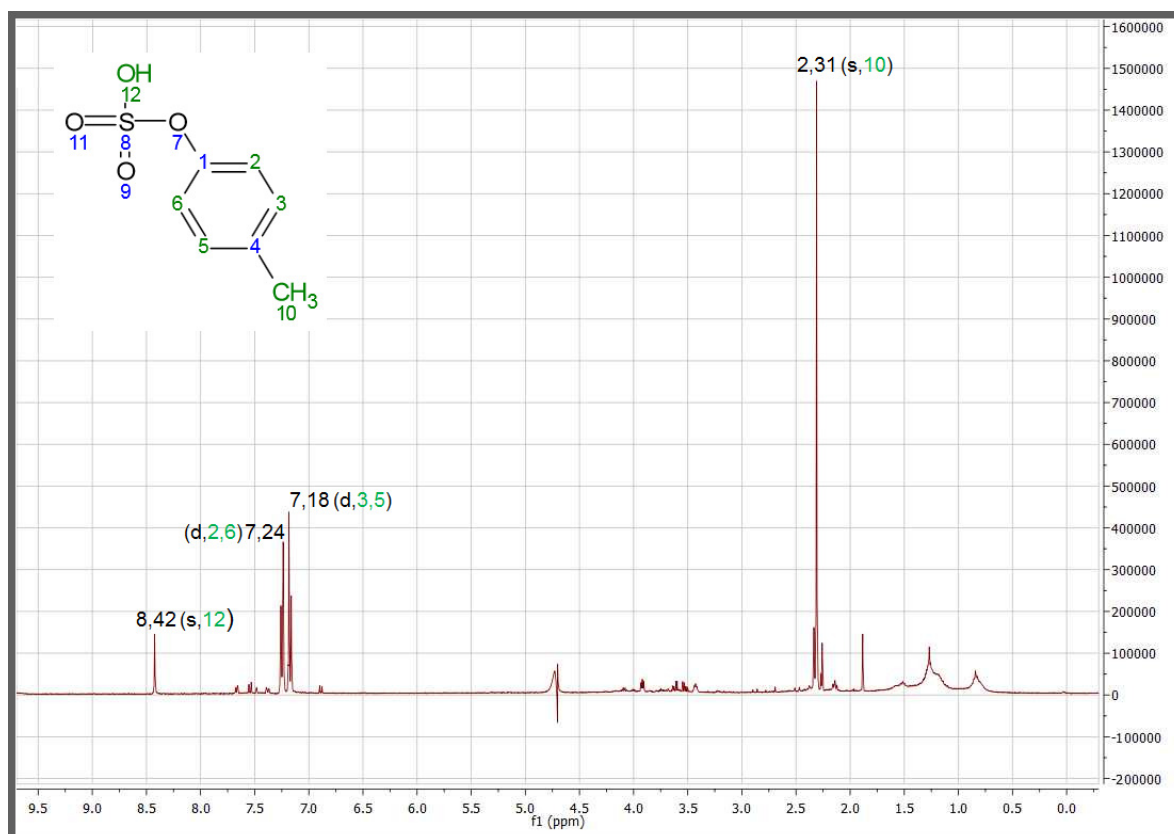


FIGURA 12. ESPECTRO DE RMN ^1H DO PCS SINTETIZADO.
FONTE: A AUTORA (2015).

O mesmo perfil de ressonância pode ser observado no espectro de RMN ^1H do PCS encontrado no banco de dados *Human Metabolome Database* (FIGURA13).

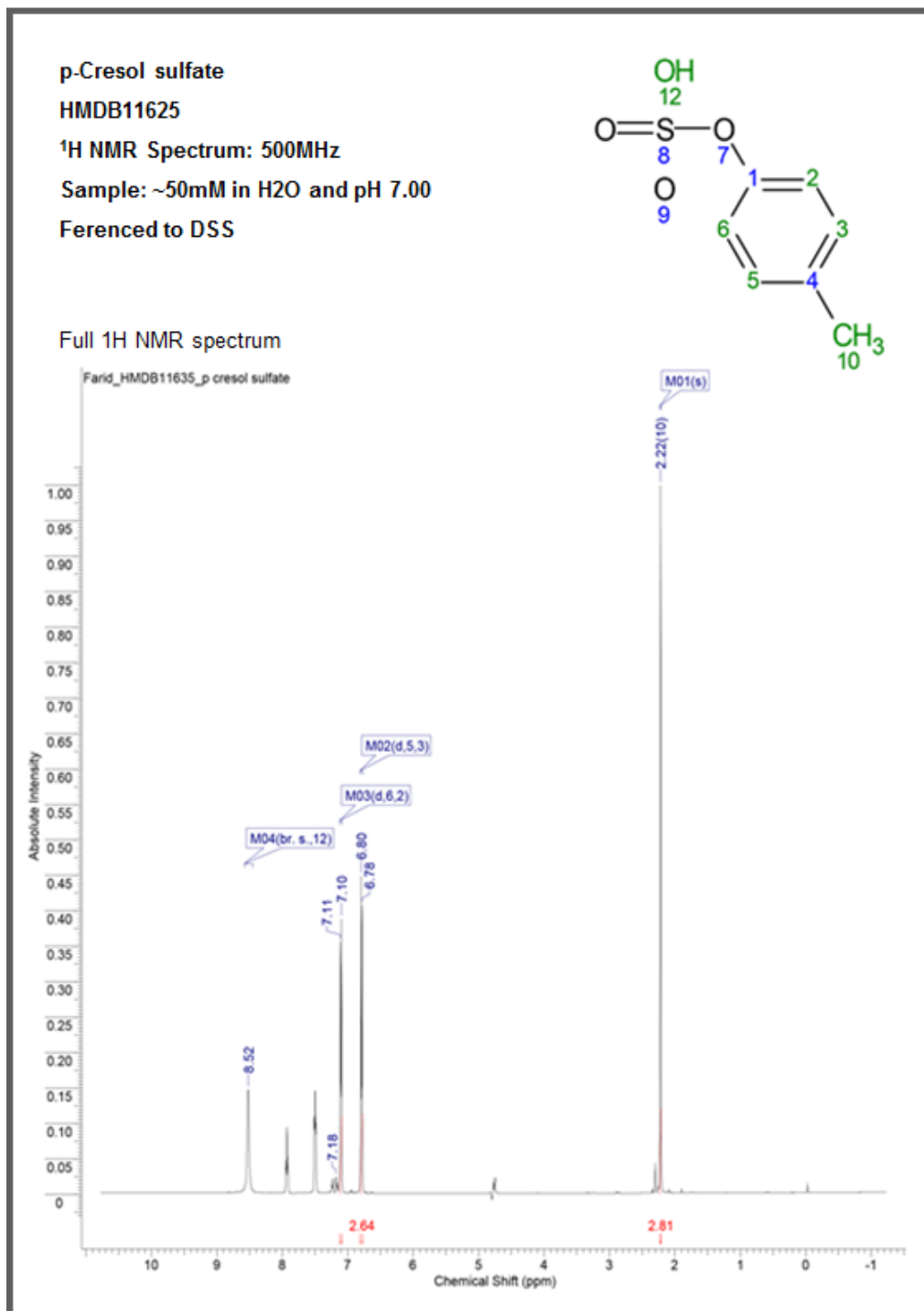


FIGURA 13 – ESPECTRO DE RMN ^1H DO PCS.

FONTE: HMDB, disponível em www.hmdb.ca

Na FIGURA 14 tem-se a comparação entre os perfis cromatográficos, resultantes das análises por CLAE, do PCS sintetizado e do PC obtido comercialmente e diluído 1:1000 em metanol.

