

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIANE FAVRETTO

AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE p -CRESIL SULFATO E INDOXIL SULFATO
POR CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS VIA TRANSPORTADORES DE
ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs)



CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GIANE FAVRETTO

AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE *p*-CRESIL SULFATO E INDOXIL SULFATO
POR CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS VIA TRANSPORTADORES DE
ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs)

CURITIBA

2016

GIANE FAVRETTO

AVALIAÇÃO DA CAPTAÇÃO DE *p*-CRESIL SULFATO E INDOXIL SULFATO
POR CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS VIA TRANSPORTADORES DE
ÂNIONS ORGÂNICOS (OATs)

Dissertação apresentada como requisito parcial para à
obtenção do título de Mestre em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Emilia Marques Stinghen.

Coorientador: Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza.

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Favretto, Giane

Avaliação da captação de p-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por células endoteliais humanas via transportadores de ânions orgânicos (OATs)./ Giane Favretto. – Curitiba, 2016.

65f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Andréa Emília Marques Stinghen

Coorientador: Wesley Maurício de Souza

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Uremia. 2. Toxinas. 3. Anions. 4. Doença renal. Título II. Stinghen, Andréa Emília Marques. III. Souza, Wesley Maurício. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 574.2



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 captação de *p*-cresil sulfato e indoxil sulfato por células endoteliais humanas via *Organic Anion transporters* (OATs)”

por

GIANE FAVRETTO

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. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki


Prof. Dr. Felype Barreto

Curitiba, 16 de fevereiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sérgio e Niva por todo amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão Fabiano por ser meu companheiro e amigo.

Ao meu amor, Rafael por sempre acreditar em meu potencial,
me incentivando e me dando suporte a cada passo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente Àquele que me presenteou com o bem mais precioso, a vida, e com ela me deu a capacidade para pensar, amar e lutar pela conquista de meus ideais. Muitas foram as lutas, maiores as vitórias, e isso porque o Senhor Deus se fez sempre presente, transformando a fraqueza em força e a derrota em vitória. Reconheço que o tempo todo o Senhor me amou e que sem a Sua misericordiosa graça e intervenção nada disso seria possível.

Aos meus pais Sérgio e Niva, e ao meu irmão Fabiano, por serem meu porto seguro durante toda essa trajetória, por me ajudarem quando eu mais precisava e por suas demonstrações inigualáveis de amor e compreensão.

Ao meu amor Rafael, por me incentivar quando algo dava errado, por ser leal, me ouvir, acreditar, me amar e comemorar comigo a cada etapa finaliza da pesquisa. Por todos os conselhos, ânimo, tempo e paciência desprendidos a mim.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Andréa Emilia Marques Stinghen, por acreditar em meu potencial, me dando a oportunidade de trabalhar com sua linha de pesquisa, me incentivando sempre a buscar um pouco mais. Agradeço ainda pelos conselhos, por abrir a minha mente em relação à pesquisa e por ser tão paciente. Por vibrar comigo a cada resultado positivo e pela sua forma simples e humilde de ser, o que a faz uma pessoa única. Por todos os ensinamentos, sabedoria e esforço. Tenho muito orgulho de ter você como minha orientadora.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza, por todo o suporte e por me ajudar em várias etapas da pesquisa.

Aos meus colegas de trabalho do LabNefro, Bruna, Paulo César, Regiane, Rayana, Juliana, Keizian e Valentina por todo o apoio e cooperação, pois a ajuda de todos foi fundamental para que tudo desse certo, por me animarem e por todos os momentos agradáveis vividos com vocês.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica especialmente à Alessandra Becker, por não medir esforços em me ajudar, à Prof^a. Dr^a. Larissa Alvarenga e Prof^a. Dr^a. Juliana de Moura, por suas constantes colaborações. Aos colegas do departamento de Bioquímica, Lauro M. Souza e Prof. Dr. Guilherme L. Sasaki, por

tornar a caracterização de nossa síntese um sucesso e por sempre estarem dispostos a ajudar. A Letícia B. Cerqueira do Departamento de Ciências Farmacêuticas, por me mostrar o divertido e complicado mundo da cromatografia.

Ao grupo "*Scientia Renal*" da PUCPR, por todas as contribuições e inspiração para que este projeto se concretizasse. Especialmente ao Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho pela liderança acolhedora, inspirando pesquisadores a seguir esta maravilhosa área da Nefrologia.

À nossa querida secretária do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Luciana Marques, por sempre estar disposta a me ajudar com os processos administrados solicitados ao longo do mestrado e por sempre me animar com seu jeito descontraído de ser.

À Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro distribuído ao Programa de Pós-Graduação.

E por fim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto.

Muito Obrigada!

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

p-Cresil Sulfato (PCS) e Indoxil Sulfato (IS) são toxinas urêmicas ligadas à proteínas, responsáveis por muitas das consequências clínicas da uremia, tais como a disfunção endotelial na doença renal crônica (DRC). Os transportadores de ânions orgânicos (OATs), representam uma família de transportadores que medeiam a absorção de uma vasta gama de moléculas e também de toxinas urêmicas por células tubulares proximais. No presente estudo investigamos a captação de PCS e IS por OAT1 e OAT3 em células endoteliais vasculares humanas. O PCS foi sintetizado a partir de seu precursor *p*-cresol através de sulfatação utilizando ácido clorossulfônico/KOH a fim de obter um sal de potássio. A caracterização do PCS foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massa (EM) e Ressonância Magnética Nuclear de H_1 e C_{13} . As células endoteliais humanas foram tratadas com as concentrações normal, urêmica e urêmica máxima de PCS (0,08, 1,75 e 2,6 mg/L) e IS (0,6, 53 e 236 mg/L) respectivamente, com e sem *Probenicid* (Pb), comumente utilizado como agente uricosúrico, e descrito como um inibidor de OATs. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A captação de PCS e IS foi avaliado em extratos de células endoteliais à 4 e 37°C por CLAE. OAT1 e OAT3 foram avaliados por *western blot* e imunocitoquímica. A expressão da quimiocina *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) foi avaliada por ELISA em sobrenadante de células endoteliais tratadas com PCS e IS com e sem Pb após cinética de 0, 3 e 6 h. A viabilidade celular diminuiu significativamente após 24 h de tratamento com PCS ($P < 0,05$) e IS ($P < 0,001$) de uma forma dose dependente para IS, e foi restabelecida após o tratamento com Pb. A captação de PCS e IS analisados por CLAE mostrou que a 37°C ocorre a internalização celular de PCS e IS, e quando o Pb foi adicionado, houve a inibição da captação para ambas as toxinas, o que sugere que os OATs estão envolvidos na captação e transporte celular de PCS e IS. Além disso, à 4°C foi observada uma internalização diminuída. A análise por *western blot* e imunocitoquímica mostraram que tanto OAT1 quanto OAT3 estão envolvidos na captação de PCS e IS em células endoteliais, com maior expressão de OAT1. A expressão de MCP-1 foi aumentada após 3 e 6 h de tratamento com PCS e IS, mas diminuiu após o tratamento com Pb. Em conclusão, PCS e IS servem como substratos para OATs em células endoteliais humanas e sua captação é mediada por estes transportadores. O bloqueio seletivo dos OATs pode servir como uma estratégia terapêutica para inibir a expressão de biomarcadores inflamatórios vasculares, tais como a quimiocina MCP-1, uma das principais moléculas no processo de aterosclerose urêmica. Nossos resultados podem ser úteis para melhor compreender os mecanismos celulares e moleculares da toxicidade urêmica em pacientes com DRC e reverter em novas estratégias terapêuticas nestes pacientes.

Palavras-chave: toxicidade urêmica, *p*-cresil sulfato, indoxil sulfato, OATs, captação.

ABSTRACT

Protein bound uremic toxins such as *p*-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) are responsible for many of the uremia clinical consequences, such as endothelial dysfunction in chronic kidney disease (CKD) patients. Organic anion transporters (OATs), are a family of transporters that mediate the uptake of a wide range of molecules, and have being enrolled in the uptake of uremic toxins on e.g. proximal tubular cells. In this study we investigated whether OAT 1 and OAT 3 are enrolled in the uptake of PCS and IS in human vascular endothelial cells. PCS was synthesized by *p*-cresol sulfatation using chlorosulfonic acid/KOH in order to obtain a potassium salt, and characterized by high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectrometry (MS) and ¹³C and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectra. Indoxyl sulfate was purchased commercially. Human endothelial cells (E.A.hy 926 - ATCC CRL 2922) were treated with normal, uremic and maximum uremic concentrations of PCS (0.08 mg/L, 1.75 mg/L and 2.6 mg/L) and IS (0.6 mg/L, 53 mg/L and 236 mg/L) respectively, with and without Probenicid (Pb), commonly used as a uricosuric agent and described as an OAT inhibitor. Cell viability was assessed by MTT. The PCS and IS up take was analyzed in endothelial cells extracts at 4°C and 37°C by High-performance liquid chromatography (HPLC). OAT 1 and OAT 3 were assessment by western blot and immunocytochemistry. Cell viability decreases after 24h of PCS ($P<0,05$) and IS ($P<0,001$) treatment in a dose dependent manner. The uptake of PCS and IS in cells extracts analyzed by HPLC, showed that at 37 °C the cell internalization occurs for PCS and IS and when Pb was added, there was no evidence of both toxins, suggesting that OATs are involved in the active cellular transport of PCS and IS. In addition no uptake activity was noted at 4°C. Western blot and immunocytochemistry analysis showed that both OAT1 and OAT3 are involved in the uptake of PCS and IS in endothelial cells, with larger contribution by OAT1. MCP-1 expression increased after 3 and 6h of PCS and IS treatment, but decreased after Pb treatment. In conclusion, PCS and IS serve as OATs substrates in human endothelial cells and their uptake is mediated by OATs. The selective blockage of OATs could serve as a therapeutic strategy to inhibit he expression of vascular inflammatory biomarkers, such as Protein MCP-1, one of the main molecules in the uremic atherosclerosis process. Our findings could be useful to better understand the cellular and molecular mechanisms of uremic toxicity in CKD patients.

Key-words: uremic toxicity, *p*-cresyl sulfate, indoxyl sulfate, OATs, uptake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do <i>p</i> -cresol e seus conjugados.....	20
Figura 2 – Formação do <i>p</i> -cresil sulfato e ligação à Albumina Sérica Humana.	21
Figura 3 – Formação do indoxil sulfato.	23
Figura 4 – Eventos leucocitários na inflamação.	25
Figura 5 – OAT e seus domínios.....	26
Figura 7 – OATs e sua distribuição nos diversos órgãos do organismo.....	27
Figura 6 – Estrutura química do Probenicid.	28
Figura 8 – Formação do sal de potássio.	31
Figura 9 – Representação esquemática da síntese do <i>p</i> -cresil sulfato (PCS). A reação foi acompanhada por análise por LC-PDA-MS.....	39
Figura 10 – Viabilidade celular PCS.....	40
Figura 11 – Viabilidade celular IS.....	41
Figura 12 – Efeito do PCS e IS na coloração por imunocitoquímica para OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas.	42
Figura 13 – Western blotting para OAT1.....	43
Figura 14 – Western blotting para OAT3.....	44
Figura 15 – Cromatogramas de captação de PCS e IS via OATs.....	45
Figura 16 – Captação do PCS e IS.	46
Figura 17 – Efeito do PCS na produção de MCP-1 em células endoteliais.....	47
Figura 18 – Efeito do IS na produção de MCP-1 em células endoteliais.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento da doença renal crônica (DRC).	16
--------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	–	<i>Bovin serum albumin</i>
CV	–	Coeficiente de Variação
CL-UV-EM	–	Cromatografia Líquida/ Ultra Violeta/ Espectro de Massa
DCV	–	Doença cardiovascular
DRC	–	Doença renal crônica
ELISA	–	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPM	–	Erro padrão da média
hOAT	–	Transportadores de ânions orgânicos em humanos
ICAM-1	–	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IL-8	–	Interleucina-8
MCP-1	–	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MTT	–	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
OAT	–	Transportadores de ânions Orgânicos
Pb	–	<i>Probenecid</i>
PBS	–	Tampão salino fosfato
PC	–	<i>p</i> -cresol
PCG	–	<i>p</i> -cresil glucoronidato
PCS	–	<i>p</i> -cresilsulfato
PFA	–	Paraformaldeído
rOAT	–	Transportadores de ânions orgânicos em ratos
TFG	–	Taxa de filtração glomerular
VCAM-1	–	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)	16
2.2 TOXINAS URÊMICAS	18
2.2.1 <i>p</i> -Cresol e <i>p</i> -Cresil Sulfato	19
2.2.2 Indoxil Sulfato.....	22
2.3 UREMIA, INFLAMAÇÃO E ATROSCLEROSE	24
2.4 OATs	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL.....	30
4.2 MÉTODOS	30
4.2.1 Cultura Celular	30
4.2.2 Síntese e purificação e caracterização do PCS	31
4.2.3 Tratamento das células com PCS e IS.....	33
4.2.4 Ensaio de viabilidade celular	33
4.2.5 Imunocitoquímica para detecção de OAT1 E OAT3.....	34
4.2.6 Western Blotting para detecção de OAT1 e OAT3.....	34
4.2.7 Captação celular de PCS e IS e condições de CLAE.....	35
4.2.8 Expressão de MCP-1	36
4.2.9 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS.....	38

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE PCS.....	38
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	39
5.3 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE OAT1 E OAT3	41
5.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING PARA DETECÇÃO DE OAT1 E OAT3.....	42
5.5 CAPTAÇÃO DE PCS E IS.....	44
5.6 EXPRESSÃO DE MCP-1	46
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	64

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) ganha cada vez mais importância por atingir de forma negativa e impactante boa parte da população mundial. A DRC é caracterizada pela perda lenta e progressiva da função dos rins de forma irreversível, desta forma a excreção de inúmeros compostos é prejudicada (BARRETO et al., 2014a). Com a progressão da DRC, os rins perdem a capacidade de filtração e remoção de solutos tóxicos presentes no sangue, conhecidos como toxinas urêmicas que, por sua vez, acumulam-se no organismo levando a um estado chamado de uremia (STINGHEN; PECOITS-FILHO, 2011; VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008).

O ambiente urêmico desencadeia uma resposta inflamatória que induz alterações fenotípicas nas células endoteliais. Essas disfunções levam a danos cardiovasculares, tais como aterosclerose, que é responsável pela alta taxa de morbimortalidade nos pacientes com DRC (BRO et al., 2004; DEVINE et al., 2014; GLORIEUX; VANHOLDER, 2011; VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008; ZOJA et al., 2002). A principal causa de morte em pacientes com DRC, especialmente aqueles que estão em diálise, é a doença cardiovascular (DCV). A disfunção endotelial e a calcificação vascular desempenham um papel importante na patogênese e morbimortalidade da DCV que está estreitamente relacionada à DRC (LEE et al., 2012; WATANABE et al., 2015).

As toxinas urêmicas nem sempre conseguem ser removidas por terapias renais substitutivas tais como a diálise peritoneal e a hemodiálise. Vários estudos relacionados à fisiopatologia da DRC conduzem à hipótese de que toxinas ligadas à proteínas sejam um importante fator para a progressão desta doença (NIWA, 2010; POESEN et al., 2013). Solutos urêmicos como indoxil sulfato (IS) e *p*-cresil sulfato (PCS) são classificados como toxinas urêmicas de baixo peso molecular que se ligam à proteínas, e são difíceis de remoção, promovendo vários efeitos deletérios no organismo (ITOH et al., 2013; VANHOLDER et al., 2001, 2003a, 2009). As toxinas urêmicas são excretadas através do túbulo proximal do rim e se acumulam no sangue de pacientes com insuficiência renal (BARRETO et al., 2014b). Estudos demonstraram que PCS e IS foram associados com o aumento da mortalidade e

DCV em pacientes com DRC em vários estágios da doença (BAMMENS *et al.*, 2006; LIABEU *et al.*, 2009).

