

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Impacto da anemia e da inflamação na biodisponibilidade da esfingosina-1-fosfato
na doença renal crônica*

Aluna: Júlia Bacarin Monte Alegre
Orientadora: Prof^a. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral

Curitiba, novembro/2024

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA E CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Impacto da anemia e da inflamação na biodisponibilidade da esfingosina-1-fosfato
na doença renal crônica*

Dissertação de mestrado acadêmico apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral

Curitiba, novembro/2024



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina e Ciências da Vida
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE PASSAGEM DO MESTRADO PARA O DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Exame de Defesa de Projeto de Pesquisa – Número: 16

Aos 26 dias do mês de novembro de 2024 às 09:30, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral - Presidente	
Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho - PUCPR	
Profa. Dra. Andrea Emilia Marques Stinghen - UFPR	

Designada para avaliação do Projeto de Passagem com Defesa do Mestrado para o Doutorado, sob o título **"IMPACTO DA ANEMIA E DA INFLAMAÇÃO NA BIODISPONIBILIDADE DA ESFINGOSINA-1-FOSFATO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA"** da Mestranda **Júlia Bacarin Monte Alegre**, ano de ingresso 2022, do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, de acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os pareceres a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral
Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho
Profa. Dra. Andrea Emilia Marques Stinghen

Conceito: *APROVADA*
Conceito: *Aprovado*
Conceito: *Aprovado*

Parecer Final: *APROVADA*

Observações da Banca Examinadora:

Profa. Dra. Andrea Novais Moreno Amaral
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

FOLHA INFORMATIVA

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR10520, de julho de 2023. O estudo foi realizado no Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), com a orientação da Profa. Dra. Andréa Novais Moreno Amaral. Todos os envolvidos na presente pesquisa declaram não haver conflitos de interesse na dissertação.

RESUMO

Introdução: A esfingosina-1-fosfato (S1P) é um lipídio sinalizador pleiotrópico, envolvido em diversos processos celulares. No sangue, sua alta concentração deriva do armazenamento e transporte por eritrócitos (RBC), cuja funcionalidade pode estar comprometida na doença renal crônica (DRC) devido à eriptose, um fenômeno exacerbado por fatores como toxinas urêmicas e inflamação persistente. Embora seu precursor induza a eriptose, a S1P tem sido sugerida como um potencial mecanismo de proteção celular. **Objetivo:** Estudar o impacto da anemia e inflamação com a concentração plasmática de S1P com na DRC. **Metodologia:** O soro e plasma foram coletados de pacientes estágio V da DRC (DRC-V) em hemodiálise (HD n=19) ou em diálise peritoneal (DP n=26). Após a centrifugação, os RBC isolados foram adicionados a amostras de plasma do mesmo indivíduo, formando um plasma enriquecido de RBC (Plasma+RBC). Através de ELISA, a concentração de S1P foi dosada em plasma e plasma+RBC, enquanto as citocinas (IL-6, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α) foram dosadas do soro. Análise estatística foi realizada com o programa *Graphpad Prism 10*. **Resultados:** Os níveis plasmáticos de S1P aumentaram significativamente com o enriquecimento do plasma por RBC em todos os grupos ($p < 0,0001$). A concentração plasmática de S1P foi menor nos pacientes em HD comparados aos em DP ($p < 0,02$). Foi identificada uma correlação positiva moderada e significativa entre hemoglobina (Hb) e S1P nas populações DP ($r^2 = 0,3702$; $p = 0,001$) e HD ($r^2 = 0,3056$; $p = 0,0174$), sugerindo que a redução dos níveis de S1P possa ser devido a diminuição do número de RBC. Para as citocinas, observou-se uma correlação negativa significativa entre Hb e IL-6, tanto em DP ($r^2 = 0,227$; $p = 0,0139$) quanto em HD ($r^2 = 0,464$; $p = 0,0019$), indicando que níveis mais baixos de Hb estão associados a maior inflamação. Não foram identificadas associações significativas entre Hb e outras citocinas (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) em ambas as populações. Adicionalmente, em DP, foi observada uma correlação negativa entre S1P e IFN- γ ($r^2 = -0,4503$; $p = 0,021$), enquanto em HD, a correlação significativa foi entre S1P e IL-1 β ($r^2 = -0,4579$; $p = 0,0487$), sugerindo padrões distintos de regulação inflamatória. **Conclusão:** Os resultados deste estudo destacam o impacto da anemia e da inflamação na concentração plasmática de S1P. A associação robusta entre Hb, S1P e IL-6 reforça a importância da IL-6 como biomarcador sensível para inflamação associada à anemia. Além disso, os níveis reduzidos de S1P observados em pacientes em HD em comparação com DP reforçam o impacto da inflamação na biodisponibilidade desse lipídeo bioativo.

Palavras-chave: S1P, inflamação, citocinas, anemia, DRC.