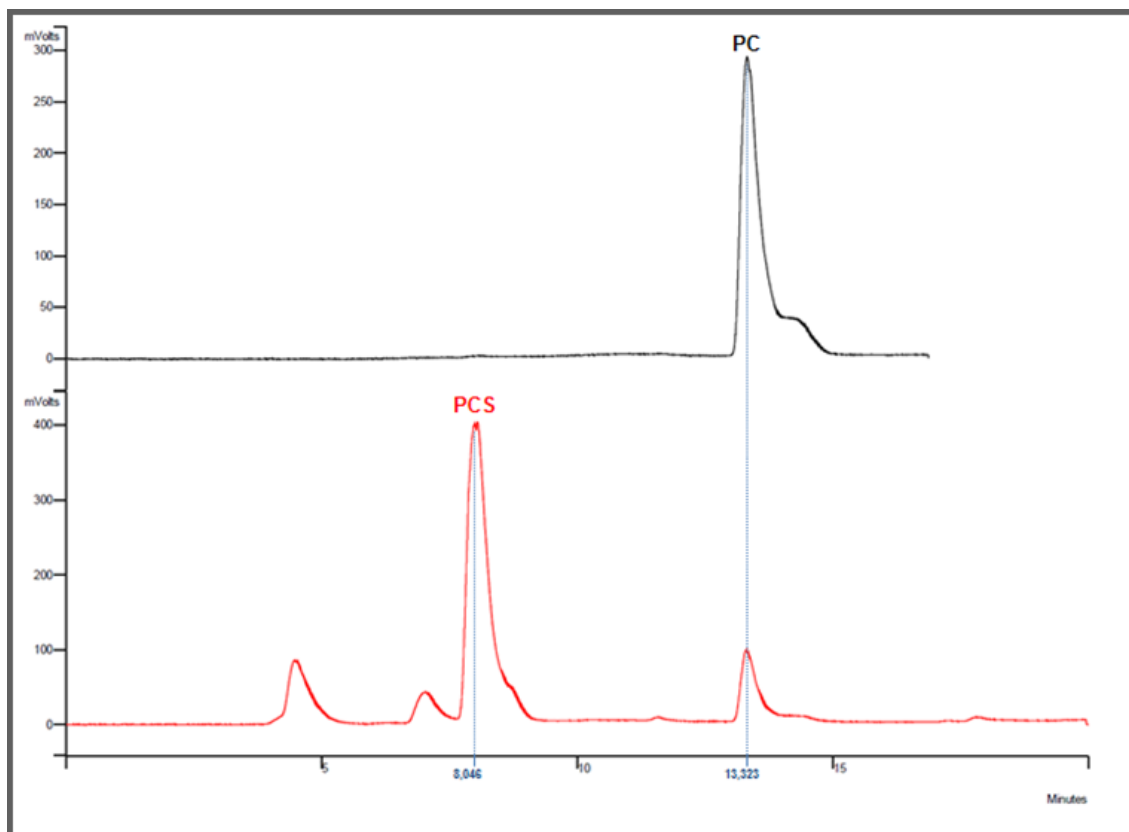


FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS PCS SINTETIZADO E DO PRECURSOR PC. FONTE: A AUTORA (2015)

No sistema cromatográfico proposto, a amostra do precursor PC apresentou tempo de retenção em torno de 13,32 min, com teor de pureza reportado em torno de 93%. Já a amostra do produto sintetizado apresentou tempo de retenção de 8,5 min, com teor de pureza reportado em torno de 74%, correspondente ao PCS sintetizado e ainda um resíduo de PC em torno de 10%.

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR:

Para avaliar a viabilidade das células endoteliais humanas da linhagem EAhy.926, quando submetida os tratamentos com as toxinas PC e PCS, foi examinado o efeito das concentrações de uso destas utilizando-se o ensaio colorimétrico de MTT. Tal ensaio analisa quantitativamente a redução do sal de tetrazolium (MTT) pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase, presente na matriz de mitocôndrias. Esse complexo enzimático transforma o MTT em produtos finais de metabolização chamados de cristais de formazan, de coloração violeta, cuja intensidade é medida por espectrofotometria.

Como apresentado na FIGURA 15, os tratamentos com PC não alteraram significativamente a viabilidade da linhagem EAhy.926. Na concentração urêmica máxima observa-se uma queda da viabilidade celular de aproximadamente 13% em relação ao controle.

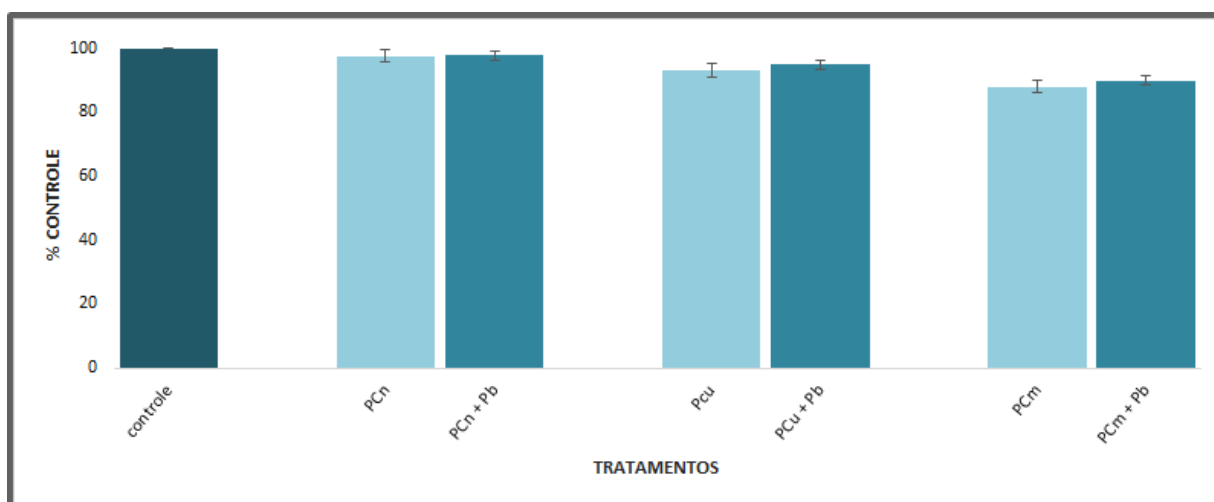


FIGURA 15 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM EA.HY926 ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT, APÓS TRATAMENTO COM PC NAS CONCENTRAÇÕES NORMAL, URÊMICA E URÊMICA MÁXIMA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PB (N=6). Os resultados são expressos como percentual em relação aos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado. Não houve diferença significativa entre os grupos (Anova, teste *t*). FONTE: A AUTORA (2015).

Já nos tratamentos com PCS (FIGURA 16), a queda da viabilidade foi ainda menor, de aproximadamente 4% na concentração máxima urêmica. Nos tratamentos com as toxinas na presença do inibidor de ânions orgânicos Pb, observa-se um discreto aumento na viabilidade celular, na faixa de 0,3-2% para os tratamentos com PC e na faixa de 0,2-1% para os tratamentos com PCS.

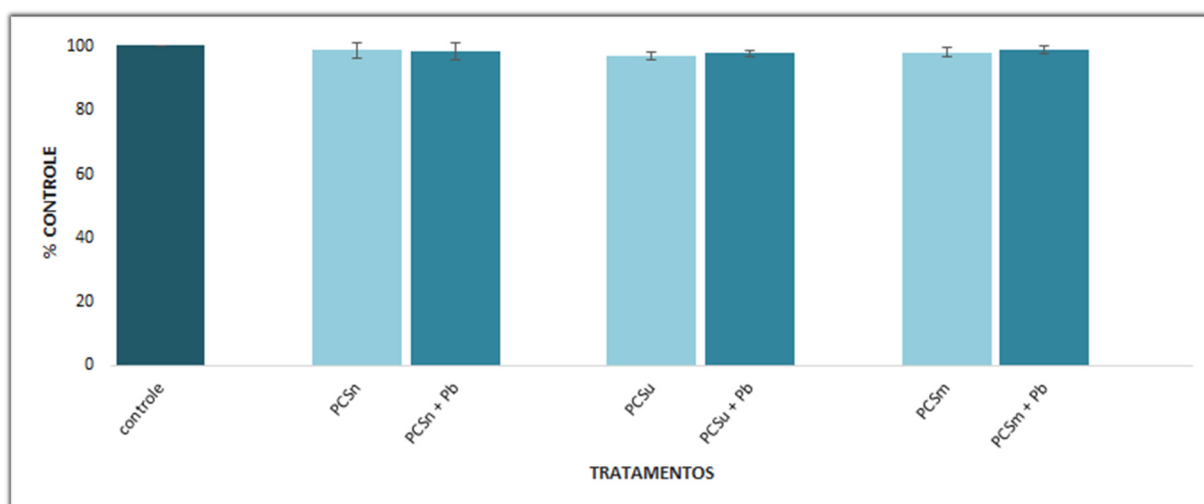


FIGURA 16 - VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM EA.HY926 ATRAVÉS DO ENSAIO DE MTT, APÓS TRATAMENTO COM PCS NAS CONCENTRAÇÕES NORMAL, URÊMICA E URÊMICA MÁXIMA NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PB (N=6). Os resultados são expressos como percentual em relação aos valores de absorbância observados no grupo controle não tratado. Não houve diferença significativa entre os grupos (Anova, teste *t*). FONTE: A AUTORA (2015).