Dados da literatura demonstram que o ambiente urêmico leva a alterações em células endoteliais, que se tornam capazes de sintetizar e expressar moléculas de adesão, tais como a *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) e *intercelular adhesion molecule-1* (ICAM-1), e quimiocinas, tais como *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e interleucina-8 (IL-8) em tempo e uremia dependentes (STINGHEN *et al.*, 2009), moléculas envolvidas no processo aterogênico. Ainda, demonstrou-se que a IL-8 e MCP-1 podem ser expressos por células endoteliais estimuladas por mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas e lipopolissacarídeos, dependendo da atividade do fator de transcrição NF- κ B (ZOJA *et al.*, 2002).

Transportadores medeiam a secreção e reabsorção de diversos compostos pelo rim, e, portanto, influenciam nos níveis dos seus substratos no plasma. Em pH fisiológico, solutos urêmicos, entre muitas outras substâncias orgânicas, estão sob a forma de ânions (PRICHARD *et al.*, 1996). OATs são transportadores envolvidos na eliminação de diversos compostos, dentre eles toxinas urêmicas. Os OATs pertencem à família de genes transportadores de soluto (SLC), especificamente SLC22A, e atualmente pelo menos dez isoformas de OATs foram identificados (BURCKHARDT, 2012; SAITO, 2010; WOLFF *et al.*, 2003). A absorção de compostos urêmicos pelos rins tem sido associada a OAT1 e OAT3, que podem ser encontrado na membrana basolateral do tubo proximal renal (ANZAI; KANAI; ENDOU, 2006; CHA *et al.*, 2001; NAGLE *et al.*, 2011).

Considerando a possibilidade de captação das toxinas urêmicas por células endoteliais via OAT1 e OAT3, a qual induz a uma resposta inflamatória contribuindo para o desenvolvimento da aterosclerose em pacientes com DRC, o presente estudo visa analisar a expressão de OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas, e esclarecer os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na progressão da DCV permitindo a descoberta de novos alvos terapêuticos, visando uma maior sobrevida do paciente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

Segundo o *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) em seu documento *KDIGO Clinical Practice Guide line for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease* publicado em 2012, a DRC pode ser definida como a presença de lesão renal por tempo igual ou superior a três meses, sendo estas acompanhadas por anormalidades funcionais dos rins. As anormalidades incluem diminuição taxa de filtração glomerular ($TFG < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$), ou evidência de um ou mais marcadores de danos nos rins como a albuminúria, anormalidades de sedimento na urina, anormalidades eletrolíticas, anomalias detectadas pela histologia e imagem, ou histórico do transplante renal. A perda da capacidade funcional dos rins de forma lenta e progressiva a qual é característica da DRC tem como consequência o desenvolvimento da uremia nos pacientes. Considerando a TFG, é possível caracterizar os pacientes dentro os cinco estágios da progressão da DRC, sendo o terceiro dividido em estágio A e B, como apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Estadiamento da doença renal crônica (DRC).

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73m ²)
1	Lesão renal com TFG normal ou aumentada	≥90
2	Lesão renal com leve diminuição da TFG	60–89
3a	Lesão renal com média à moderada diminuição da TFG	45–59
3b	Lesão renal com moderada à severa diminuição da TFG	30–44
4	Lesão Renal com Severa diminuição da TFG	15–29
5	Falência renal ou em terapia substitutiva	<15

Fonte: NKF (2012).

A doença renal crônica (DRC) é um importante e crescente desafio enfrentado pelos profissionais de saúde, sendo a prevalência estimada em uma variação 8 e 16% em todo o mundo. Cerca de 80% dos casos da doença foi observado em países desenvolvidos, havendo um padrão de aumento na incidência da doença em países com diversidades econômicas. As taxas de prevalência da DRC estão aumentando globalmente, principalmente como consequência da incidência aumentada de diabetes, hipertensão e envelhecimento da população (JHA *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2012; SUN; CHANG; WU, 2012).

Embora haja avanços significativos na terapia de diálise e na compreensão da fisiopatologia da DRC, a taxa anual de mortalidade de pacientes portadores de DRC é extremamente elevada, estima-se cerca de 25 milhões de mortes ao ano, tendo como principal causa de morte as complicações relacionadas à doença cardiovascular (DCV) (COHEN; HORL, 2012; HAUSER *et al.*, 2008). A incidência de DCV em pacientes com DRC está associada com a retenção de solutos urêmicos e com o efeito tóxico da uremia, levando tais pacientes a uma maior taxa de mortalidade mesmo nos primeiros estágios da doença (KNEIS *et al.*, 2013; VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008).

De acordo com o censo nacional da Sociedade Brasileira de Nefrologia estimativa-se que cerca de 100 mil pacientes brasileiros estiveram em tratamento dialítico em 2013, tendo um aumento de 2,8% de pacientes em tratamento se comparado ao ano de 2012. A faixa etária de maior percentual de pacientes em diálise é dos 19 ao 64 anos, sendo as outras faixas etárias menos atingidas pela doença (CENSO SBN, 2013). Em relação ao diagnóstico das doenças renais primárias, as mais frequentes, em 2013, foram hipertensão arterial (35%) e diabetes (30%), seguidos por glomerulonefrite crônica (12%) e rins policísticos (4%); outros diagnósticos foram feitos em 12% e este foi indefinido em 8% dos casos. Não houve alteração significativa nesses percentuais nos últimos 3 anos. A Nefropatia hipertensiva (35%) seguida pelo diabetes (30%) são as principais doenças de base nos pacientes prevalentes (SESSO *et al.*, 2014).

A progressão DRC, leva à perda da capacidade dos rins de eliminarem compostos urêmicos da circulação. O acúmulo desses solutos urêmicos é conhecido como “estado urêmico”. Um dos efeitos tóxicos da uremia é a produção de respostas inflamatórias que acabam acelerando o desenvolvimento da DRC, tais como a

aterosclerose (BRO *et al.*, 2004; GLASSOCK, 2008). Além disso, podem ser observadas outras disfunções sendo as principais a anemia, disfunção imune, resistência insulínica, inflamação, desordens de coagulação, pericardite e hipertensão. É importante salientar que em pacientes portadores de DRC muitos desses efeitos tais como a inflamação e anemia, têm um impacto significativo sobre o *status* cardiovascular, podendo levar o paciente ao óbito. Diante deste quadro clínico a DCV confere a principal causa de mortalidade em pacientes com DRC (VANHOLDER; VAN LAECKE; GLORIEUX, 2008).

O diagnóstico de pacientes com DRC muitas vezes é realizado em estágios mais avançados da doença, pois a mesma é assintomática em estágios iniciais. Contudo, o retardo da DRC depende do diagnóstico precoce e da qualidade do tratamento nos primeiros estágios da doença (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

2.2 TOXINAS URÊMICAS

Toxinas urêmicas são grupos de substâncias tais como peptídeos e compostos orgânicos os quais em condições normais são excretados pelos rins, mas são retidos quando a função renal está prejudicada (STINGHEN *et al.*, 2009). Para que uma toxina urêmica seja autêntica ela deve ser identificada e caracterizada quimicamente; quantificada em fluidos corporais; ter seu nível aumentado e uma relação em um ou mais sintomas da uremia quando o paciente encontra-se em estado urêmico; ter os níveis corporais reduzidos dessa toxina quando o paciente obtiver uma melhora no quadro clínico da uremia, e por fim reproduzir *in vivo* ou *in vitro* os efeitos urêmicos semelhantes aos encontrados na uremia. Além desses critérios o mecanismo patobiológico deve ser demonstrado de forma a elucidar a ligação entre a toxina e o quadro de uremia (GLASSOCK, 2008).

De acordo com a data base do *European Uremic Toxins Work Group* (EUTox) (<http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>) existem atualmente mais de 153 solutos urêmicos listados e, certamente, um aumento neste número pode ser esperado. Estas toxinas podem ser classificadas como:

- Solutos livres e solúveis em água com peso molecular inferior ou igual a 500 Da. Protótipos desse grupo incluem a ureia e a creatinina, sendo estas removidas facilmente por diálise.

- Moléculas médias com peso molecular maior que 500 Da. Tais como β 2-microglobulina e a leptina, grande parte dos compostos desse grupo são peptídeos e somente removíveis por membranas de porosidade grande, essas toxinas podem afetar um grande número de órgãos e sistemas do organismo.

- Solutos ligados às proteínas tais como IS e PCS são classificados como baixo peso molecular, são de difícil remoção por diálise e promovem diversas atividades tóxicas ao organismo (GLORIEUX; VANHOLDER, 2011; ITOH *et al.*, 2013; VANHOLDER *et al.*, 2001, 2003b).

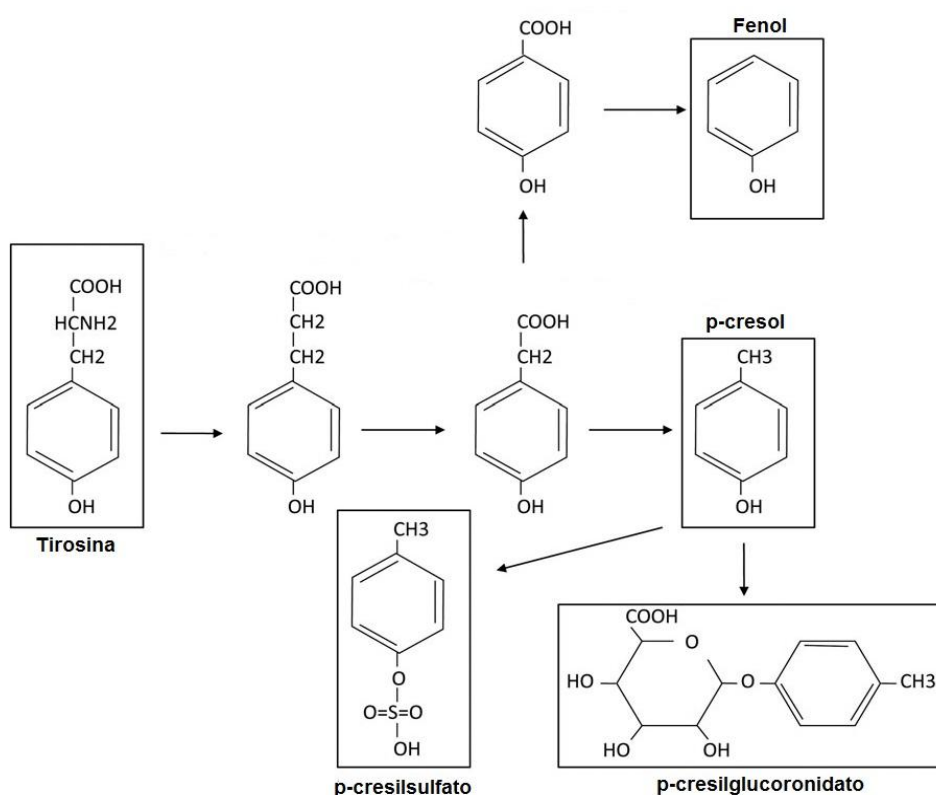
As toxinas urêmicas, principalmente as de baixo peso molecular, após serem absorvidas ligam-se à proteínas principalmente à Albumina Sérica Humana (HSA), e nem sempre são removidas de forma eficaz do organismo de pacientes com DRC, através de terapias substitutivas como a diálise peritonial e a hemodiálise. Essas toxinas acabam acumulando no organismo causando inúmeros efeitos deletérios. Diversos estudos têm investigado o papel fisiológico de toxinas urêmicas ligadas à proteínas, tais como os compostos PC, PCS e IS, que surgiram como alvos importantes da terapêutica e têm atraído maior interesse de estudo nos últimos anos devido à toxicidade destes compostos em potencial (ITOH *et al.*, 2013; POVEDA *et al.*, 2013; WATANABE *et al.*, 2012).

2.2.1 *p*-Cresol e *p*-Cresil Sulfato

O PC (4 - metilfenol) de fórmula química C_7H_8O , é uma toxina urêmica com peso molecular de 108 Da, ligada principalmente a proteínas séricas, a qual exerce vários efeitos deletérios ao organismo. Esta molécula é formada a partir da dieta rica em tirosina e fenilalanina. Esses aminoácidos são metabolizados em ácido 4-hidroxifenilacético, através da fermentação pela microbiota bacteriana presente no intestino grosso, tais como enterobactérias e *Clostridium perfringens*. O *Clostridium difficile* (bactéria patogênica) é capaz de descarboxilar o ácido 4-hidroxifenilacético

através da enzima *p*-hidroxifenil acetato descarboxilase (pHPA), formando o PC (Figura 1). Durante a sua passagem através da mucosa do cólon e do fígado, sofre processos de conjugação (sulfatação e glucuronidação) formando dois compostos, sendo eles o PCS e *p*-cresil glucuronidato (PCG) (BARRETO et al., 2014b; JOURDE-CHICHE et al., 2011; MEIJERS; EVENEPOEL, 2011a; SELMER; ANDREI, 2001; VANHOLDER; DE SMET; LESAFFER, 1999).

Figura 1 – Formação do *p*-cresol e seus conjugados.



Fonte: Vanholder *et al.* (2011).

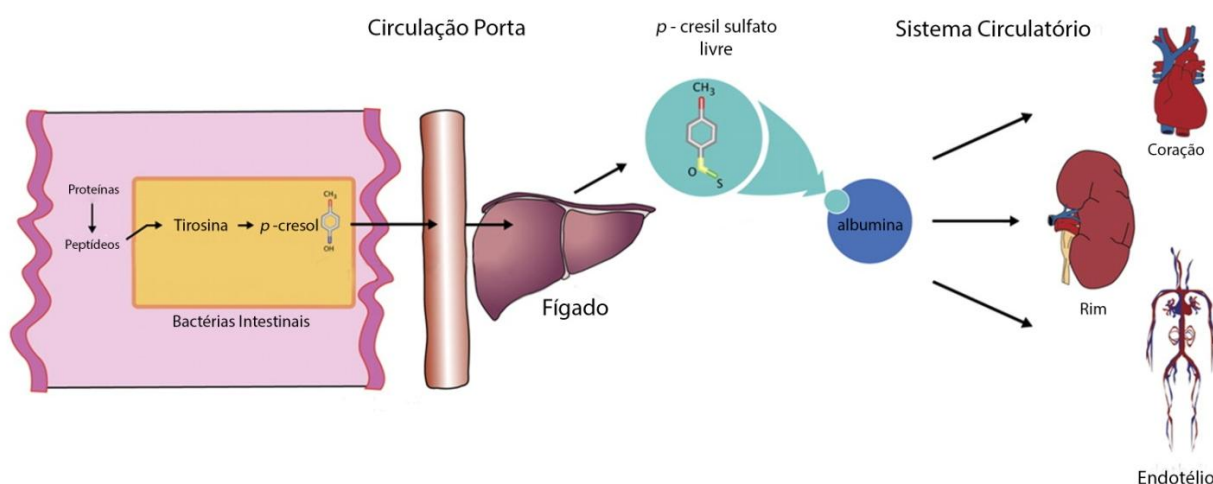
Nota: Tirosina provinda da dieta é metabolizada formando *p*-cresol o qual é sulfatado ou glucuronisado no fígado formando *p*-cresil sulfato ou *p*-cresil glucuronidato.

Em pacientes com DRC é possível encontrar os dois derivados de PC, tanto em sua forma conjugada como não conjugada. O PC em sua forma não-conjugada é detectável no plasma humano normal e urêmico em quantidades inferiores a 40,70 mg/L. A maior parte do PC gerado aparece na circulação como PCS, enquanto que uma fração menor é de PCG. Estudos recentes mostram que PC sofre uma rápida metabolização, fazendo com que o PCS seja encontrado em uma concentração

muito superior que a de seu precursor, desta forma, considera-se o PCS como o principal responsável pelo efeito biológico em condições urêmicas (BARRETO et al., 2014b; LIABEUUF et al., 2013; LOOR et al., 2005; MARTINEZ et al., 2005; VANHOLDER et al., 2011a).

O *p*-cresil sulfato (PCS) proveniente da sulfatação de PC, é um composto orgânico, com fórmula química $C_7H_8O_4S$, de peso molecular 187 Da, com alta afinidade por proteínas séricas, principalmente a albumina sérica humana (HSA) (Figura 2). O PCS liga-se ao sítio I que se localiza no subdomínio 2A (também conhecido como o sítio de ligação a varfarina) que serve como ligação para substâncias endógenas e exógenas, incluindo drogas (MEIJERS; BAMMENS; VERBEKE, 2008; MEIJERS; EVENEPOEL, 2011b; WATANABE *et al.*, 2012).

Figura 2 – Formação do *p*-cresil sulfato e ligação à Albumina Sérica Humana.



Fonte: Adaptado de Meijers *et al.* (2011).

Nota: Após *p*-cresil sulfato é sulfatado no fígado, *p*-cresil sulfato liga-se a albumina e circula pelo organismo causando danos em diversos órgãos como o coração, o rim e o endotélio.

A concentração de PCS no sangue de indivíduos saudáveis é baixa, cerca de 6 μ M, mas aumenta para valores superiores 300 μ M em pacientes em estágio final de DRC. A fração total máxima de PCS encontrada num paciente com uremia é de 105 mg/L, com média equivalente a 43 mg/L. Já a média da fração livre de PCS é igual a 2,6 mg/L. O acúmulo de PCS tem sido associado com comprometimento de lesões vasculares, mortalidade, e ativação de leucócitos na produção de radicais livres. A eliminação desta toxina através de hemodiálise é pobre, sendo removida somente cerca de 29% da mesma, fato que tem sido atribuído à sua forte ligação a

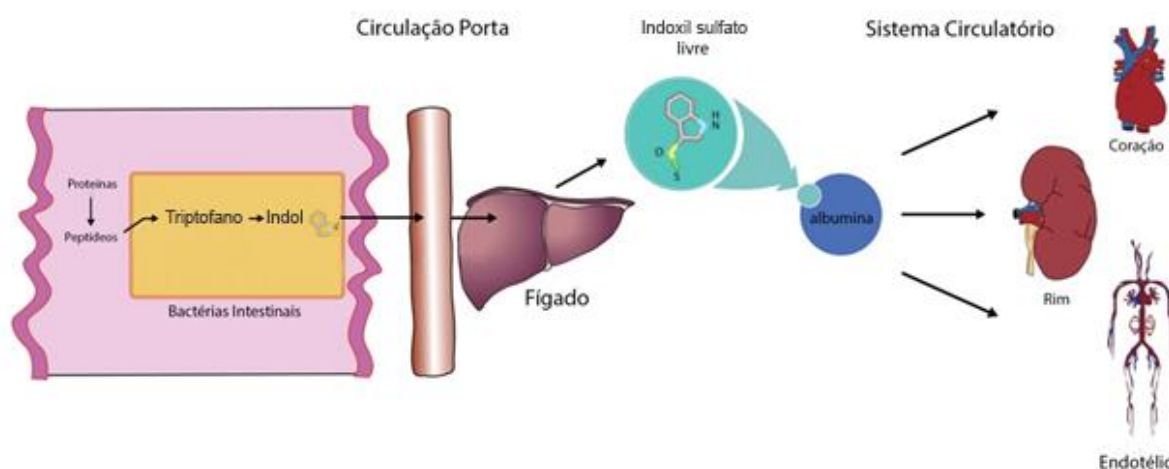
proteínas plasmáticas (BERGE´-LEFRANC *et al.*, 2010; VANHOLDER *et al.*, 2011a, 2014).

Recentemente foi demonstrado que o PCS induz a formação de micropartículas endoteliais, mesmo na ausência de danos endoteliais clinicamente evidentes em pacientes submetidos à hemodiálise, o que sugere fortemente um papel importante de PCS na disfunção endotelial (MEIJERS; VAN; VERBEKE, 2009). Além disso, dados mostraram que PCS tem efeitos pró-apoptóticos e pró-inflamatórios sobre as células epiteliais tubulares proximais humanas, os quais podem em conjunto com outros fatores levar ao estresse oxidativo, promovendo a progressão da DRC (POVEDA *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* demonstraram aumento da formação de radicais livres e resposta pró-inflamatória produzidos por leucócitos após a exposição ao PCS em ambiente urêmico, o que sugere que PCS pode contribuir para a propensão do dano vascular em pacientes com DRC (SCHEPERS *et al.*, 2007).

2.2.2 Indoxil Sulfato

O IS é uma toxina urêmica com baixo peso molecular de 213,21 Da, com fórmula química $C_8H_7NO_4S$, é derivado de proteínas provindas da dieta, sendo um indol derivado do aminoácido triptofano metabolizado através da ação de bactérias intestinais (Figura 3). Normalmente é excretado pelos rins através da secreção tubular proximal, com uma taxa de excreção média variando de 50–70 mg/dia, em pessoas saudáveis (BOLATI *et al.*, 2013). No entanto em estado de uremia, a depuração renal inadequada de IS leva a um aumento dessa toxina no organismo. Estudos relatam que cerca 90% do IS presente em pacientes urêmicos encontra-se ligado à proteínas principalmente a HSA. O acúmulo de IS no organismo aumenta consideravelmente a concentração desta toxina no soro de pacientes em terapia renal substitutiva, como resultado da disfunção renal ou remoção ineficaz por hemodiálise tradicional (NIWA, 2010; NIWA *et al.*, 1988).

Figura 3 – Formação do indoxil sulfato.



Fonte: Adaptado de Meijers *et al.* (2011).

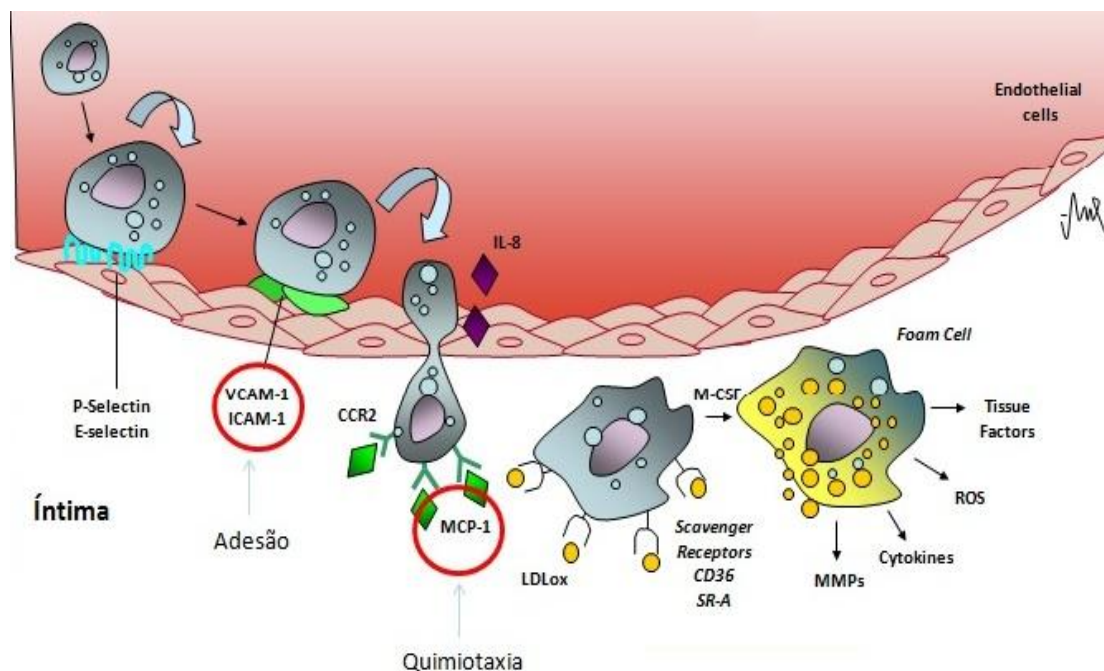
Nota: O triptofano provindo da dieta é metabolizado em indol, o qual é sulfatado no fígado formando indoxil sulfato, o qual em condições normais é excretado pelos rins.

Dados clínicos demonstraram que há um aumento gradual na concentração sérica de IS em pacientes portadores da DRC ao longo dos estágios da doença, sendo esta diretamente associada com calcificação de aorta e rigidez vascular (BARRETO *et al.*, 2009). Em ratos do tipo Sprague-Dawley com insuficiência renal, altas concentrações de IS induziu o estresse oxidativo na aorta e nos rins (KOIZUMI *et al.*, 2014), e Yang *et al.* (2015) demonstraram que a produção de óxido nítrico (NO) e óxido nítrico sintase endotelial fosforilado (eNOS) diminuiu, enquanto a produção de MCP-1 aumentou significativamente em células endoteliais humanas tratadas com IS (YANG *et al.*, 2012). Estudos demonstram ainda que o mecanismo pelo qual IS gera este estresse envolve seu transporte para dentro da célula através de OATs (OAT1 e OAT3), na qual a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) ativa células endoteliais, tubular renal e células mesangiais glomerulares. Embora seja um composto bastante pequeno, a remoção do IS por hemodiálise é prejudicada devido à ligação de proteínas maiores, o que em contraste com a toxina livre são impedidas de passarem por membranas de diálise (DEVINE *et al.*, 2014; KOIZUMI *et al.*, 2014). Além disso, as interações leucócito-endotélio são reforçadas através do aumento da expressão de selectina e estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que as toxinas urêmicas estão envolvidos na inflamação vascular em doentes com disfunção renal (ITO *et al.*, 2010).

2.3 UREMIA, INFLAMAÇÃO E ATEROSCLEROSE

O ambiente urêmico pode desencadear uma série de alterações fenotípicas ao endotélio. A disfunção endotelial é um evento comumente descrito na doença renal tanto aguda como crônica. Nas fases iniciais da aterosclerose, ocorre o estímulo de células endoteliais, essas células passam a produzir moléculas pró-inflamatórias (COHEN *et al.*, 2007; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002). A agressão constante através do acúmulo de toxinas urêmicas, promove o aumento da expressão de marcadores de ativação endotelial no plasma tais como *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) e interleucina 8 (IL-8). A MCP-1 é uma quimiocina produzida por células endoteliais, leucócitos, células de músculo liso, fibroblastos e monócitos, seu receptor é o CCR2, pertence à família das C-C citocinas sendo responsável pela quimiotaxia dos monócitos para a camada íntima do vaso durante os primeiros estágios do processo aterogênico (Figura 4). Várias citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de MCP-1, tais como a TGF- β e IL-1. (BOISVERT *et al.*, 1998; ELMARAKBY; SULLIVAN, 2010; GERSZTEN *et al.*, 1999; LANDIN BORING, JENNIFA GOSLIN, MICHAEL CLEARY CHARO, 1998). A MCP-1 tem um papel importante na progressão da aterosclerose. Eventos paralelos também são mediados pela resposta inflamatória do vaso, tais como a calcificação vascular (IKEDA U1, MATSUI K, MURAKAMI Y, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2014; STINGHEN *et al.*, 2009, 2010; VANHOLDER *et al.*, 2005).

Figura 4 – Eventos leucocitários na inflamação.



Fonte: Stingham *et al.* (2009).

Nota: A disfunção endotelial faz com que as células endoteliais expressem em sua superfície moléculas de adesão que permitem aos monócitos sanguíneos rolarem (P-Selectina e E-selectina) e se aderirem a camada íntima (VCAM-1 e ICAM-1), estimulados por um gradiente quimiotático x haptotático mediado por quimiocinas (IL-8 e MCP-1). Os monócitos diferenciam-se em macrófagos, expressam receptores *scavengers* e englobam partículas lipídicas (LDLox), tornando-se *foam cells*, capazes de secretar citocinas, fatores tissulares, espécies ativas de oxigênio (ROS) e metaloproteinases (MMPs).

Estudos desenvolvidos por nosso grupo demonstraram o aumento da expressão de MCP-1 e VCAM-1, com a exposição às toxinas urêmicas em condições de uremia (STINGHEN; RIELLA; PECOITS-FILHO, 2010; STINGHEN *et al.*, 2009). Ainda, pacientes com angina instável e pós-infarto agudo do miocárdio, apresentam níveis plasmáticos elevados de MCP-1. Do ponto de vista clínico, esses níveis estão associados a dislipidemias, eventos cardiovasculares, sendo apontado como um mediador da inflamação do endotélio em pacientes com disfunção renal e coronariopatia (ELMARAKBY; SULLIVAN, 2010; IKEDA U1, MATSUI K, MURAKAMI Y, 2002; KOLATTUKUDY; NIU, 2012).

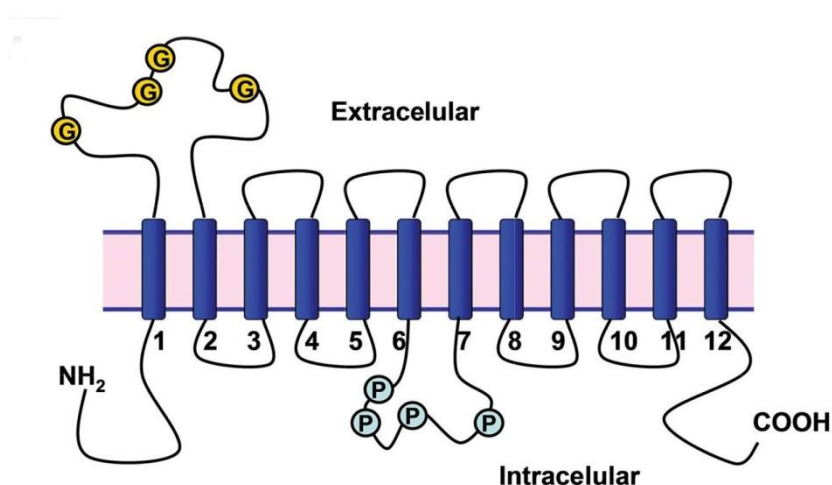
Dados prospectivos sugerem fortemente que a ativação endotelial e inflamação vascular podem ocorrer no início do processo aterosclerótico e que os níveis séricos elevados de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1) são preditores de futuros eventos cardiovasculares e DRC na população em geral. Alguns

estímulos como o estresse oxidativo também podem induzir a produção de MCP-1. Além disso, a expressão de moléculas de adesão tem sido demonstrada em placas ateroscleróticas humanas sendo fortemente associada com o acúmulo de leucócitos, havendo uma forte correlação entre os níveis de quimiocinas e eventos cardiovasculares, tais como infarto agudo do miocárdio, angina instável e mortalidade em pacientes em diálise (KOLATTUKUDY; NIU, 2012; STINGHEN *et al.*, 2009).

2.4 OATs

Os OATs são a principal classe de transportadores de secreção no rim, são pertencentes à família de genes carreadores de solutos (SLC), especificamente a SLC22A, e são compostos de cerca de 540–560 aminoácidos compreendendo 12 domínios transmembrânicos, sendo dois pares de 6 domínios transmembranares ligados por um laço grande intracelular e ambos NH₂ e COOH terminais são intracelulares (Figura 5). Já foram descritos cerca de dez Isoformas de OATs do tipo OAT1-10, que juntamente com o URAT1 compõem a família dos OATs (BURCKHARDT; WOLFF, 2000; BURCKHARDT, 2012; SAITO, 2010).