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 POR DOT BLOT:

A análise da expressão de OAT 1 e OAT 3 em células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 foi feita através da técnica de Dot Blot, utilizando-se os anticorpos específicos para tais proteínas. Assim, foi possível verificar, qualitativa e quantitativamente, a expressão destas proteínas nas células submetidas aos diferentes tratamentos com as toxinas PC e PCS, na presença e ausência do inibidor de transportadores de ânions orgânicos Pb. Ainda, para se comprovar a relatividade da expressão destas proteínas frente aos diferentes tratamentos, foi feita também a análise da expressão da proteína β -actina. Esta, por ser uma proteína constitutiva, não sofre grandes alterações de expressão em diversas condições fisiopatológicas, podendo então ser utilizada como controle endógeno.

Conforme explicitado na FIGURA 17, o inibidor Pb suprimiu expressão de OAT 1 para aproximadamente 72%, em relação ao controle sem Pb. Os tratamentos com as toxinas PC e PCS na concentração urêmica máxima aumentaram a expressão da proteína alvo para 117% e 115%, respectivamente. O Pb inibiu praticamente duas vezes mais a expressão de OAT 1 no tratamento com o PC (94%) do que no tratamento com PCS (103%).

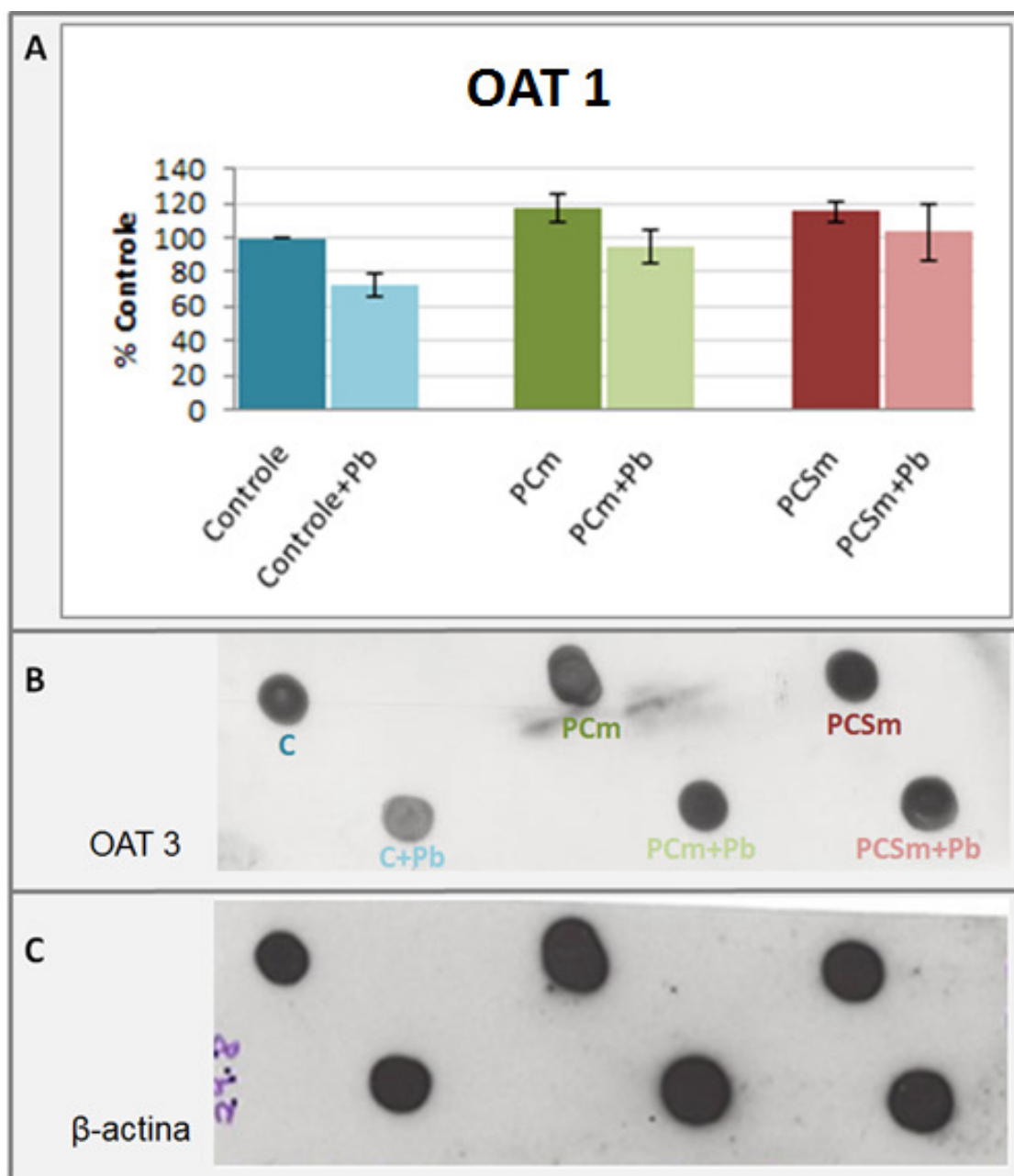


FIGURA 17 - EXPRESSÃO DE OAT 1 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926. A) Gráfico resultante das análises das membranas digitalizadas. B) Imagem de uma das membranas incubadas com o anticorpo anti-OAT1, após revelação por ECL e digitalização. C) Imagem da mesma membrana incubada com o anticorpo anti- β -actina, após revelação por ECL e digitalização. FONTE: A AUTORA (2015).

Conforme explicitado na FIGURA 18, o inibidor Pb suprimiu a expressão de OAT 3 para aproximadamente 54%, em relação ao controle sem Pb. Ambos os tratamentos com o PCm, na ausência e presença de Pb, não apresentaram alterações significativas em relação ao controle, ficando a expressão da proteína em torno de 103 % e 101%, respectivamente. Já no tratamento com o PCSm a expressão de OAT 3 ficou abaixo da obtida no controle, em torno de 95% e a presença do Pb suprimiu a expressão da proteína para 63%.