Figura 5 – OAT e seus domínios.



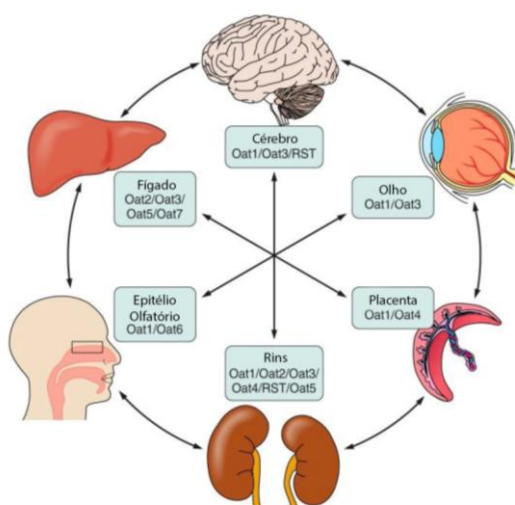
Fonte: Adaptado de Nigam *et al.* (2015).

Nota: G, locais de glicosilação; P, locais de fosforilação.

A captação renal de ânions orgânicos foi caracterizada por OAT1 e OAT3 na membrana basolateral, dos túbulos proximais renais. Os OAT1 e OAT3 desempenham principalmente a função da captação de substratos pelos rins e, portanto, são elementos fundamentais na regulação da distribuição de drogas, toxinas, e metabólitos entre o sangue e urina (NAGLE *et al.*, 2011). Os substratos de OAT1 incluem vários medicamentos, como anti-inflamatórios não estereoidais, *p*-aminohipurato (PAH), os antibióticos β -lactâmicos, ocratoxina A, diuréticos, drogas antivirais, metotrexato e compostos endógenos, tais como as toxinas urêmicas, nucleotídeos cíclicos, dicarboxilatos e prostaglandinas, enquanto os substratos de OAT3 incluem 3-hidroxi-3-metilglutaril-COA redutase, receptores antagonistas de H₂ (cimetidina), antibióticos β -lactâmicos (benzilpenicilina), compostos endógenos, tais como os solutos urêmicos e esteroides conjugados (E1s, E217 β Ge DHEAS) (YE *et al.*, 2013).

A maioria dos OATs é encontrada na barreira epitelial, no cérebro, olhos, placenta, rins, sistema olfativo, e fígado (Figura 7). Nestes tecidos, os OATs estão envolvidos na absorção de substratos aniônicos incluindo metabólitos, toxinas e drogas (NIGAM *et al.*, 2015). No entanto, não há evidências diretas da demonstração da expressão de OATs em células endoteliais humanas.

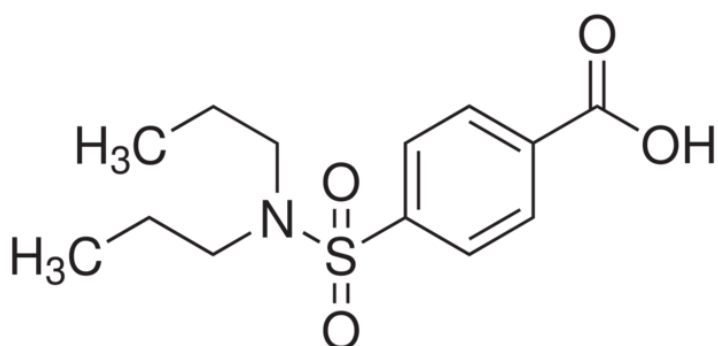
Figura 6 – OATs e sua distribuição nos diversos órgãos do organismo.



Fonte: Adaptado de Nigam *et al.* (2015)

O Pb é uma droga derivada do ácido benzóico (Figura 6), sendo altamente lipossolúvel, possui fórmula molecular $C_{13}H_{19}NO_4S$, utilizada primeiramente a fim de reduzir a secreção tubular da penicilina e terapeuticamente como um agente uricosúrico (BEYER KH, RUSSO HF, TILLSON EK, MILLER AK, VERWEY WF, 1951). Estudos evidenciam que Pb é um inibidor comum de OAT, sendo amplamente utilizado como inibidor em estudos in vitro de análise de sistemas de transporte (ENOMOTO et al., 2002b; MONIEN et al., 2009).

Figura 7 – Estrutura química do Probenicid.



Fonte: O autor, 2016.

Hipoteticamente o PCS e IS podem servir como substratos para OATs em células endoteliais humanas, por desempenharem um papel chave no *uptake* dessas toxinas urêmicas, levando desta forma ao desenvolvimento de processos inflamatórios, tais como os encontrados na aterosclerose. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliara expressão de OAT1 e OAT3, bem como a captação de PCS e IS por esses transportadores. Espera-se que os resultados obtidos favoreçam a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em todo o processo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- O presente estudo teve como objetivo avaliar a captação de PCS e IS por células endoteliais humanas via OAT1 e OAT3.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar o PCS a partir de seu precursor PC, purificar e identificar por métodos espectrométricos e espectrocópicos;
- Avaliar a viabilidade celular das células endoteliais humanas após tratamento com PCS e IS na presença ou ausência de *Probenicid* (Pb);
- Avaliar a expressão de OAT1 e OAT3 por imunocoloração e *Western Blotting* em células endoteliais após a exposição ao PCS e IS com e sem Pb;
- Avaliar a captação de PCS e IS pelo método de CLAE via OAT1 e OAT3;
- Avaliar a expressão de MCP-1 em sobrenadante de células endoteliais através do método de ELISA, após tratamento com PCS e IS com e sem Pb.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foi utilizado a linhagem comercial de células endoteliais humanas *EA.hy 926* (ATCC CRL 2922). As células EA.hy 926 são proveniente de uma fusão de HUVEC (do inglês, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) e célula epitelial tumoral A549, resultando em um hibridoma (EDGELL *et al.* 1983). As células foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), sendo amplamente utilizadas em estudos *in vitro*.

4.2 MÉTODOS

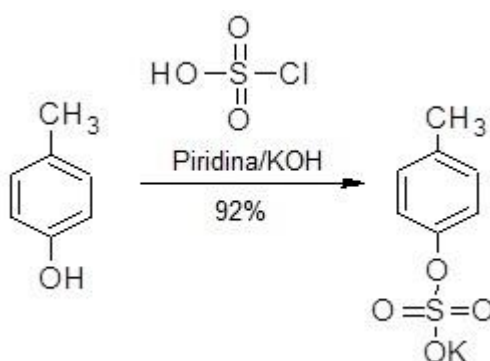
4.2.1 Cultura Celular

As células endoteliais foram mantidas em frascos de cultivo contendo meio DMEM (*Life Technologies*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, EUA) e 10.000 UI/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA). Os frascos foram mantidos em incubadora à 37°C com 5% de CO₂, até atingir confluência. O meio foi trocado a cada 4 dias, quando as células foram então submetidas à tripsinização.

4.2.2 Síntese e purificação e caracterização do PCS

O precursor do PCS, o PC e IS foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A síntese de PCS foi realizada por reação de PC em banho de gelo (10 g, 0,084 M) com clorofórmio e piridina (2:1). A sulfatação foi realizada com ácido clorossulfônico adicionado gota a gota com agitação constante (10 mL, 0,129 M). A mistura foi tornada alcalina com forte solução de hidróxido de potássio (20 M) resultando em um sal de éster potássico, como mostrado na Figura 8 (FEIGENBAUM; NEUBER, 1941). A parte sólida foi filtrada por sucção através de um papel de filtro em um funil de Buchner por sucção e lavado cuidadosamente com éter. O sal de éster foi extraído a partir do resíduo com álcool etílico quente (95%).

Figura 8 – Formação do sal de potássio.



Fonte: O autor, 2015.

O composto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel, 60-230 mesh (1:20, Merk, Darmstadt, Alemanha), aumentando a polaridade do eluente, iniciando com clorofórmio (100%) e, em seguida, com aumento na proporção de metanol (frações F1-8) resultando no PCS (2,56 g, 92%) tal como um sólido branco (Figura 8). A purificação do PCS foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), enquanto que a caracterização química foi realizada por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência e espectrometria de massa de alta resolução UHPLC-HRMS e ressonância magnética nuclear (RMN). As soluções estoque foram preparadas nas concentrações de 1000 mg/L e 5000 mg/L,

diluídas em tampão fosfato de Krebs-Ringer (KRP) e armazenadas a -20°C . As concentrações finais de PCS utilizadas (0,08; 1,75; e 2,6 mg/L) foram obtidas a partir da diluição da solução estoque em meio de cultivo apropriado (KRP).

A fim de monitorar as etapas de purificação, as frações (F1-8) foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (ProStar, Varian) com bomba binária ProStar 230 na detector de arranjo de fotodiodo 335. A cromatografia de fase reversa foi desenvolvida com Microsorb MV 100 C18 (250 x 4,6 mm), tamanho da partícula 5 μm (CicaMerk, Tóquio, Japão) desenvolvida em metanol 100% (A) e 50 mM de formiato de amônio (B) com o seguinte gradiente de concentração B: 65-25% (0-15min) e 25-65% (15-20 min). A amostra foi preparada com metanol e a cromatografia foi realizada com fluxo de 1,0 mL/min; 10 μL da amostra foi injetada e a detectada com comprimento de onda de excitação/emissão em 214/306 nm. O PCS foi confirmado nas frações por LC-MS, realizada com uma cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLCTM, Acquity, Waters), composta por uma bomba binária e detector de arranjo de fotodiodos (PDA). A coluna foi uma de fase reversa do tipo C18 com grupo polar embutido HSS-T3 (2,1 x 100 mm x 1,7 μm , Waters) utilizando como solventes, água (A) e metanol (B), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. A cromatografia foi desenvolvida a 60°C com um fluxo de 400 mL/min, aumentando as concentrações de B 5-60% (5 min), 60-100% (6 min), realizada durante 7 min, e, em seguida, retornando para a condição inicial em 7,1 min com 3 min para o sistema reequilibrar. A amostra (1mg) foi dissolvida em 1 mL de MeOH-H₂O (1:1, v/v) e 10 μL foi injetada. A detecção foi realizada por PDA (200-400 nM) e por espectrometria de massa de alta resolução (HR-MS), utilizando um aparelho de eletrospray LTQ Orbitrap XL (Thermo-Scientific), com fonte de ionização operando em modo negativo (m/z 80-500). O N₂ aquecido foi usado para dessolvatação da amostra em fluxo de unidades arbitrárias (u.a) e o gás auxiliar de 20 u.a, com fonte de temperatura de 350°C . As energias de ionização foram de 3,5 kV na voltagem spray, -40 V no capilar e -120 V no tubo. Para precisão da massa, uma calibração externa foi realizada (m/z 100-2000) e resolução foi em 7,500 FWHM. A fração contendo PCS foi também analisada por RMN em espectrômetro Bruker Avance III 600 MHz (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) com uma probe inversa de 5 mm. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm usando água deuterada (D₂O) como solvente e *ácido 3-(trimetilsilil) propionico-2,2,3,3-d₄* como padrão interno (¹H, ¹³C = 0 ppm).

4.2.3 Tratamento das células com PCS e IS

As células endoteliais foram cultivadas em frascos de cultivo contendo meio DMEM (Gibco, Grand Island, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, EUA) e 10 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA). As células foram mantidas em incubadora à 37°C com 5% de CO₂, até atingir a confluência. O meio foi trocado a cada 4 dias, quando as células foram então submetidas à tripsinização. Para tratamento com as toxinas, utilizou-se as concentrações preconizadas pelo *European Uremic Toxin Work Group* (EuTox) (EuTox-<http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>). Portanto, as concentrações usadas em nossos experimentos de PCS e IS, respectivamente, foram normal (0,08 e 0,6 mg/L), urêmica (1,75 e 53 mg/L) e máxima urêmica (2,6 e 236 mg/L), no tempo de 24 h.

4.2.4 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do método de MTT (Sigma, St. Louis, EUA) de acordo com MOSMANN, (1983). As células foram plaqueadas em placas de cultivo de 96 poços, a uma densidade de 10⁴ células por poço. Após 24 h de incubação, o meio foi substituído e as células foram tratadas com o PCS e IS diluídas no meio de cultivo, nas concentrações descritas acima, com ou sem Pb à 2,5 mM. Após as 24 h de tratamento com as toxinas, foi então substituído por meio fresco (100 µL/poço) e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada a cada poço. A placa foi deixada em incubação durante mais 4 h. O meio de cultura foi posteriormente removido e substituído por dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan reduzido. A leitura da absorbância foi medida a 570 nm no leitor de microplaca Bio-Rad 680 (Califórnia, EUA). Foram realizados três experimentos em triplicata.

4.2.5 Imunocitoquímica para detecção de OAT1 E OAT3

A imunocoloração em células endoteliais decorrente da presença de OAT1 e OAT3 foi realizada segundo ENOMOTO *et al.* (2002) e YAMAMOTO *et al.* (2006). Foram plaqueadas 3×10^4 células/poço, sobre lamínulas em placa de 24 poços. Quando as células atingiram cerca de 70% de confluência, foram tratadas com as toxinas PCS e IS nas concentrações máximas urêmicas durante 24 h. Após, as células foram fixadas com paraformaldeído à 4% por 10 min, permeabilizadas com Triton X-100 por 5 min e incubadas com peróxido de hidrogênio 3% por 30 min (de modo a suprimir a atividade da peroxidase endógena). Realizou-se então bloqueio com BSA 0,5%, incubação com o anticorpo primário anti-OAT1 e anti-OAT3 1:100 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) por 18 h a 4°C e em seguida, com o anticorpo secundário (anti-cabra) marcado com peroxidase (HRP) na diluição 1:150 por 1 h à temperatura ambiente. A reação foi revelada com o *kit* Vector Red (Vector Laboratories, CA, EUA). As lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia com Entellan (Millipore Merck, Darmstadt, Alemanha). As imagens foram feitas em microscopia de luz (Axiolmager Z2, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) acoplado a um scanner de *slides* automatizado (Metasystems, Altussheim, DE) em aumento de 100X. Foram realizados seis experimentos em duplicata.

4.2.6 Western Blotting para detecção de OAT1 e OAT3

As células foram cultivadas em frascos de cultivo T75 a 37 e 5% CO₂ e tratadas durante 24 h com PCS e IS nas concentrações urêmicas máximas. Para os estudos com inibidores, as células foram pré-tratadas durante 1 h com Pb a 2,5 mM. Em seguida, as células foram lavadas com PBS gelado e lisadas em 100 µL de tampão RIPA (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM b-glicerofosfato, 1 mM Na₂PO₄, 1% de NP-40, 1% de desoxicolato de sódio e leupeptina a 1 µg/mL). Os lisados celulares foram centrifugados durante 30 min à 14.000 g e os sobrenadantes foram recolhidos. Para

a quantificação de proteínas foi realizado o protocolo BioRad Assay para microplacas de 96 *wells*. A leitura foi realizada a 595 nM no leitor de microplaca BioRad 680 (Califórnia, EUA).

Foram separadas 10 µg de proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio a 15%, transferidas eletroforeticamente para membranas de PVDF (*Invitro* genCorp., Carlsbad, CA, EUA). As membranas foram bloqueadas durante 1 h à temperatura ambiente com solução salina tamponada com Tris contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) e 5% de BSA. Após a lavagem com TBS-T, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpo OAT1 e OAT3 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) a 4°C com agitação suave. Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se os anticorpos secundários (anti-cabra e anti-coelho) marcados com peroxidase (HRP) (1:10000) conjugados com IgG, incubados à temperatura ambiente por 2 h, e visualizados por quimiluminescência (GE Health care Life Sciences do Brasil Ltda, São Paulo). A intensidade das bandas foi analisada utilizando o Software Image Studio Lite (Lincoln EUA), versão 5.0. Foram realizados três experimentos em duplicata.