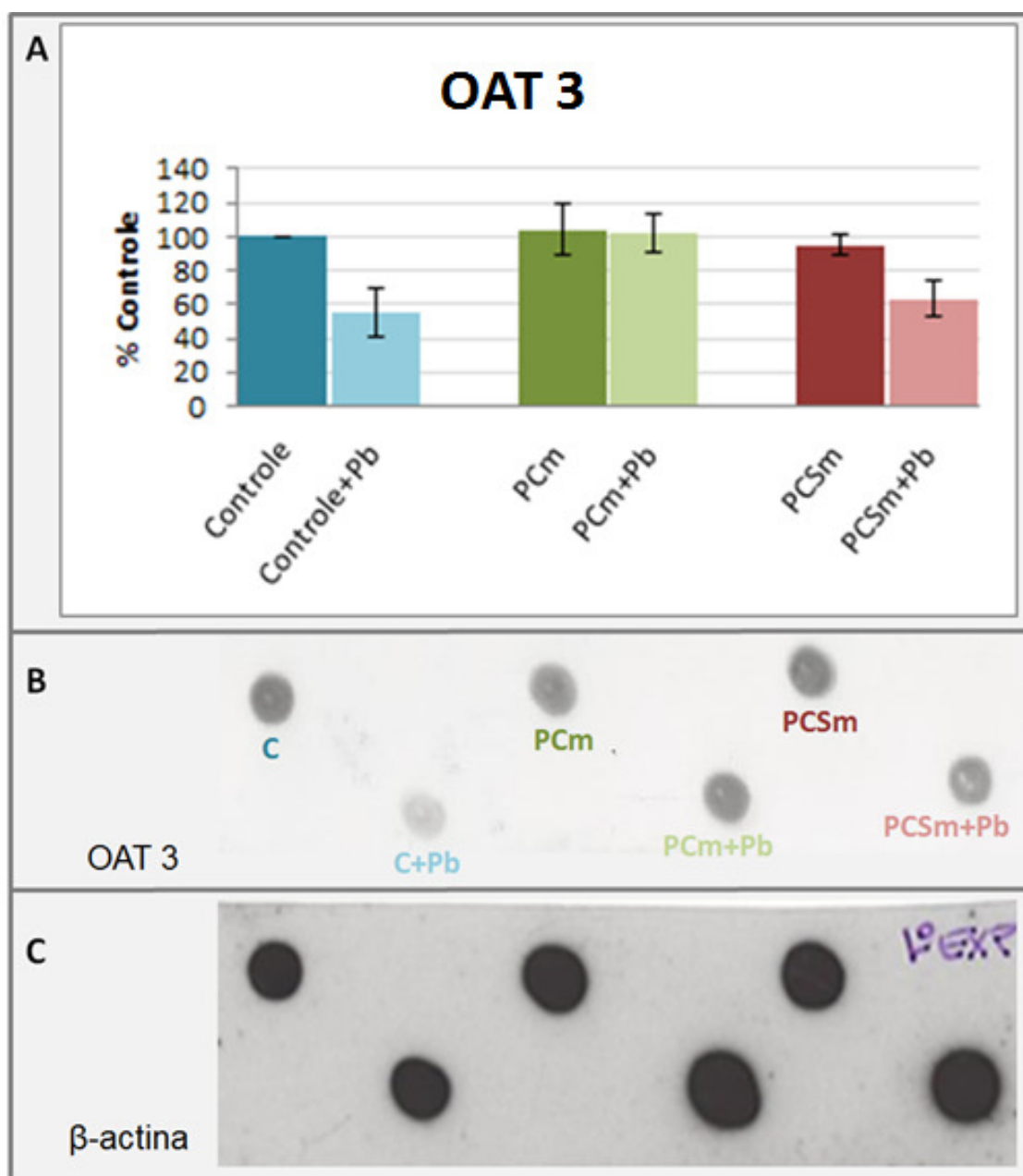


FIGURA 18 - EXPRESSÃO DE OAT 3 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926. A) Gráfico resultante das análises das membranas digitalizadas. B) Imagem de uma das membranas incubadas com o anticorpo anti-OAT1, após revelação por ECL e digitalização. C) Imagem da mesma membrana incubada com o anticorpo anti- β -actina, após revelação por ECL e digitalização. FONTE: A AUTORA (2015).

Analisando-se também a média dos valores da intensidade dos sinais obtidos pelos grupos controle na ausência e presença do Pb (FIGURA 19), é possível sugerir que a expressão de OAT 1 na linhagem EA.hy926 é muito mais acentuada do que a expressão de OAT 3. O que também pode ser claramente observado nas imagens das revelações (FIGURA 17B E FIGURA 18B).

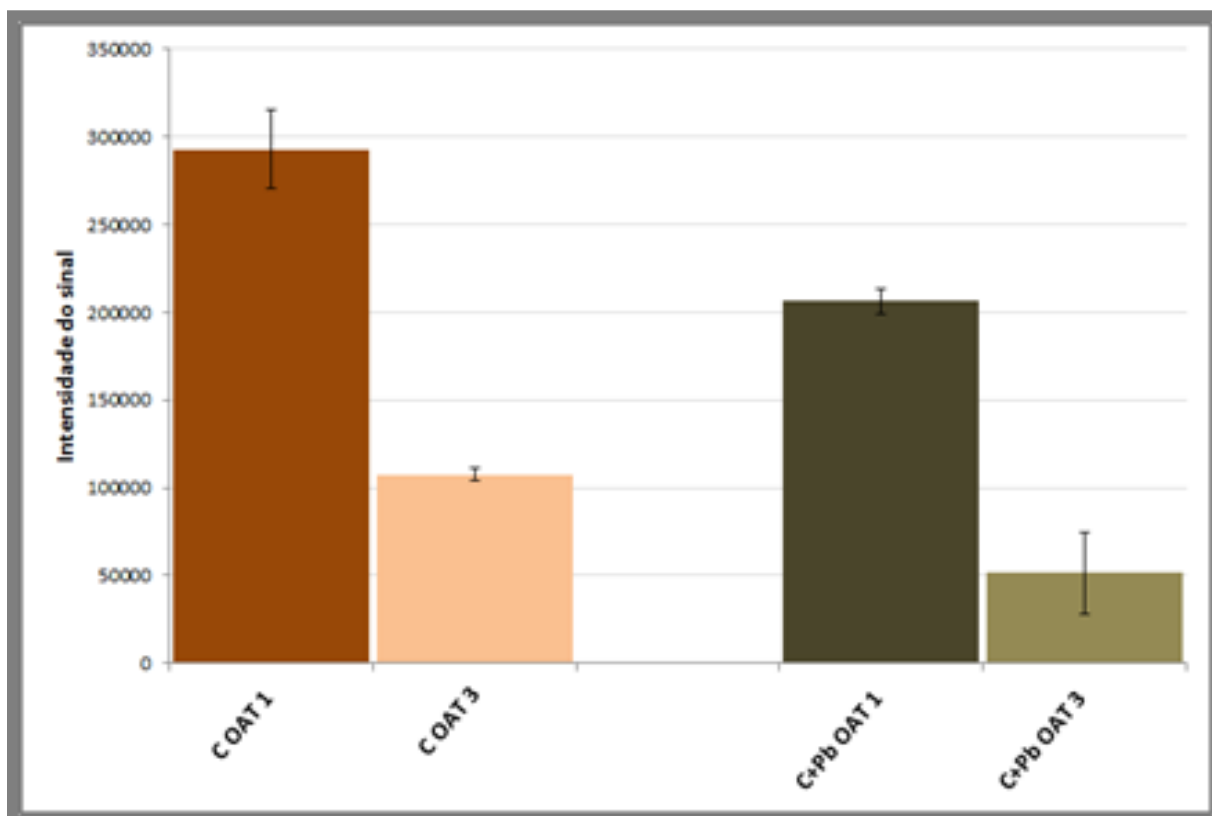


FIGURA 19 EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 EM CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926, GRUPOS CONTROLE NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE Pb. FONTE: A AUTORA (2015).

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA MCP-1:

A análise da produção da citocina MCP-1 por células endoteliais humanas da linhagem EA.hy926 foi realizada através da técnica de ELISA direto, que se baseia na quantificação do antígeno (MCP-1 em sobrenadantes de cultura celular) através da sua ligação com anticorpos específicos, utilizados de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

A FIGURA 20 apresenta os dados obtidos sobre a produção de MCP-1 frente aos tratamentos com a toxina PC, na presença ou ausência do inibidor de transportadores de ânions orgânicos, o Pb.