4.2.7 Captação celular de PCS e IS e condições de CLAE.

A captação foi realizada de acordo com o método descrito por Miyamoto *et al.* (2011). Basicamente as células endoteliais foram cultivadas até confluência em frascos de cultivo T75. As células foram então incubadas com meio contendo PCS ou IS. Após tratamento as células foram lavadas com PBS gelado por 2 vezes e 1 vez com PBS+BSA, posteriormente lisadas com NaOH 0,2 M e, em seguida, incubadas durante 30 min à temperatura ambiente. Para ajustar o pH, foi adicionado 3 M de HCl e para manter a isotonicidade foi adicionado 1 M KH_2PO_4 , a concentração de PCS e IS nos extratos celulares foi determinada por HPLC. De modo a confirmar a especificidade do inibidor de transporte celular, 10 mM de Pb foi adicionado ao meio. Foram realizados quatro experimentos.

O sistema de CLAE consistiu de um aparelho Agilent modelo 1100 (Waldbronn, Alemanha), bomba inteligente e um espectrofotômetro de fluorescência. Uma coluna LiChrosorb RP-18 (CicaMerk, Tóquio, Japão) foi utilizado como fase estacionária. A fase móvel consistiu de 100% de metanol (A) e de formato de amônio 50mM (B) usando o seguinte gradiente de concentração de B: 65-25% em (0-15 min), 25-65% (15-20 min) e 2 min para reequilíbrio do sistema. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min. PCS e IS foi detectado por meio de um monitor de fluorescência. Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram de 214/306 nm (MIYAMOTO *et al.*, 2011).

4.2.8 Expressão de MCP-1

A dosagem de MCP-1 foi realizada pelo ensaio de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) utilizando anticorpos disponíveis comercialmente (R & D Systems, Minneapolis, EUA). As concentrações (pg/mL) foram calculados tendo como referência as curvas padrão geradas com a molécula recombinante correspondente. O sistema ELISA tinha uma faixa de medição de 31,25-2,000 pg/mL para MCP-1. O coeficiente de variação (CV) de intra-ensaio de MCP-1 foi de 6,0 e o CV inter-ensaio foi de 6,2. O protocolo da técnica e as concentrações utilizadas foram de acordo com as recomendações do fabricante. A absorbância foi lida à 450nm com um filtro de referência a 570 nm em um leitor de microplacas (Tecan, Männedorf, Suíça). Todas as medições foram realizadas em quintuplicata.

4.2.9 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em médias \pm erro padrão da média. 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.

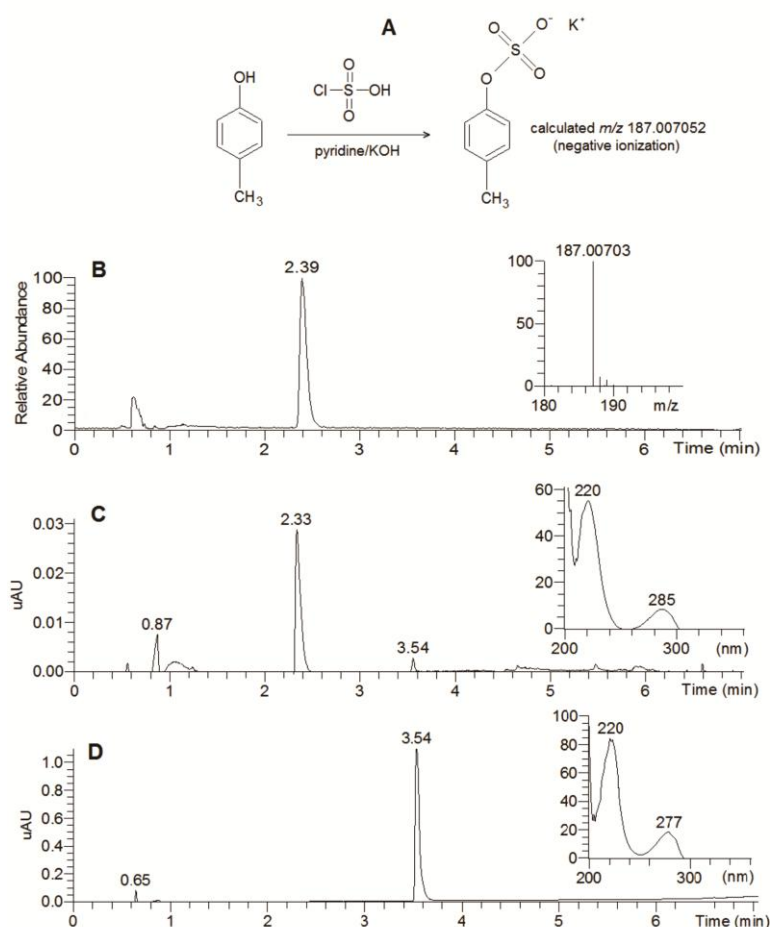
Os resultados foram considerados significativos para um valor de $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas com o uso dos pacotes estatísticos JMP Windows (Carolina do Norte, EUA) versão 8.0 e SigmaStat Windows version 3.5 (Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE PCS

Na análise por CLAE verificou-se que as frações 5 e 6 (F5-F6) continham PCS, dessa forma, essas frações foram submetidas a análise por CL-UV-EM. Na EM, de um pico principal (1) tem aparecido em 2,39 min, com um íon negativo em m/z 187,00703, consistente com o PCS que tiveram um m/z calculado de 187,007052 [$C_7H_7O_4S$] (Fig. 8 A-B). O precursor (PC) não foi detectado por ESI-MS em modo negativo, no entanto, na detecção por UV um pico abundantemente baixo (2) com tempo de retenção de 3,54 min foi detectado juntamente com o pico principal (92%) em 2,33 minutos (Fig. 9C). O espectro de UV de ambos foram similar com λ max em 220-285 nm (pico 1) e 220-277 nm (pico 2). O pico 2 foi confirmado como sendo o PC por comparação com amostra padrão (Fig. 9D). Os dados espectroscópicos obtidos por RMN do PCS foram: 1H -NMR (D_2O , 600 MHz): δ 2,31 (s, 3H, H_8), 7,18 (d, 2H, J 8,80, H_{2-6}), 7,24 (d, 2H, J 8,40, H_{3-5}); ^{13}C RMN (D_2O , 150 MHz): δ 20,0 (C_8), 121,41 (C_{2-6}), 130,24 (C_{3-5}), 136,5 (C_4), 148,99 (C_1).

Figura 9 – Representação esquemática da síntese do p-cresil sulfato (PCS). A reação foi acompanhada por análise por LC-PDA-MS.



Fonte: Souza, 2016.

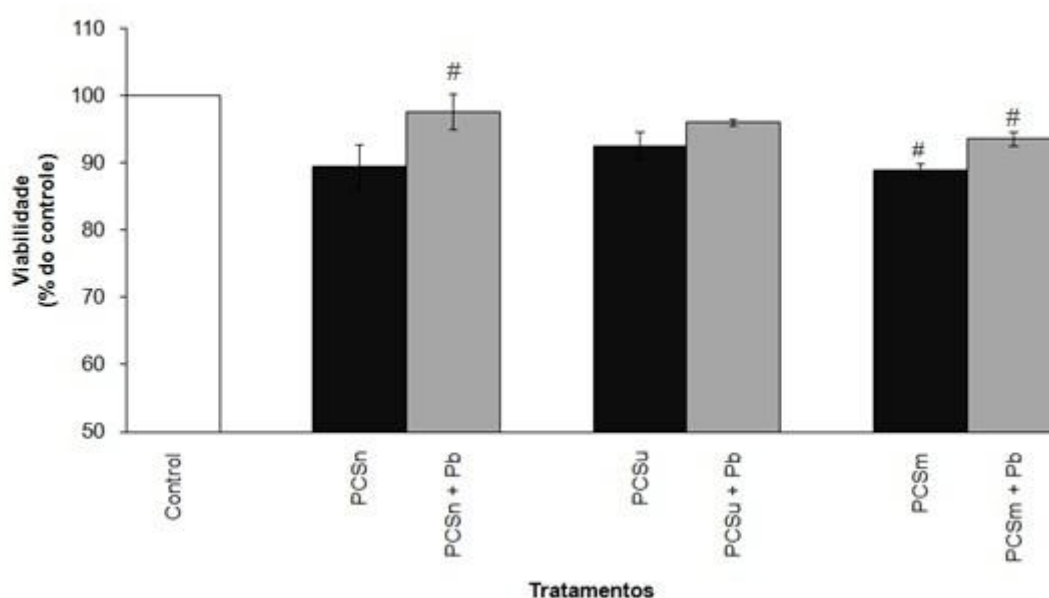
Nota: (A) o pico principal (2,39 min) observada a partir da fração F6 (B) resultou em um íon a m/z 187,00703 (valor calculado a partir de PCS aniônico m/z 187,007052). Observação com PDA (C) resultou em um pico de baixa abundância (3,54 min), similar ao padrão de PC (D).

5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT observada nas figuras 10 e 11. Esse ensaio baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem o sal de MTT, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul púrpura que se acumula no citoplasma celular. As células foram cultivadas com PCS e IS nas concentrações normal (n), urêmica (u), e máxima urêmica (m), em células endoteliais após 24 h de tratamento com e

sem o inibidor Pb na concentração de 2,5 mM. A Figura 10 mostra que o tratamento com PCS inibiu a viabilidade celular já nas primeiras concentrações, sendo significativo o tratamento com PCSm, já IS (Figura 11) inibiu a viabilidade celular de uma forma dose-dependente, em comparação com células não tratadas. Além disso, foi observado um aumento significativo ($P<0,05$) na viabilidade celular quando as células endoteliais foram incubadas com Pb, um inibidor de OATs .

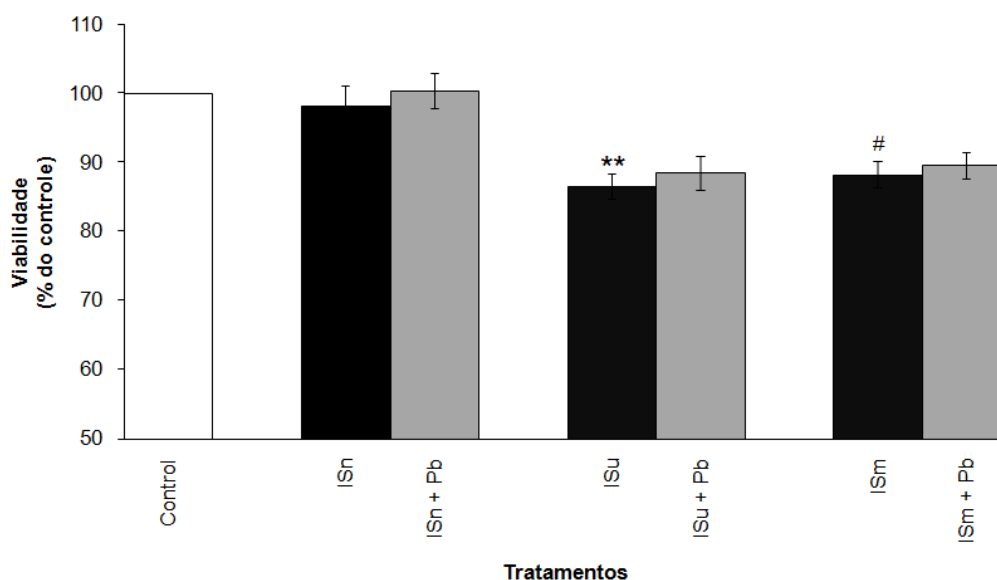
Figura 10 – Viabilidade celular PCS



Fonte: O Autor, 2015.

Nota: As células foram tratadas com PCS nas concentrações normal (PCSn), urêmica (PCSu) e máxima urêmica (PCSm) a 37°C por 24 h, com e sem o inibidor Pb e tratadas com MTT por 3 h. O controle (células não tratadas) foi considerado 100%. Os dados foram expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes. [#] $P<0,05$ – C vs PCSm; PCSn vs. PCSn + Pb; PCSm vs. PCSm + Pb.

Figura 11 – Viabilidade celular IS



Fonte: O Autor, 2015.

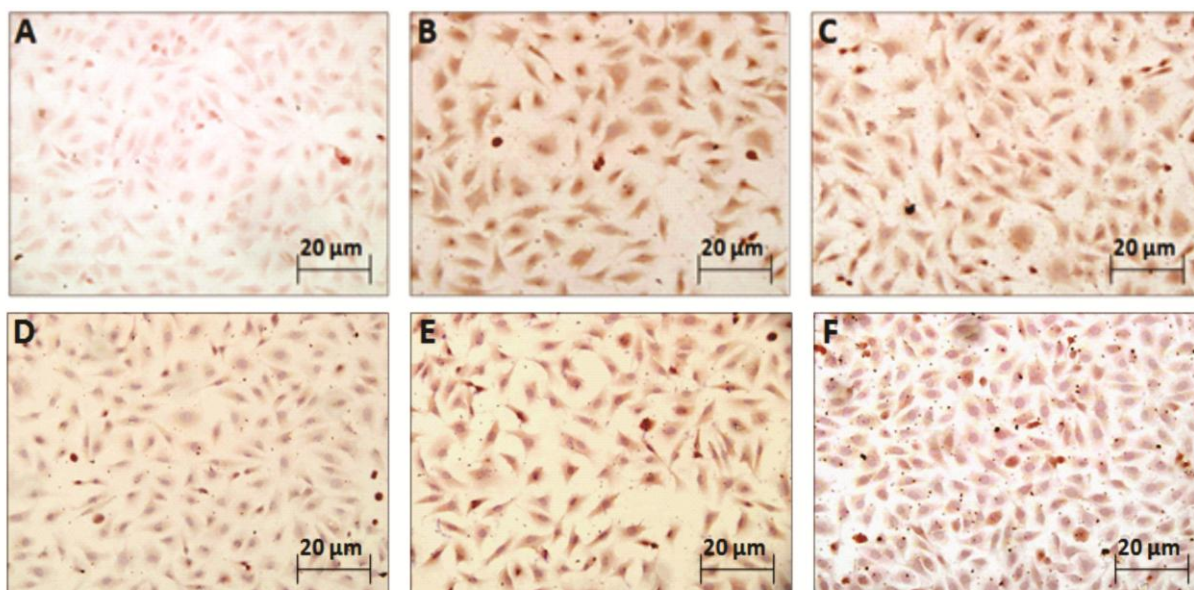
Nota: As células foram tratadas com o IS nas concentrações normal (ISn), urêmica (ISu) e máxima urêmica (ISM) a 37°C por 24 h, com e sem o inibidor Pb e tratadas com MTT por 3 h. O controle (células não tratadas) foi considerado 100%. Os dados foram expressos como média \pm EPM de três experimentos independentes. # $P < 0,05$ – Controle vs. ISu; ** $P < 0,001$ – Controle vs ISm.

5.3 IMUNOCITOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE OAT1 E OAT3

OATs são proteínas transmembranares que são expressas sobre a superfície de uma variedade de células e estão envolvidas na absorção de várias moléculas. Para a determinação da expressão OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas, associados à captação de PCS e IS, utilizou-se o método de imunocitoquímica do tipo indireto (WATANABE; SAKAGUCHI; SUGIMOTO, 2013). A imunocoloração foi detectada pela reação dos anticorpos primários aos transportadores e posterior interação com o anticorpo secundário ligado à peroxidase. Como mostrado na Figura 12, uma coloração positiva mais evidente foi visualizada em células tratadas com PCS e IS (Figura 12B e 12C). As células endoteliais tratadas com meio de cultura (Figura 12A) foram utilizadas como controle negativo, apresentando uma leve coloração. Foram realizados ensaios somente com

o anticorpo secundário, os dados não demonstrados devido à ausência de cor das células.