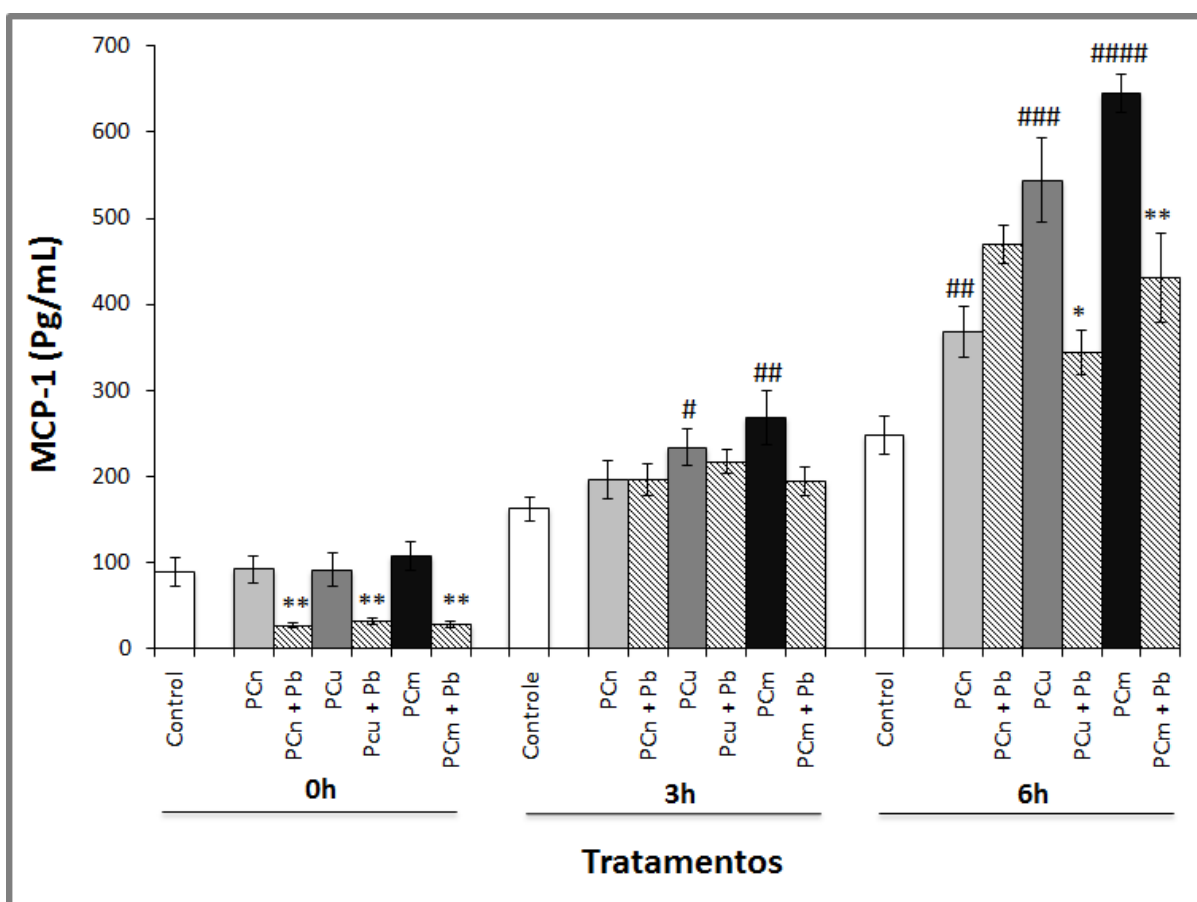


FIGURA 20 - DOSAGEM DE MCP-1 EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926, APÓS TRATAMENTO COM PC E Pb. * $P < 0,05$ - PCu x PCu + Pb 6h; ** $P < 0,005$ - PCm x PCm + Pb 6h; # $P < 0,05$ - C 3h x PCu 3h; ## $P < 0,005$ C 3h x PCm 3h; C 6h x PCn 6h; ### $P < 0,0005$ - C 6h x PCu 6h, PCn 0h x PCn + Pb 0h, PCu x PCu + Pb 0h, PCm x PCm + Pb 0h; #### $P < 0,0001$ - C 6h x PCm 6h. FONTE: A AUTORA (2015).

No tempo 0h, os níveis de MCP-1 não se alteraram significativamente em relação ao controle (Controle: 88 pg/mL; PCn: 91 pg/mL; PCu: 91 pg/mL; PCm: 106 pg/mL). Já a presença do inibidor Pb causou alterações significativas, resultando em um acentuado decréscimo na produção da quimiocina, em todas as concentrações testadas (PCn+Pb: 26 pg/mL, TI: 58%; PCu+Pb: 31 pg/mL, TI: 56%; PCm+Pb: 28 pg/mL, TI: 60%).

No tempo 3h, observa-se um aumento gradativo dos níveis de MCP-1, tanto em relação ao controle, quanto em relação a uma concentração testada para a outra. Em outras palavras, após 3h de exposição à toxina, a produção de MCP-1 aumentou, conforme a concentração desta também foi aumentada (Controle: 162 pg/mL; PCn: 196 pg/mL; PCu: 234 pg/mL; PCm: 268 pg/mL). Ainda no tempo 3h, a atividade inibitória parece ser proporcional ao aumento da concentração da toxina. Ou seja, quanto maior a concentração de PC, maior a capacidade inibitória exercida pelo Pb (PCn+Pb: 195 pg/mL; PCu+Pb: 217 pg/mL; PCm+Pb: 195 pg/mL). Porém, observando-se os tratamentos separadamente, evidencia-se que a capacidade inibitória do Pb foi significativa apenas no tratamento com a concentração máxima urêmica, onde a produção de MCP-1 abaixou de 268 pg/ml para 195 pg/ml, o que corresponde a uma taxa de inibição (TI) de 27%.

No tempo 6h, também observa-se um aumento gradativo dos níveis de MCP-1, tanto em relação ao controle, quanto em relação a uma concentração testada para a outra. Assim, após 6h de exposição à toxina, a produção de MCP-1 aumentou, conforme a concentração desta também foi aumentada (Controle: 247 pg/mL; PCn: 368 pg/mL; PCu: 544 pg/mL; PCm: 646 pg/mL). A atividade inibitória exercida pelo Pb não apresentou o mesmo padrão do tempo anterior: no tratamento com a concentração normal, a produção da quimiocina foi maior do que no tratamento com a mesma concentração, na ausência de Pb (PCn+Pb: 469 pg/mL). E nos tratamentos com as concentrações urêmica e máxima urêmica ocorreu um acentuado decréscimo na produção de MCP-1 (PCu+Pb: 344 pg/mL, TI: 37%; PCm+Pb: 430 pg/mL, TI: 32,5%).

A FIGURA 21 abaixo apresenta os dados obtidos sobre a produção de MCP-1 frente aos tratamentos com a toxina PCS, na presença ou ausência do inibidor de transportadores de ânions orgânicos, o Pb.

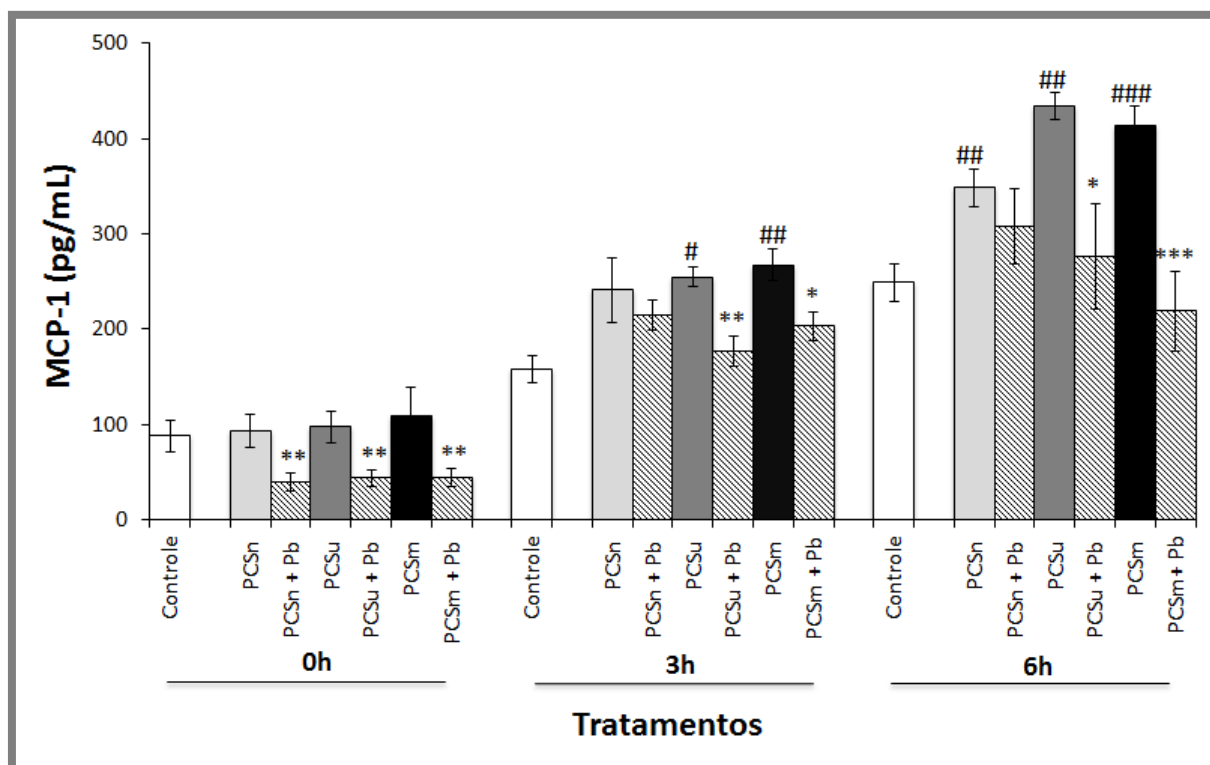


FIGURA 21 - DOSAGEM DE MCP-1 EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DA LINHAGEM EA.HY926, APÓS TRATAMENTO COM PCS E Pb * $P < 0,05$ – PCSm x PCSm + Pb 3h; PCSu x PCSu + Pb 6h; ** $P < 0,005$ – PCSn x PCSn + Pb 0h, PCSu x PCSu + Pb 0h, PCSm x PCSm + Pb 0h, PCSu x PCSu + Pb 3h; *** $P < 0,0005$ – PCSm x PCSm + Pb 6h; # $P < 0,05$ – C x PCu 3h; ## $P < 0,005$ – C x PCu 3h, C x PCn 6h; ### $P < 0,0005$ – C x PCm 6h. FONTE: A AUTORA (2015).

No tempo 0h, a resposta celular apresentou o mesmo padrão dos tratamentos com o PC. Ou seja, os níveis de MCP-1 não se alteraram significativamente em relação ao controle (Controle: 88 pg/mL; PCn: 94 pg/mL; PCu: 97 pg/mL; PCm: 110 pg/mL). Já a presença do inibidor Pb causou alterações significativas, resultando em um acentuado decréscimo na produção da quimiocina, em todas as concentrações testadas (PCn+Pb: 39 pg/mL, TI: 58%; PCu+Pb: 44 pg/mL, TI: 56%; PCm+Pb: 44 pg/mL, TI: 60%).

No tempo 3h, a resposta celular também apresentou o mesmo padrão dos tratamentos com o PC. Ou seja, ocorreu um aumento gradativo dos níveis de MCP-1, tanto em relação ao controle, quanto em relação a uma concentração testada para a outra (Controle: 158 pg/mL; PCn: 241 pg/mL; PCu: 255 pg/mL; PCm: 268 pg/mL). A

atividade inibitória foi mais acentuada no tratamento com a toxina em sua concentração urêmica (PCn+Pb: 215 pg/mL, TI: 11%; PCu+Pb: 177 pg/mL, TI: 31%; PCm+Pb: 203 pg/mL, TI: 24%).

No tempo 6h, a produção de MCP-1 foi mais acentuada no tratamento com a toxina em sua concentração urêmica (Controle: 249 pg/mL; PCn: 349 pg/mL; PCu: 435 pg/mL; PCm: 413 pg/mL). Já a atividade inibitória foi proporcional ao aumento da concentração da toxina, ou seja, quanto maior a concentração de PCS, maior a capacidade inibitória exercida pelo Pb (PCn+Pb: 308 pg/mL, TI: 12%; PCu+Pb: 276 pg/mL, TI: 36%; PCm+Pb: 219 pg/mL, TI: 46%).

Pode-se evidenciar também que a produção basal de MPC-1 aumenta conforme o tempo de incubação. Ou seja, os grupos controle também apresentaram aumento gradativo dos níveis de MCP-1 ao longo do tempo, tanto nos tratamentos com o PC como nos tratamentos com o PCS.

Em síntese, ambas as toxinas parecem ativar a resposta celular de forma dose e tempo dependente. O que justifica o aumento do MCP-1 como marcador de processos inflamatórios na DRC, ou seja, quanto mais avançada a doença, mais elevado será o nível plasmático desta quimiocina.

A inibição da resposta celular na presença do Pb foi mais significativa no tempo 0h, em todos os tratamentos, com ambas as toxinas. Outro dado relevante é o fato de ter sido observada uma produção basal de MCP-1 com aumento tempo-dependente. Estes dados juntos sugerem que o Pb inibe a captação não só das toxinas adicionadas ao meio, como também a de outros metabólitos produzidos pelas próprias células e que, ao longo do tempo, vão se acumulando no meio de modo a estimular a produção de MCP-1 (produção basal). Tal hipótese é admissível devido aos inúmeros relatos da literatura sobre a importância dos OATs na captação e excreção de diversas substâncias exógenas e endógenas.

Transformando-se as dosagens de MCP-1, nos tratamentos com a concentração máxima uremica e no tempo 6h, para porcentagens em relação aos seus respectivos controles, observa-se mais claramente que a produção de MCP-1 foi mais acentuada nos tratamentos com PC do que com PCS (FIGURA 22).

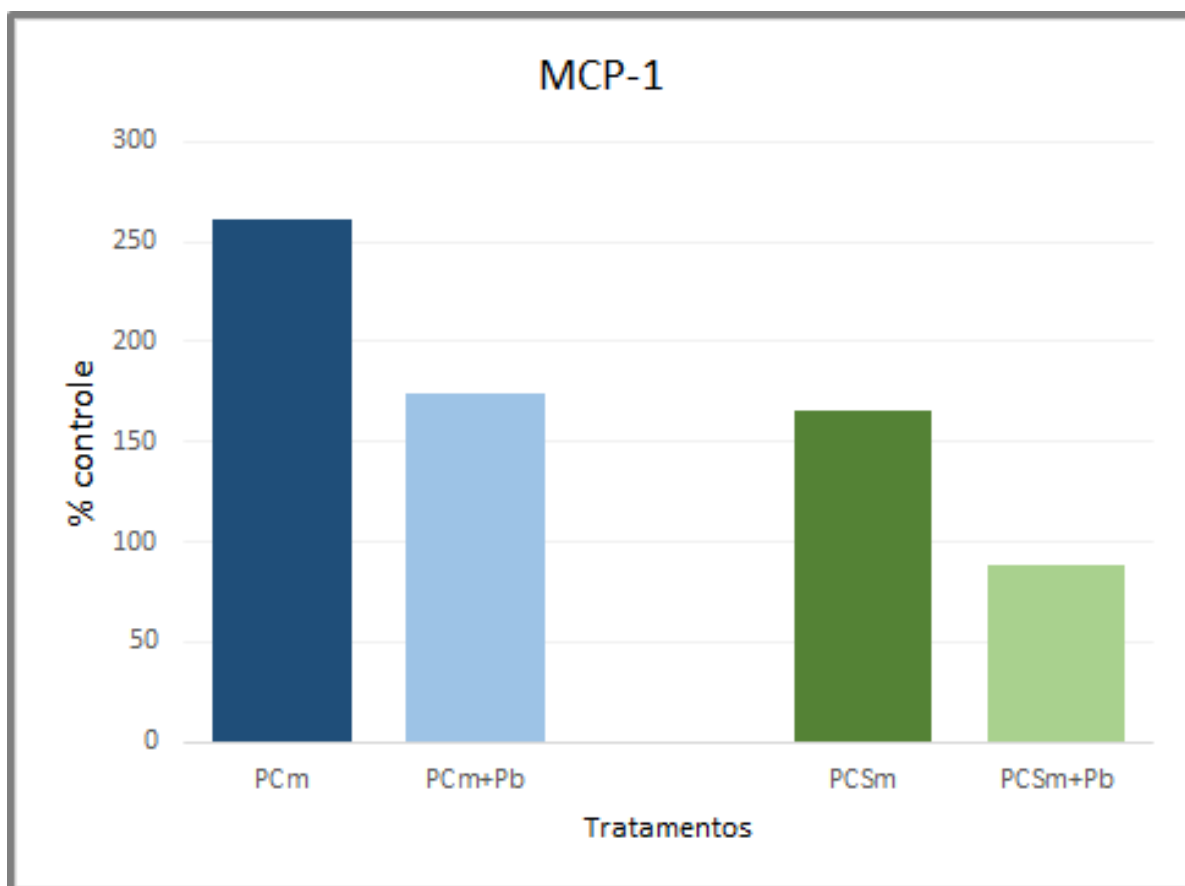


FIGURA 22 – ANÁLISE COMPARATIVA DA PRODUÇÃO DE MCP-1. TRATAMENTOS COM PC E PCS NA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA UREMICA E NO TEMPO 6H; PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO CONTROLE. FONTE: A AUTORA (2015).