Figura 12 – Efeito do PCS e IS na coloração por imunocitoquímica para OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas.



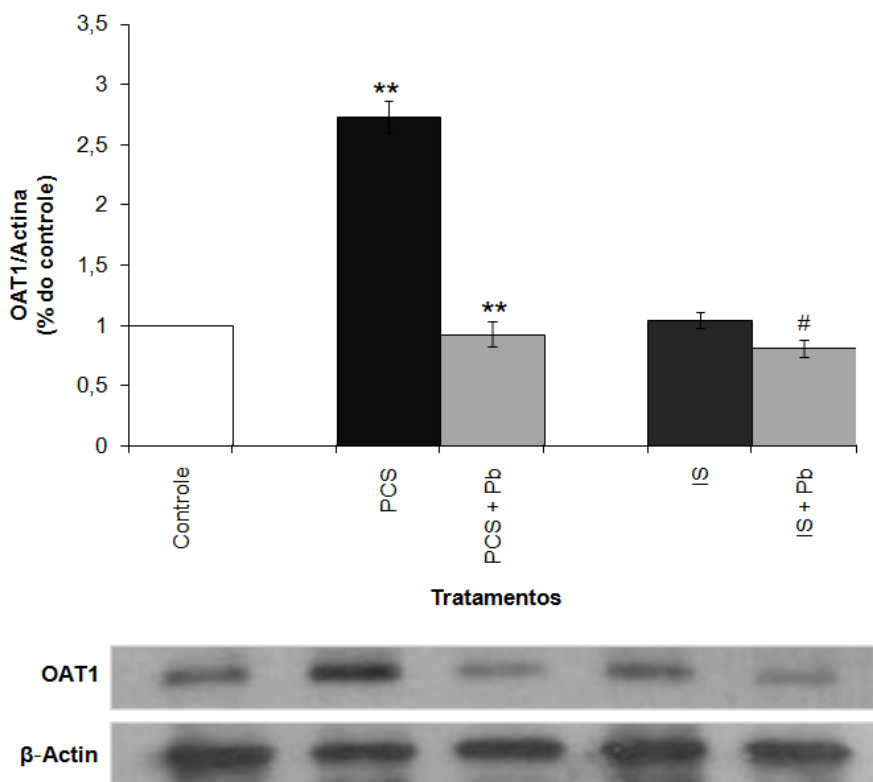
Fonte: O Autor, 2015.

Nota: As células endoteliais foram tratadas com PCSm e ISm, ou não tratadas (controle) por 24 h à 37°C e coradas para OAT1 e OAT3. Painel mostrado para OAT1: (A) As células de controle (células não tratadas); (B) PCSm; (C) ISm. Painel mostrado para OAT3: (D) As células de controle (células não tratadas); (E) PCSm; (F) ISm. Aumento de 100X.

5.4 ANÁLISE POR WESTERN BLOTTING PARA DETECÇÃO DE OAT1 E OAT3.

As Figuras 13 e 14 mostram a expressão de OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas por Western Blotting após tratamento das células endoteliais com PCS e IS na presença e ausência do inibidor Pb.

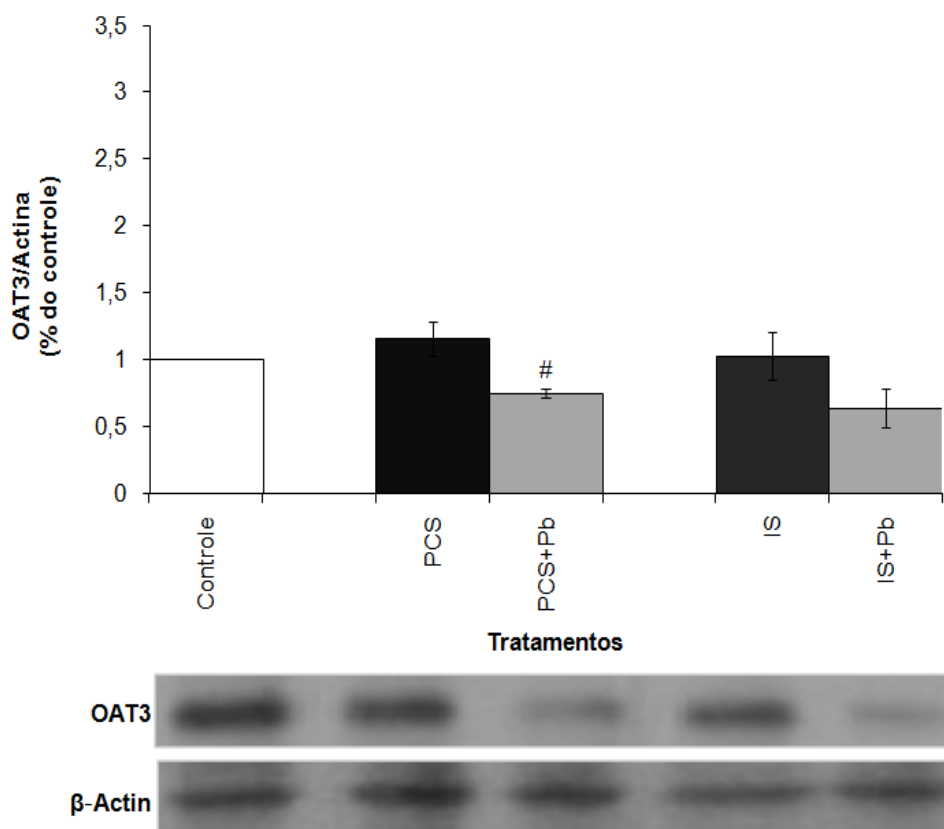
Figura 13 – Western blotting para OAT1.



Fonte: O Autor, 2015.

Nota: Expressão de OAT1 em células endoteliais humanas após tratamento com PCSm ou ISm. As células endoteliais foram tratadas com PCSm e ISm, com ou sem Pb por 24 h. Para imunotransferência a β -actina foi utilizada como controle da carga das proteínas. Os níveis de OAT1 foram quantificados por densitometria com a razão entre a β -actina. Os dados são expressos em média \pm EPM de cinco experimentos independentes. ** $P < 0,001$ – Controle vs. PCS; PCS vs. PCS+Pb # $P < 0,05$ - IS vs IS + Pb.

Figura 14 – Western blotting para OAT3.



Fonte: O Autor, 2015.

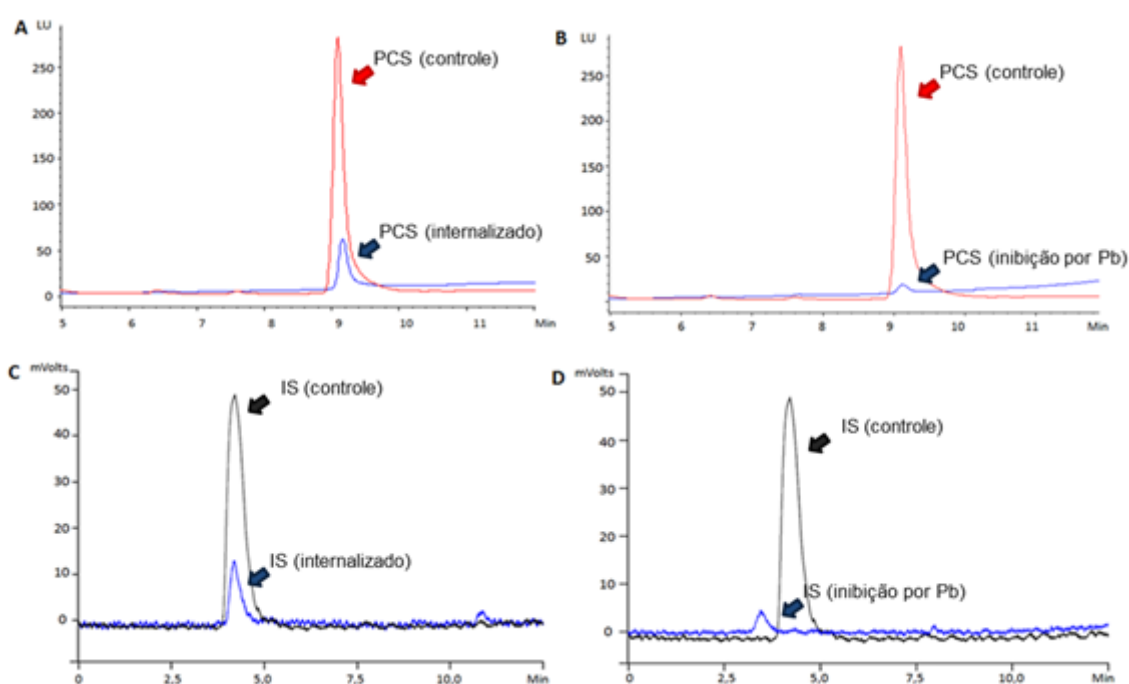
Nota: Expressão de OAT3 em células endoteliais humanas após tratamento com PCSm ou ISm. As células endoteliais foram tratadas com PCSm e ISm, com ou sem Pb por 24 h. Para imunotransferência a β -actina foi utilizada como controle da carga das proteínas. Os níveis de OAT3 foram quantificados por densitometria com a razão entre a β -actina. Os dados são expressos em média \pm EPM de cinco experimentos independentes. [#] $P < 0,05$ - Controle vs. PCS+Pb.

5.5 CAPTAÇÃO DE PCS E IS

A captação das toxinas urêmicas PCS e IS foram analisados por CLAE, onde se observou que a 37°C ocorre a internalização celular de PCS e IS, já a 4°C essa internalização é praticamente nula, e quando o inibidor (Pb) foi adicionado, a internalização de ambas as toxinas foi significativamente diminuída, como pode ser observado na figura 15 e na Figura 16. Cromatogramas obtidos por CLAE da captação de PCS e IS com ou sem Pb, via OATs pode ser observado na Figura 15. A captação de PCS e IS em células endoteliais foi analisada nas temperaturas de

4°C e 37°C, durante 60 min, na presença ou ausência de Pb. A Figura 16 mostra uma significativa internalização de PCS e IS (33,5% e 11,14%) comparado com o controle (toxina na concentração máxima urêmica) ($P<0,05$); a diferença foi mais evidente para PCS. Quando as células endoteliais foram expostas ao inibidor Pb, houve um aumento significativo na redução da absorção de ambas as toxinas ($P<0,05$).

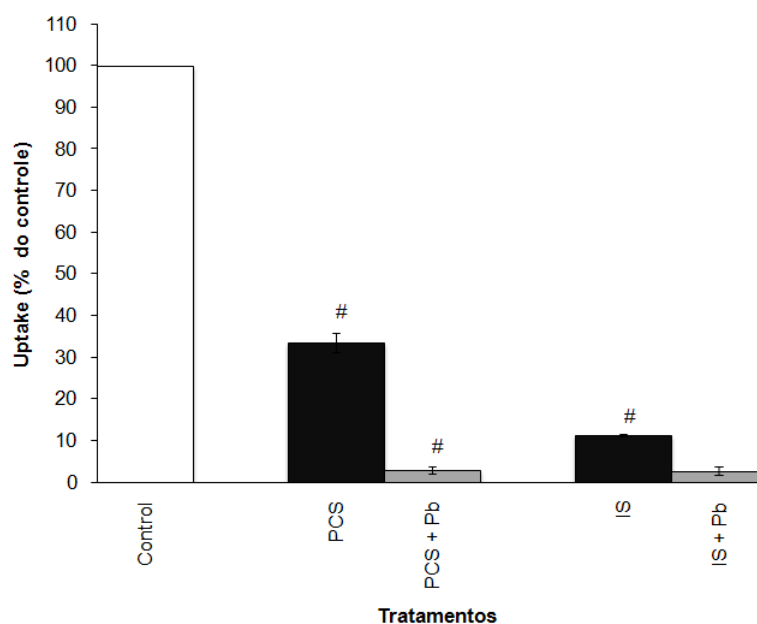
Figura 15 – Cromatogramas de captação de PCS e IS via OATs.



Fonte: O Autor, 2015.

Nota: (A) PCS à 37°C, (B) PCS + Pb à 37°C, (C) IS à 37°C, (D) IS + Pb à 37°C. Os picos ao mesmo tempo de retenção representam o controle nas concentrações máximas urêmicas.

Figura 16 – Captação do PCS e IS.



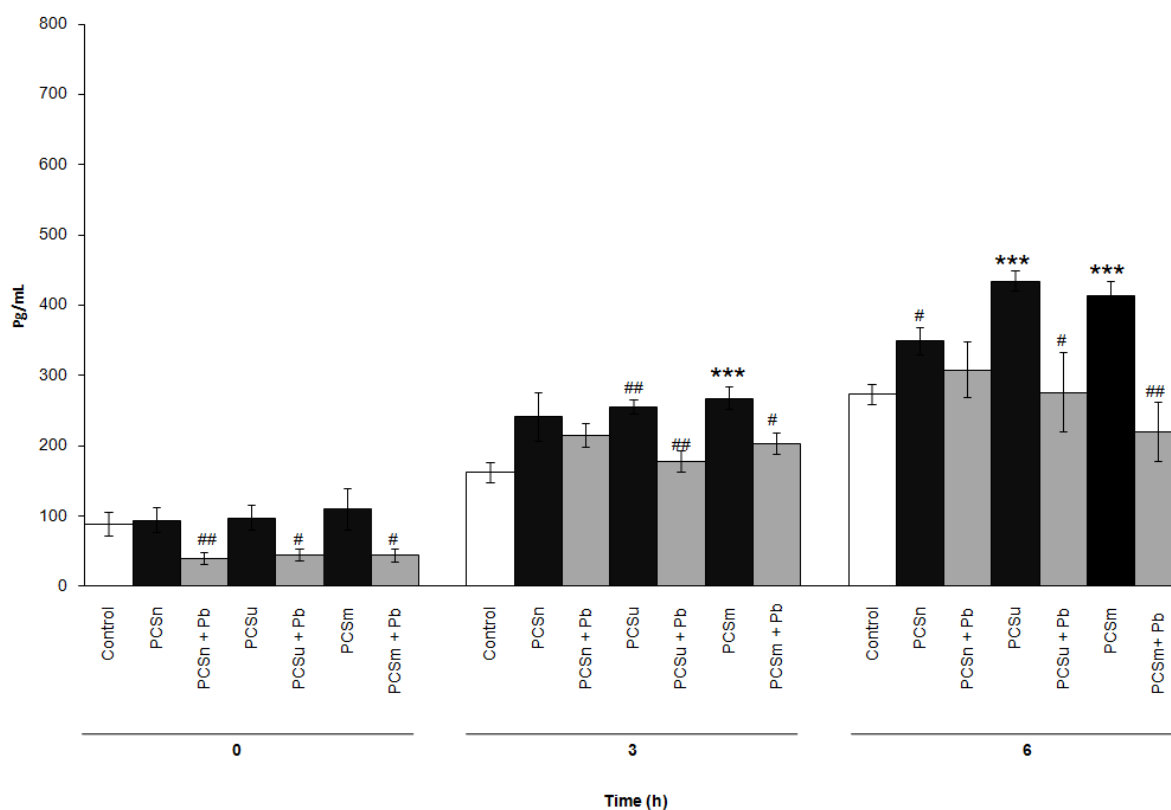
Fonte: O Autor, 2015.