Utilizando-se destes mesmo valores, foi feita uma correlação entre a produção de MCP-1 e a expressão de OAT 1 e OAT 3 (FIGURA 23)

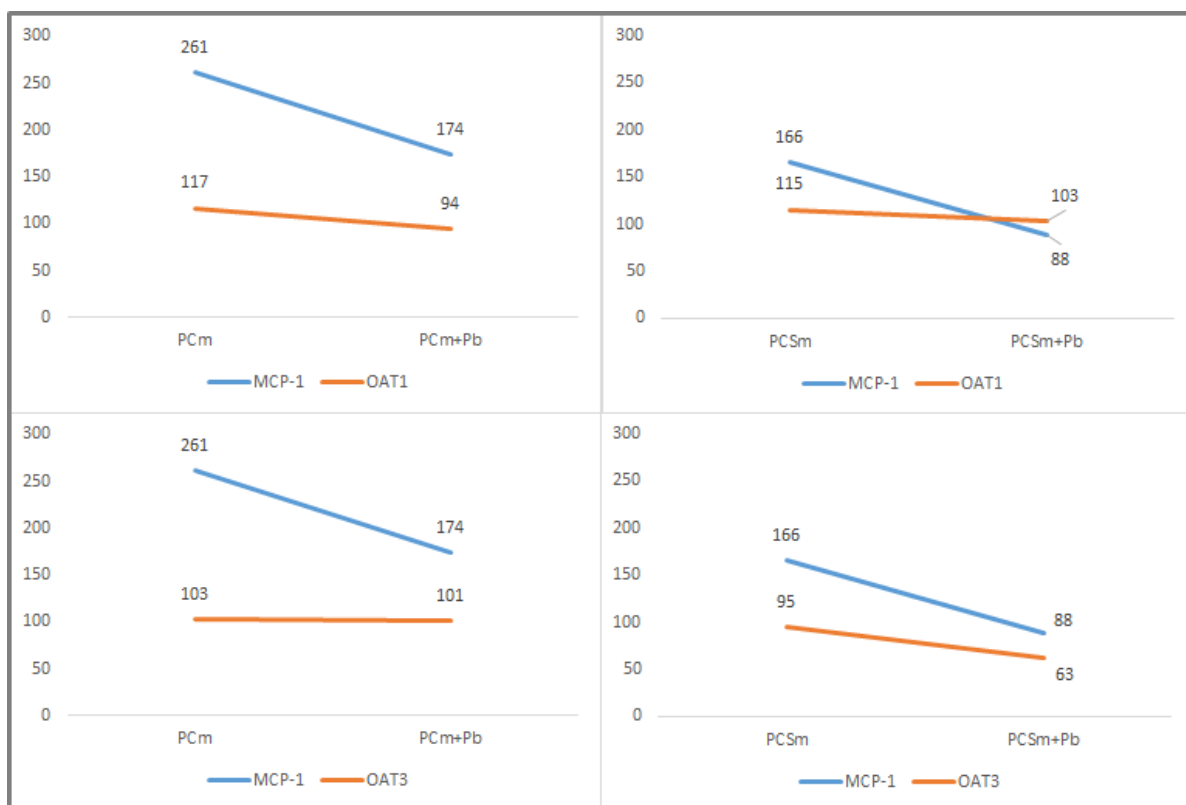


FIGURA 23 – CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE OAT 1 E OAT 3 E A PRODUÇÃO DE MCP-1. FONTE: A AUTORA (2015).

Os gráficos apresentados acima sugerem que, em células endoteliais humanas, o PC é o substrato de preferência de OAT 1, enquanto o PCS é o substrato de preferência do OAT 3.

Enomoto *et al.* (2002) relataram ter comprovado a existência de OAT 1 e OAT 3 em HUVEC através de rt-PCR, mas os dados não foram publicados. Nos túbulos renais, já foi demonstrado que a expressão de OAT 3 é superior àquela de OAT 1 (MOTOHASHI *et al.*, 2002, CHENG, 2012, BURCKHARDT, 2012), dado este que contradiz o encontrado no presente trabalho.

Em síntese, a maioria dos estudos sobre OAT 1 e OAT 3 trazem dados sobre a expressão destas nos túbulos renais, onde exercem papel fundamental na excreção de diversos xenobióticos e onde de fato já foram consideravelmente exploradas em termos de identificação, expressão, localização e especificidade dos substratos.

O mecanismo de ação responsável pela inibição de OATs, exercida pelo Pb, permanece obscuro (McEVOY, 2008). Investigações futuras poderiam explorar a

existência de alguma correlação entre a interação do Pb, que é altamente lipossolúvel, e a regulação da expressão de OATs via PKC.

O uso do Pb já é consagrado na prática clínica. Os dados relatados no presente trabalho sugerem que tal medicamento poderia ser utilizado como estratégia de combate à nefrotoxicidade endotelial mediada por OATs. De fato, nada se sabe sobre a expressão de OAT 1 e OAT 3 em células endoteliais e o enriquecimento das informações acerca disso poderia trazer contribuições muito importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de combate à progressão da DCV em DRG.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

As evidências experimentais obtidas no presente trabalho, permitem concluir que:

- O espectro de RMN ^1H , juntamente com os cromatogramas de CLAE, comprovam a identidade do composto sintetizado como sendo o PCS.
- As toxinas PC e PCS na presença e ausência do inibidor Pb não afetaram a viabilidade celular da linhagem EA.hy926.
- A linhagem EA.hy926 expressa OAT 1 e OAT 3, com níveis superiores de expressão de OAT 1 e de inibição de OAT 3.
- A produção de MCP-1 pelas células da linhagem EA.hy296 ocorre de forma dose e tempo dependente. E a ação do Pb foi mais eficaz no tempo 0h, em todos os tratamentos, e no tempo 6h nos tratamentos com a concentração urêmica máxima de PC e PCS.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKATERINI, 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* v. 17, p. 435–441, 2002.

ANZAI, N. *et al.* **Integrated physiology of proximal tubular organic anion transport.** *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 14, n. 5, p. 472-479, 2005.

ANZAI, N.; KANAI, Y. ENDOU, Hitoshi. **Organic anion transporter family: current knowledge.** *Journal of pharmacological sciences*, v. 100, n. 5, p. 411-426, 2005.

BAMMENS, B. *et al.* **Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients.** *Kidney international*, v. 69, n. 6, p. 1081-1087, 2006.

BARRETO, F. C. *et al.* **The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 36, n. 2, p. 221-235, 2014.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. **Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 33, p. 93-108, 2011.

BERGÉ-LEFRANC, D. *et al.* **Binding of p-cresylsulfate and p-cresol to human serum albumin studied by microcalorimetry.** *J Phys Chem*, v. 114, p. 1661–1665, 2010.

BEYER, K.H. *et al.* **'Benemid,' p-(di-n-propylsulfamyl)-benzoic acid; its renal affinity and its elimination.** *Am. J. Physiol.*, vol. 166, p. 625-640, 1951.

BOELAERT, J. *et al.* **A novel UPLC–MS–MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients.** *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 405, n. 6, p. 1937-1947, 2013.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem*, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRETTSCHEIDER, F. *et al.* **Removal of Protein-Bound, Hydrophobic Uremic Toxins by a Combined Fractionated Plasma Separation and Adsorption Technique.** *Artificial organs*, v. 37, n. 4, p. 409-416, 2013.

BRUNET, P. *et al.* **Protein-bound uremic retention solutes.** Advances in renal replacement therapy, v. 10, n. 4, p. 310-320, 2003.

BURCKHARDT, G.. **Drug transport by organic anion transporters (OATs).** Pharmacology & therapeutics, v. 136, n. 1, p. 106-130, 2012.

CHARO, I. F.; TAUBMAN, M. B. **Chemokines in the pathogenesis of vascular disease.** Circulation research, v. 95, n. 9, p. 858-866, 2004.

CHENG, Y. *et al.* **Expression of organic anion transporter 2 in the human kidney and its potential role in the tubular secretion of guanine-containing antiviral drugs.** Drug Metabolism and Disposition, v. 40, n. 3, p. 617-624, 2012.

CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. **Stereoselective binding of human serum albumin.** Chirality, v. 18, n.3, p. 159-166, 2006.

DANTZLER, W. H.; WRIGHT, S. H. **The molecular and cellular physiology of basolateral organic anion transport in mammalian renal tubules.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v. 1618, n. 2, p. 185-193, 2003.

DE LOOR, H. *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, p.1535-8, 2005.

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

DUTRA M. C. *et al.* **Avaliação da função renal em idosos: um estudo de base populacional.** J Bras Nefrol, v. 36, p. 297-303, 2014.

EDDY, A. A. **Progression in chronic kidney disease.** Adv. Chronic Kidney Dis. v. 12, p. 353–365, 2005.

EDGEELL C. J. *et al.* **Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization.** Proc. Natl. Acad. Sci. v. 80, p. 3734-3737, 1983.

ELMARAQBY, A. A.; SULLIVAN, J. C. **Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy.** Cardiovascular Therapeutics. 2010.

ENOMOTO, A. *et al.* **Interaction of human organic anion transporters 2 and 4 with organic anion transport inhibitors.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 301, n. 3, p. 797-802, 2002.

ENOMOTO, A. *et al.* **Role of organic anion transporters in the tubular transport of indoxyl sulfate and the induction of its nephrotoxicity.** Journal of the American Society of Nephrology, v. 13, n. 7, p. 1711-1720, 2002.

ENOMOTO, A.; NIWA, T. **Roles of organic anion transporters in the progression of chronic renal failure.** *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, v. 11, n. s1, p. S27-S31, 2007.

ENOMOTO, Atsushi et al.

FEIGENBAUM J.; NEUBERG, C. **Simplified method for the preparation of aromatic sulfuric acid esters laboratory of pharmacokinetics.** *J Am Chem Soc*, v. 63, p. 3529–3530, 1941.

GALLI, F. **Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients.** *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 22, n. suppl 5, p. 20-36, 2007.

GANONG, W. F. **Review of Medical Physiology, 24th Ed.** LANGE Basic Science, 2012

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica. 12 ed.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica.** 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

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

HARRINGTON, J. **The Role of MCP-1 in Atherosclerosis.** *Stem Cells*, v. 18, p. 65-66, 2000.

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

ITO, S. *et al.* **Indoxyl sulfate induces leukocyte-endothelial interactions through up-regulation of E-selectin.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 50, p. 38869-38875, 2010.

JOURDE-CHICHE, N. *et al.* **PROGRESS IN UREMIC TOXIN RESEARCH: Protein-Bound Toxins—Update 2009.** *Seminars in dialysis*. v. 22. n. 4, 2009.

KDOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis*. v. 39 (Suppl 2) p. 1-246, 2002.

KOLATTUKUDY, P. E.; NIU, J. **Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway.** *Circ Res*. v. 110, p. 174-189, 2012.

KUSUHARA H. *et al.* **Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain.** *J Biol Chem*. V. 274, p. 13675–13680, 1999.

LACY, S. A. *et al.* **Effect of oral probenecid coadministration on the chronic toxicity and pharmacokinetics of intravenous cidofovir in cynomolgus monkeys.** Toxicol. Sci., v. 44, p. 97-106, 1998.

LEKAWANVIJIT, S. *et al.* **Cardiorenal Syndrome The Emerging Role of Protein-Bound Uremic Toxins.** Circulation research, v. 111, n. 11 p. 1470-1483, 2012.

LEE, W. K. *et al.* **Introduction of Organic Anion Transporters (SLC22A) and a Regulatory Mechanism by Caveolins.** Electrolyte & Blood Pressure, v. 4, n. 1, p. 8-17, 2006.

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

LI, A. C.; GLASS, C. K. **The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention.** Nat Med. v. 8, n. 11, p. 1235-42, 2002.

LIABEUF, S.; DRÜEKE, T. B.; MASSY, Z. A. **Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies.** Toxins, v. 3, n. 7, p. 911-919, 2011.

LUNGKAPHIN, A. *et al.* **Function and expression of renal organic anion transporters in experimental diabetes in mice.** ScienceAsia, v. 38, n. 1, p. 18-23, 2012.

LUNGKAPHIN, A. *et al.* **Relative contribution of OAT1 and OAT3 transport activities in isolated perfused rabbit renal proximal tubules.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v. 1758, n. 6, p. 789-795, 2006.

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

MARTINOVIC, I. *et al.* **Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease.** Circ J., v. 69, p. 1484–1489, 2005.

[McEVOY, G.K. American Hospital Formulary Service - Drug Information 93. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists, Inc., p. 1651, 1993.

McEVOY, G. K. **Probenecid.** American Society of Health-System Pharmacists - AHFS drug information, p. 2792-5, 2008.

MEIJERS, B. K. I., *et al.* **Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients.** Kidney international, v. 73, n.10, p. 1174-1180, 2008.

MEIJERS, B. K. I., *et al.* **p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate in hemodialysis patients.** Clin J Am Soc Nephrol , v. 4, p. 1932– 1938, 2009.

MEIJERS, B. K. I., *et al.* **Nonextracorporeal Methods for Decreasing Uremic Solute Concentration: A Future Way To Go?.** In: Seminars in nephrology, p. 228-243, 2014.

MIYAMOTO Y, *et al.* **Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney.** *Nephrol Dial Transplant*, v. 26, p. 2498–2502, 2011.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of Immunological Methods* v. 65 n. 1-2 p. 55-63, 1983.

MOTOHASHI, H. *et al.* **Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 13, n. 4, p. 866-874, 2002

NAGATA, Y. *et al.* **Expression and functional characterization of rat organic anion transporter 3 (rOat3) in the choroid plexus.** *Mol Pharmacol.* v. 61, p. 982– 988, 2002.

NAVRATILOVA, I.; DIOSZEGI, M.; MYSZKA, D. G. **Analyzing ligand and small molecule binding activity of solubilized GPCRs using biosensor technology.** *Analytical biochemistry*, v. 355, n. 1, p. 132-139, 2006.

NEIRYNCK, N. *et al.* **An update on uremic toxins.** *International urology and nephrology*, v. 45, n. 1, p. 139-150, 2013

NIWA, T. **Phenol and p-cresol accumulated in uremic serum measured by HPLC with fluorescence detection.** *Clinical chemistry*, v. 39, n. 1, p. 108-111, 1993.

OHTSUKI, S. *et al.* **Mouse reduced in osteosclerosis transporter functions as an organic anion transporter 3 and is localized at abluminal membrane of blood-brain barrier.** *J Pharmacol Exp Ther.* v. 309, p. 1273–1281, 2004.

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

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

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

SEINO, Y. *et al.* **Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue.** *Cytokine*, v. 7, n. 6, p. 575-579, 1995.

SEKINE, T. *et al.* **Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter.** *J Biol Chem*, v. 272, p. 18526–18529, 1997.

STINGHEN, A. E. *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. 117-26, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo de diálise SBN 2013. Disponível em: http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2013-14-05.pdf. Acesso em: 05.09.2014 às 14 hrs: 37 min.

SWEET, D. H. *et al.* **Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice.** *J Biol Chem*. v. 277, p. 26934–26943, 2002.

TAHARA, H. *et al.* **Inhibition of oat3-mediated renal uptake as a mechanism for drug-drug interaction between fexofenadine and probenecid.** *Drug metabolism and disposition*, v. 34, n. 5, p. 743-747, 2006.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R. **Pathophysiologic effects of uremic retention solutes.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 10, n. 8, p. 1815-1823, 1999.

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

VANHOLDER, R. *et al.* **Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality.** *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 20, n.6, p. 1048-1056, 2005.

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

VARELA, A. M., PECOITS FILHO, R. F. S. **Interações Entre a Doença Cardiovascular e a Doença Renal Crônica.** *J Bras Nefrol.* v. 28, n. 3, 2006

VIAENE, L. *et al.* **Albumin is the main plasma binding protein for indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate.** *Biopharmaceutics & drug disposition*, v. 34, n. 3, p. 165-175, 2013.

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

WATANABE, Hiroshi *et al.* **Update on the pharmacokinetics and redox properties of protein-bound uremic toxins.** *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 100, n. 9, p. 3682-3695, 2011.

WATANABE, H. *et al.* **Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin.** *Drug Metabolism and Disposition*, v. 40, n. 7, p. 1423-1428, 2012.

WEBER, K. S. C. *et al.* **Expression of CCR2 by endothelial cells implications for MCP-1 mediated wound injury repair and in vivo inflammatory activation of endothelium.** *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 19, n. 9, p. 2085-2093, 1999.

WILCOX, C. S. **New insights into diuretic use in patients with chronic renal disease.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 13, n.3, p. 798-805, 2002.

ZHANG, Q. *et al.* **Organic anion transporter OAT1 undergoes constitutive and protein kinase C-regulated trafficking through a dynamin-and clathrin-dependent pathway.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 47, p. 32570-32579, 2008.

ZHANG, Q. *et al.* **Short-term and long-term effects of protein kinase C on the trafficking and stability of human organic anion transporter 3.** *International journal of biochemistry and molecular biology*, v. 3, n. 2, p. 242, 2012.