Nota: Os valores são expressos com a média em % do controle (n=3). # $P < 0,05$ - Cm vs. PCS; PCS vs. PCS + Pb; C vs. IS + Pb.

5.6 EXPRESSÃO DE MCP-1

A expressão de MCP-1 aumentou significativamente de uma forma tempo-dependente, quando as células endoteliais foram expostas ao PCS e IS, por 0, 3 e 6 h (Figura 17 e 18). Além disso, uma diminuição significativa tempo-dependente na expressão de MCP-1 foi observada em células incubadas com o PCS e Pb. Em contraste, quando as células endoteliais foram tratadas com IS e Pb, MCP-1 diminuiu significativamente a expressão somente no tempo de 3 h de incubação (Figura 18).

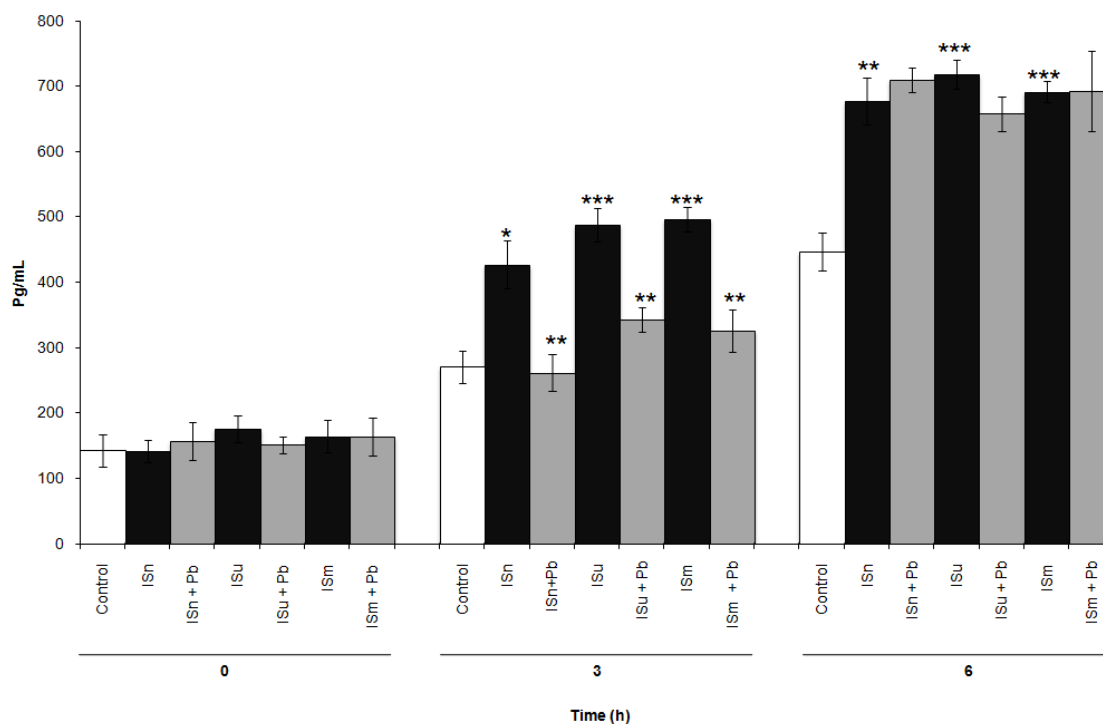
Figura 17 – Efeito do PCS na produção de MCP-1 em células endoteliais.



Fonte: O Autor, 2015.

Nota: As células endoteliais foram incubadas com PCS nas concentrações normal (PCSn), urêmica (PCSu), e máxima (PCSm) com ou sem Pb no tempo de 0, 3 e 6 h. Os dados são expressos como média \pm EPM de cinco experimentos independentes em quintuplicata. # $P < 0,05$ - PCSu vs. PCSu + Pb 0 h, PCSm vs. PCSm + Pb 0 h, Controle vs. PCSn 6 h, PCSu vs. PCSu + Pb 6 h. ## $P < 0,005$ - PCSn vs PCSn +Pb 0 h, Controle vs. PCSu 3 h, PCSu vs PCSu Pb + 3 h, PCSm vs PCSm + Pb 6 h. *** $P < 0,0001$ - Controle vs. PCSm 3 h, Controle vs. PCSu 6 h, Controle vs. PCSm 6 h.

Figura 18 – Efeito do IS na produção de MCP-1 em células endoteliais.



Fonte: O Autor, 2015.

Nota: As células endoteliais foram incubadas com IS nas concentrações normal (ISn), urêmica (ISu), e máxima (ISm) com ou sem Pb no tempo de 0, 3 e 6 h. Os dados são expressos como média \pm EPM de cinco experimentos independentes em quintuplicata. * $P < 0,01$ - Controle vs. ISn 3 h. ** $P < 0,001$ - ISn vs. ISn + Pb 3 h, ISu vs. ISu + Pb 3 h, ISm vs. ISm + Pb 3 h, Controle vs. ISn 6 h. *** $P < 0,0001$ - Controle vs. ISu 3 h, Controle vs. ISm 3 h, Controle vs. ISu 6 h, Controle vs. ISm 6 h.

6 DISCUSSÃO

A disfunção endotelial é um evento comum em pacientes com doença renal crônica, levando à doenças cardiovasculares como a aterosclerose, a principal causa de morte nesses pacientes. PCS e IS são toxinas urêmicas de baixo peso molecular, que se ligam à albumina na circulação e são captadas pelas células através de transportadores conhecidos como OATs. Os principais resultados do presente estudo demonstram que PCS e IS são capazes de induzir a expressão de OAT1 e OAT3 em células endoteliais humanas, especificamente OAT1. Além disso, foi demonstrado por meio de HPLC, que PCS e IS são captados por OATs, os resultados foram confirmados pelo bloqueio seletivo de OATs com Pb, uma droga conhecida como anti-uricosúrica. Também demonstramos a expressão de OATs após o tratamento com as toxinas, analisando a expressão da proteína OAT1 e OAT3 por imunocitoquímica e ensaios de *Western blotting*. Além disso, a toxicidade foi mais pronunciada quando as células foram tratadas com o PCS do que com IS. Finalmente, demonstrou-se que quando os OATs são bloqueados com Pb, o nível de MCP-1 foi diminuído, mostrando desta forma que os OATs podem servir como alvos terapêuticos importantes no processo de aterosclerose urêmica.

A disfunção endotelial desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, progressão, e nas manifestações clínicas da aterosclerose, em especial em pacientes com DRC. Foi demonstrado anteriormente que a exposição de células endoteliais humanas ao plasma urêmico em tempo e estágio dependente da DRC resulta em um aumento de biomarcadores inflamatórios vasculares, tais como MCP-1, uma quimiocina envolvida na quimiotaxia de monócitos à parede vascular em eventos ateroscleróticos (REMPEL *et al.*, 2015; STINGHEN *et al.*, 2009). As células endoteliais constituem uma única camada de células que reveste a superfície interior dos vasos sanguíneos (GÜNTNER *et al.*, 2009). A exposição das células aos compostos urêmicos desencadeia uma série de distúrbios na homeostase do endotélio e suas múltiplas funções. Estudos anteriores demonstraram que as toxinas urêmicas, tais como IS e 3-carboxi-4-metil-5-propil-2-furanopropionato (CPMF) são excretados a partir do rim via OATs, que são transportadores transmembranares encontrados principalmente na membrana

basolateral do túbulo proximal renal (DEGUCHI *et al.*, 2002; TSUTSUMI *et al.*, 2002). Deguchi *et al.* (2002), utilizando estudos *in vivo* em ratos Wistar mostraram que IS é transportado principalmente pelo OAT3 presente na membrana basolateral da célula epitelial renal (DEGUCHI *et al.*, 2002). Neste panorama, há um interesse crescente na comunidade científica quanto à forma como toxinas urêmicas ligadas à proteínas tais como PCS e IS acumulam em uma variedade de células e exercem sua toxicidade.

Para melhor entender o papel do PCS e IS como substratos de OATs, desenvolvemos um estudo *in vitro* para verificar a captação de ambas as toxinas em células endoteliais humanas. Primeiramente, o PCS foi sintetizado a partir do seu precursor PC. Através da purificação da toxina, obteve-se um sal com 92% de pureza, pois até o momento, não há dados disponíveis demonstrando os detalhes desta reação e confirmando a sua pureza na literatura. Além disso, nossos resultados demonstraram pela primeira vez que OAT1 e OAT3 são expressos em células endoteliais tratadas com ambas as toxinas, provavelmente representando seu acúmulo intracelular. Este efeito foi mais pronunciado para OAT1 do que OAT3. De fato ambos os transportadores tem sido encontrados em vários tecidos, com uma maior expressão nos rins (NIGAM *et al.*, 2015), onde eles estão envolvidos na secreção e excreção de muitas moléculas.

Nossos dados demonstraram através do ensaio de captação celular, que PCS e IS são internalizados em células endoteliais através de OAT1 e OAT3, sendo mais efetivo à temperatura de 37°C, mas em contraste, à temperatura de 4°C, a internalização não foi observada. Além disso, a captação de PCS e IS foi suprimida quando as células foram tratadas com Pb, o que sugere fortemente a participação dos OATs no processo de absorção dessas toxinas. Corroborando com nossos achados, um estudo recente conduzido por Miyamoto *et al.* (2011) em cortes renais de ratos e em células de linhagem renal (HK-2) demonstraram que PCS foi ativamente captado à 37°C, em contrapartida, à 4°C e na presença de Pb, não houve captação (MIYAMOTO *et al.*, 2011). Outros autores também demonstraram que os OATs podem ser inibidos por outras substâncias, tais como a benzilpenicilina, o ácido *p*-aminohipurico e sulfato de estrona. Além disso, foi demonstrado que rOAT1/hOAT1 e rOAT3/hOAT3 desempenham um papel importante na absorção renal de toxinas urêmicas na membrana basolateral dos

túbulos proximais e que tanto OAT1 quanto OAT3 contribuem quase igualmente para a absorção renal de IS (DEGUCHI *et al.*, 2004). O mesmo grupo também relatou que o transportador de ânions orgânicos em ratos (rOAT1) é o principal mediador da absorção de ácido hipúrico no rim (DEGUCHI *et al.*, 2005). Poveda *et al.* (2013), demonstraram que PCS tem efeitos pró-apoptóticos e pró-inflamatórios sobre as células epiteliais tubulares proximais (POVEDA *et al.*, 2013). Watanabe *et al.* (2013) observaram o efeito de PCS em células de linhagem renal (HK-2), no qual o PCS reduziu significativamente a viabilidade celular de uma forma dose dependente. Foi também demonstrado que os efeitos deletérios foram inibidos na presença de Pb (WATANABE; SAKAGUCHI; SUGIMOTO, 2013). Os autores sugeriram que as características citotóxicas de PCS pode ser explicada, pelo menos parcialmente pelo aumento do estresse oxidativo induzido por acumulação intracelular desta molécula. Nosso estudo mostrou uma redução semelhante no número de células viáveis após o tratamento com o PCS e IS, especialmente nas concentrações máximas urêmicas de forma dose-dependente. Quando as células foram tratadas com Pb, a viabilidade celular foi restabelecida. Deguchi *et al.* (2002) observaram que o Pb tem um efeito inibidor sobre a absorção de IS nos rins de forma dose-dependente (DEGUCHI *et al.*, 2002). Os dados obtidos através do nosso ensaio de viabilidade celular indiretamente sugerem que os OATS são os possíveis transportadores destas toxinas.

Através do ensaio de imunocitoquímica, observamos uma maior coloração das células endoteliais para OAT1 e OAT3, especialmente após o tratamento com PCS. Este achado foi confirmado através da análise de *western blotting*. Miyamoto *et al.* (2011) utilizando células HK-2 sugeriu que PCS funciona como um substrato de OATs, preferivelmente para OAT3 (MIYAMOTO *et al.*, 2011). Estes dados também podem ser observados no estudo relatado por Adijiang *et al.* (2008) em células vasculares de músculo de aorta de ratos, nas quais houve uma maior expressão de OAT3 do que de OAT1, resultando no acúmulo de IS dentro das células (ADIJIANG *et al.*, 2008). Enomoto *et al.* (2002) demonstraram por imunohistoquímica um aumento na expressão de OAT1 e OAT3, quando as células dos túbulos renais de ratos foram tratados com IS (ENOMOTO *et al.*, 2002a). OATs são proteínas que pertencem a uma família codificada por SLC22A e são os principais transportadores envolvidos no transporte renal de ânions orgânicos (AO).

OAT1 foi identificado pela primeira vez em 1997, sendo expresso principalmente na membrana basolateral das células tubulares proximais, interagindo com mais de 100 compostos, e envolvidos na absorção destes compostos a partir do sangue para a urina, a fim de ser excretada. Os seus substratos incluem substâncias endógenas, tais como nucleotídeos cíclicos, dicarboxilatos, prostaglandinas, e uratos, bem como os exógenos, tais como drogas e compostos ambientais (SEKINE; CHA; ENDOU, 2000). OAT1 já foi demonstrado em humanos, macacos e ratos, na membrana basolateral e em células do túbulo proximal renal, consistente com o seu papel em transportar drogas a partir do sangue para as células do túbulo proximal (Burckhardt de 2012). Anatomicamente, foi demonstrado na placenta, cérebro, olhos, e células do músculo liso. OAT3 também está localizada na membrana basolateral das células tubulares proximais e foi identificado em ossos, cérebro, olhos, rins, fígado, e glândulas supra-renais (SEKINE; MIYAZAKI; ENDOU, 2006).

Ao longo dos últimos anos, um grande progresso tem sido feito na identificação de compostos urêmicos e seu papel nos mecanismos celulares e moleculares em vários processos patológicos. OATs são transportadores chave para a absorção de toxinas e drogas, distribuídos em uma variedade de células no organismo humano e animal. Considerando-se a toxicidade resultante da acumulação de PCS e IS, compreender os mecanismos de absorção dessas toxinas são importantes no intuito de levar a descoberta de novas intervenções terapêuticas e desta forma contribuir para a sobrevida do paciente DRC. A padronização de novos métodos para esclarecer estes efeitos devem ser explorados, uma vez que existem poucos estudos relacionados ao transporte, captação e inibição de tais toxinas.

7 CONCLUSÃO

- ✓ A caracterização de PCS por RMN, CLAE e ESI-MS, confirmou através dos espectros resultantes a presença exclusivamente de PCS.
- ✓ A viabilidade celular das células tratadas com PCS teve um declínio já nas primeiras concentrações, sendo que após o tratamento com Pb houve um significativo reestabelecimento da viabilidade celular na concentração normal e urêmica máxima.
- ✓ A viabilidade das células tratadas com IS mostrou-se de forma dose-dependente, sendo que após o tratamento com Pb, a viabilidade foi reestabelecida, não sendo significativo.
- ✓ A imunocoloração revelou que, em células endoteliais a expressão de OAT1 é maior em relação ao OAT3. Foi possível verificar que o PCS induz maior expressão de OATs em comparação ao IS.
- ✓ O ensaio de *Western Blotting* obteve o mesmo padrão de expressão de OATs observado na imunocitoquímica, confirmando a maior expressão de OAT1 em células endoteliais.
- ✓ O ensaio de captação de toxinas urêmicas via OATs, demonstrou que a internalização de toxinas ocorre à temperatura fisiológica (37°C), quando administrado um inibidor (Pb), esta internalização foi diminuída, demonstrando que o Pb é um eficiente inibidor de OATs.
- ✓ O ensaio de MCP-1 demonstrou que houve uma diminuição significativa tempo-dependente na expressão de MCP-1 quando incubadas com o PCS e Pb, e quando as células endoteliais foram tratadas com IS e Pb, MCP-1 diminuiu significativamente a expressão somente no tempo de 3 h de incubação, demonstrando que o Pb poderia ser uma alternativa terapêutica para a inibição da expressão de MCP-1 nos pacientes com DRC.

REFERÊNCIAS

ADIJIANG, A. et al. Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. n. March, p. 1892–1901, 2008.

ANZAI, N.; KANAI, Y.; ENDOU, H. Review Organic Anion Transporter Family: Current Knowledge. v. 426, p. 411–426, 2006.

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

BARRETO, F. C. et al. Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 10, p. 1551–1558, 2009.

BARRETO, F. C. et al. The quest for a better understanding of chronic kidney. n. 41, p. 14–28, 2014a.

BARRETO, F. C. et al. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **J Bras Nefrol** 2014, v. 36(2), p. 14–28, 2014b.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.

BERGE´-LEFRANC, D. et al. Binding of p-Cresylsulfate and p-Cresol to Human Serum Albumin Studied by Microcalorimetry. **American Chemical Society**, v. Vol. 114, , p. 1661–1665, 2010.

BEYER KH, RUSSO HF, TILLSON EK, MILLER AK, VERWEY WF, G. S. “ Benemid ,” p- (di-n-propylsulfamyl) -benzoic acid ; its renal affinity and its elimination . **Am J Physiol.**, v. 166, n. 3, p. 1951, 1951.

BOISVERT, W. A. 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, p. 353–363, 1998.

BOLATI, D. et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF-kappaB. **BMC Nephrol**, v. 14, p. 56, 2013.

BRO, S. et al. Increased expression of adhesion molecules in uremic atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 6, p. 1495–1503, 2004.

BURCKHARDT, G. Pharmacology & Therapeutics Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). **Pharmacology and Therapeutics**, v. 136, n. 1, p. 106–130, 2012.

BURCKHARDT, G.; WOLFF, N. A. Structure of renal organic anion and cation transporters. **American Journal of Physiology**, v. 278, n. 6, p. F853–866, jun. 2000.

CHA, S. H. et al. Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. **Molecular Pharmacology**, v. vol. 59, n, p. 1277–1286, 2001.

COHEN, 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**, 2007.

COHEN, G.; HORL, W. H. Immune dysfunction in uremia: an update. **Toxins (Basel)**, v. 4, n. 11, p. 962–990, 2012.

DEGUCHI, T. et al. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. **Kidney International**, v. 61, p. 1760–1768, 2002.

DEGUCHI, T. et al. Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. **Kidney International**, v. 65, p. 162–174, 2004.

DEGUCHI, T. et al. Differential contributions of rOat1 (Slc22a6) and rOat3 (Slc22a8) to the in vivo renal uptake of uremic toxins in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 4, p. 619–627, 2005.

DEVINE, E. et al. Binding Affinity and Capacity for the Uremic Toxin Indoxyl Sulfate. p. 416–429, 2014.

ELMARAQBY, A. A; SULLIVAN, J. C. Relationship between Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy Inflammation in Diabetic Nephropathy Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. **Cytokines**, v. 00, n. 1, p. 1–11, 2010.

ENOMOTO, A. et al. Role of Organic Anion Transporters in the Tubular Transport of Indoxyl Sulfate and the Induction of its Nephrotoxicity. v. 1, n. 20, p. 1711–1720,

2002a.

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, jul. 2002b.

FEIGENBAUM, J.; NEUBER, C. A. Simplified Method for the Preparation of Aromatic Aromatic Sulfuric Acid Esters. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 63, n. 12, p. 3529–3530, 1941.

GERSZTEN, R. E. et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 718–723, 1999.

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.

GLORIEUX, G.; VANHOLDER, R. New uremic toxins - which solutes should be removed? **Contrib Nephrol**, v. 168, p. 117–128, 2011.

GÜNTNER, T. et al. Endothelium and vascular smooth muscle cells in the context of uremia. **Seminars in Dialysis**, v. 22, p. 428–432, 2009.

HAUSER, A. B. et al. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. **Perit Dial Int**, v. 28 Suppl 3, p. S183–7, 2008.

IKEDA U1, MATSUI K, MURAKAMI Y, S. K. Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. **Clin Cardiol**, v. 25, n. 4, p. 2002, 2002.

ITO, S. et al. Indoxyl Sulfate Induces Leukocyte-Endothelial Interactions through Up-regulation of E-selectin * □. v. 285, n. 50, p. 38869–38875, 2010.

ITOH, Y. et al. Correlation between Serum Levels of Protein-Bound Uremic Toxins in Hemodialysis Patients Measured by LC/MS/MS. **Mass Spectrom (Tokyo)**, v. 2, n. Spec Iss, p. S0017, 2013.

JHA, V. et al. Global Kidney Disease 3 Chronic kidney disease : global dimension and perspectives. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 260–272, 2013.

JOURDE-CHICHE, N. et al. Vascular incompetence in dialysis patients--protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. **Semin Dial**, v. 24, n. 3, p. 327–337, 2011.

KNEIS, C. et al. Elimination of Middle-Sized Uremic Solutes with High-Flux and High-Cut-Off Membranes: A Randomized in vivo Study. **Blood Purification**, v. 36, n. 3-4, p. 287–294, 2013.

KOIZUMI, M. et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates Indoxyl Sulfate-Induced Cellular Senescence in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. Vol 27, n^o, p. 1–13, 2014.

KOLATTUKUDY, P. E.; NIU, J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. **Circ Res.**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

LANDIN BORING, JENNIFA GOSLIN, MICHAEL CLEARY CHARO, & I. F. Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. **letters to nature**, v. 413, n. September, p. 396–400, 1998.

LEE, C. T. et al. Lack of modulatory effect of simvastatin on indoxyl sulfate-induced activation of cultured endothelial cells. **Life Sci**, v. 90, n. 1-2, p. 47–53, 2012.

LIABEUF, S. 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, p. 1183–1191, 2009.

LIABEUF, S. et al. Does P-Cresylglucuronide Have the Same Impact on Mortality as Other Protein-Bound Uremic Toxins ? v. 8, n. 6, 2013.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, n. 9, p. 1135–1143, 2002.

LOOR, H. DE et al. Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis for Measurement of p-Cresol and Its Conjugated Metabolites in Uremic and Normal Serum. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 1533–1535, ago. 2005.

MARTINEZ, A. W. et al. Removal of P-cresol sulfate by hemodialysis. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 11, p. 3430–3436, 2005.

MEIJERS, B. K.; EVENEPOEL, P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 759–761, 2011a.

MEIJERS, B. K. I.; BAMMENS, B.; VERBEKE, K. A Review of Albumin Binding in

CKD. v. 51, n. 5, p. 839–850, 2008.

MEIJERS, B. K. I.; EVENEPOEL, P. The gut – kidney axis : indoxyl sulfate , p -cresyl sulfate and CKD progression. p. 759–761, 2011b.

MEIJERS, B. K. I.; VAN, S.; VERBEKE, K. The Uremic Retention Solute p -Cresyl Sulfate and Markers. **YAJKD**, v. 54, n. 5, p. 891–901, 2009.

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, n. 8, p. 2498–2502, 2011.

MONIEN, B. H. et al. Probenecid, an inhibitor of transmembrane organic anion transporters, alters tissue distribution of DNA adducts in 1-hydroxymethylpyrene-treated rats. **Toxicology**, v. 262, n. 1, p. 80–85, 2009.

NAGLE, M. A. et al. Analysis of Three-dimensional Systems for Developing and Mature Kidneys Clarifies the Role of OAT1 and OAT3 in Antiviral Handling. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. Vol. 286, , p. pp. 243–251, 2011.

NIGAM, S. K. et al. The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 1, p. 83–123, 2015.

NIWA, T. et al. Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 2264–2267, 1988.

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

NKF. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 39, p. 327, 2002.

POESEN, R. et al. Renal clearance and intestinal generation of p-Cresyl sulfate and indoxyl sulfate in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, p. 1508–1514, 2013.

POVEDA, J. et al. p-Cresyl sulphate has pro-inflammatory and cytotoxic actions on human proximal tubular epithelial cells. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29, p. 56–64, 2013.

PRICHARD, S. et al. Cardiovascular disease in peritoneal dialysis. **Perit Dial Int**, v. 16 Suppl 1, p. S19–22, 1996.

REMPEL, L. et al. Effect of PKC- β Signaling Pathway on Expression of MCP-1 and VCAM-1 in Different Cell Models in Response to Advanced Glycation End Products (AGEs). **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1722–1737, 2015.

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

SAITO, H. Pharmacology & Therapeutics Pathophysiological regulation of renal SLC22A organic ion transporters in acute kidney injury: Pharmacological and toxicological implications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 125, n. 1, p. 79–91, 2010.

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. 592–596, 2007.

SEKINE, T.; CHA, S. H.; ENDOU, H. **The multispecific organic anion transporter (OAT) family.** *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2000.

SEKINE, T.; MIYAZAKI, H.; ENDOU, H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. p. 251–261, 2006.

SELMER, T.; ANDREI, P. I. p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile* A novel glycol radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. v. 1372, p. 1363–1372, 2001.

SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2013 - trend analysis between 2011 and 2013. **J Bras Nefrol**, v. 36, n. 4, p. 476–481, 2014.

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. c117–26, 2009.

STINGHEN, A. E. M. et al. Immune Mechanisms Involved in Cardiovascular Complications of Chronic Kidney Disease. **Blood Purification**, v. 29, n. 2, p. 114–120, jan. 2010.

STINGHEN, A. E. M.; PECOITS-FILHO, R. Vascular damage in kidney disease:

beyond hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2011, p. 5, jan. 2011.

STINGHEN, A. E. M.; RIELLA, M. C.; PECOITS-FILHO, R. in *Cardiovascular Complications of Chronic Kidney Disease*. p. 114–120, 2010.

SUN, C.-Y.; CHANG, S.-C.; WU, M.-S. Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e34026, jan. 2012.

TSUTSUMI, Y. et al. Renal disposition of a furan dicarboxylic acid and other uremic toxins in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, n. 2, p. 880–887, 2002.

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

VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney Int**, v. 63, n. 5, p. 1934–1943, 2003a.

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

VANHOLDER, R. et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrol Dial Transplant**, v. 20, n. 6, p. 1048–1056, 2005.

VANHOLDER, R. et al. The role of EUTox in uremic toxin research. **Semin Dial**, v. 22, n. 4, p. 323–328, 2009.

VANHOLDER, R. et al. Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 5, p. 1464–1467, 2011a.

VANHOLDER, R. et al. Warning: the unfortunate end of p-cresol as a uraemic toxin. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 26, n. 5, p. 1464–1467, maio 2011b.

VANHOLDER, R. et al. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. p. 1–11, 2014.

VANHOLDER, R.; DE SMET, R.; LESAFFER, G. p-cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of uraemic toxicity. **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, n. 12, p. 2813–2815, 1999.

VANHOLDER, R.; VAN LAECKE, S.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity? **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1211–1221, ago. 2008.

WATANABE, H. et al. Interaction between Two Sulfate-Conjugated Uremic Toxins , p -Cresyl Sulfate and Indoxyl Sulfate , during Binding with Human Serum Albumin ABSTRACT : **Drug Metabolism and Disposition**, v. 40, n. 7, p. 1423–1428, 2012.

WATANABE, H.; SAKAGUCHI, Y.; SUGIMOTO, R. Human organic anion transporters function as a high-capacity transporter for p -cresyl sulfate , a uremic toxin. 2013.

WOLFF, N. A. et al. Protein Kinase C Activation Downregulates Human Organic Anion Transporter 1-Mediated Transport through Carrier Internalization. v. 1, p. 1959–1968, 2003.

YANG, K. et al. Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein. **Toxicology Letters**, v. 215, n. 2, p. 77–83, 2012.

YE, J. et al. Benzylpenicillin inhibits the renal excretion of acyclovir by OAT1 and OAT3. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 505–512, 2013.

ZOJA, C. et al. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 12, p. 2898–2908, 2002.

APÊNDICE

PRODUÇÃO RELACIONADA AO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO:

1. Apresentação de trabalho: Avaliação da Captação de p-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por Células Endoteliais Via *Organic Anion Transporters* (OATS). Londres: Oxford: Oxford Journals, 2015, v. v. 30. p. p. 1-p. 1.
2. Apresentação de trabalho: Avaliação da Captação de p-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por Células Endoteliais Via *Organic Anion Transporters* (OATS). VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015.
3. Resumo publicado em anais de congresso: *p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate uptake by human endothelial cells through organic anion transporters*. In: 52ND ERA-EDTA CONGRESS, 2015, Londres. *p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate uptake by human endothelial cells through organic anion transporters*. Londres: Oxford: Oxford Journals, 2015, v. v. 30. p. p. 1-p. 1.
4. Resumo publicado em formato de pôster: Avaliação da Captação de p-Cresil Sulfato e Indoxil Sulfato por Células Endoteliais Via *Organic Anion Transporters* (OATS), 2015. Simpósio "Ciência no Espelho", 2015.
5. Resumo publicado em formato de pôster: Designer de bio-ferramentas capazes de detectar e caracterizar produtos finais de glicação avançada (ages) no contexto da doença renal crônica (DRC). VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015.

Participação em eventos:

- VI Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia e III Encontro Multidisciplinar em Nefrologia, 2015.
- Simpósio de toxicidade Urêmica no VI congresso Sul Brasileiro de Nefrologia, 2015.
- 2ª Mostra anual de Pesquisa do Setor de Ciências Biológicas “Ciência no Espelho”, 2015.
- Segundo Simpósio de Toxicidade urêmica, PUCPR, 2015.
- Curso de Glomerulopatias (PUCPR), 2014.
- XXVII Congresso Brasileiro de Nefrologia e VI Simpósio Luso-Brasileiro de Nefrologia, 2014.
- Curso Pré Congresso (CBN): Pesquisa Básica - Toxicidade Urêmica e complicações da Doença Renal Crônica, 2014.
- Curso Pré-Congresso (CBN): Encontro Nacional de Prevenção da Doença Renal Crônica- Política e multidisciplinariedade, 2014.

Demais produções técnicas:

- Participação como palestrante do minicurso intitulado “cultivo celular” na VIII jornada do curso de biomedicina e semana de iniciação científica do UniBrasil – EVINCI (2015).

ANEXOS

ANEXO I

(Trabalho submetido)

**Role of Organic Anion Transporters in the Uptake of Protein-bound
Uremic Toxins by Human Endothelial Cells**

Giane Favretto¹, Lauro M. Souza^{2,3}, Paulo C. Gregório¹, Regiane S. Cunha¹, Alessandra B. Finco¹, Guilherme L. Sasaki², Maria G. Toledo⁴, Roberto Pecoits-Filho⁵, Wesley M. Souza⁶, Andréa E. Stinghen^{1*}

¹*Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

²*Biochemistry Department, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980, Curitiba, PR, Brazil.*

³*Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Pequeno Príncipe Complex, 80250-200, Curitiba, PR, Brazil.*

⁴*Farmacy Departament, Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.*

⁵*School of Medicine - CCBS, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 80215-901, Curitiba, PR, Brazil.*

⁶*Bacteriology and Molecular Biology Laboratory, Clinical Analysis Department Universidade Federal do Paraná, 80210-170, Curitiba, PR, Brazil.*

Highlights:

- OAT1 and OAT3 overexpression in human endothelial cells after PCS and IS treatment
- PCS is more actively internalized by endothelial cells than IS
- Blockage of OATs decreases MCP-1 expression after PCS and IS treatment

*Corresponding author: Andréa E. Stinghen, Experimental Nephrology Laboratory, Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Mail Box 19031, Centro Politécnico, Jardim das Américas, CEP 80531-98, Curitiba, Paraná (Brazil). Tel. +55-41-32611691.