ABSTRACT

Introduction: Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a pleiotropic signaling lipid involved in several cellular processes. In blood, its high concentration derives from storage and transport by erythrocytes (RBC), whose functionality may be compromised in chronic kidney disease (CKD) due to eryptosis, a phenomenon exacerbated by factors such as uremic toxins and persistent inflammation. Although its precursor induces eryptosis, S1P has been suggested as a potential cellular protection mechanism. **Objective:** To study the impact of anemia and inflammation on plasma S1P concentration in CKD. **Methodology:** Serum and plasma were collected from stage V CKD (CKD-V) patients on hemodialysis (HD n=19) or peritoneal dialysis (PD n=26). After centrifugation, isolated RBC were added to plasma samples from the same individual, forming an RBC-enriched plasma (Plasma+RBC). The S1P concentration was measured in plasma and plasma+RBC, while cytokines (IL-6, IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α) were measured in serum through ELISA. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 10 software. **Results:** Plasma S1P levels increased significantly with plasma enrichment by RBC in all groups ($p < 0.0001$). Plasma S1P concentration was lower in HD patients compared to PD patients ($p < 0.02$). A moderate and significant positive correlation was identified between hemoglobin (Hb) and S1P in PD ($r^2 = 0.3702$; $p = 0.001$) and HD ($r^2 = 0.3056$; $p = 0.0174$), suggesting that the reduction in S1P levels may be due to a decrease in the number of RBC. For cytokines, a significant negative correlation was observed between Hb and IL-6 in PD ($r^2 = 0.227$; $p = 0.0139$) and HD ($r^2 = 0.464$; $p = 0.0019$), indicating that lower Hb levels are associated with greater inflammation. In either population, no significant associations were identified between Hb and other cytokines (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α). Additionally, in PD, a negative correlation was observed between S1P and IFN- γ ($r = -0.4503$; $p = 0.021$), while in HD, the significant correlation was between S1P and IL-1 β ($r = -0.4579$; $p = 0.0487$), suggesting distinct patterns of inflammatory regulation. **Conclusion:** The results of this study highlight the impact of anemia and inflammation on the plasma concentration of S1P. The robust association between Hb, S1P, and IL-6 reinforces the importance of IL-6 as a sensitive biomarker for anemia-associated inflammation. Furthermore, the reduced S1P levels observed in HD patients compared to PD reinforce the impact of inflammation on the bioavailability of this bioactive lipid.

Keywords: S1P, inflammation, cytokines, anemia, CKD.

RESUMO POPULAR

A esfingosina-1-fosfato (S1P) é uma molécula que atua em diversas funções no organismo humano, em especial, na imunidade. Embora diversas células a produzam, as hemácias possuem a maior capacidade de armazenar e transportar essa substância pelo corpo. Com o agravamento da doença renal crônica (DRC), os indivíduos sofrem com anemia e inflamação, o que piora a sua qualidade de vida. A partir disso, o presente estudo se propôs a avaliar o efeito da anemia e a inflamação na concentração de S1P em pacientes renais crônicos. Os achados confirmam que a disponibilidade da molécula na circulação é prejudicada pela anemia e pela inflamação. Essas associações sugerem que o controle da anemia e inflamação na população renal crônica é essencial para manter níveis normais de S1P. Essa importância se dá por ser esse um lipídio essencial para o bom funcionamento da imunidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese e degradação de esfingosina-1-fosfato.	17
Figura 2 - Regulação da morte e sobrevivência celular mediada pelos esfingolipídios ceramida e S1P.	20
Figura 3 - A balança “Reostato de Esfingolipídio”, seus componentes e suas funções quanto à inflamação.	20
Figura 4 - Tipos celulares nos quais são expressos os receptores de S1P, S1P1-5 e suas funções.	23
Figura 5 - Síntese e degradação de S1P em um eritrócito.	25
Figura 6 - Classificação da DRC com base no dano renal	29
Figura 7 - Comparação da concentração plasmática e de plasma enriquecido com RBC de S1P (nM) na população estudada.	38
Figura 8 - Comparação da concentração plasmática de S1P (nM) na população estudada.	39
Figura 9 - Correlação entre a concentração plasmática de S1P (nM) e níveis de Hb na população estudada.	40
Figura 10 - Comparação da concentração sérica dos mediadores inflamatórios na população estudada.	41
Figura 11 – Correlação entre a concentração sérica dos mediadores inflamatórios com os níveis plasmáticos de S1P na população estudada.	42
Figura 12 – Regressão linear simples entre as variáveis Hb (g/dL), S1P (nM) e citocinas (pg/mL).	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da população do estudo.....	37
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABC	<i>ATP-binding cassett</i>
AEE	Agentes Estimuladores da Eritropoiese
ApoM	Apoliproteína M
Ca ²⁺	Íon de Cálcio
CCL2	Ligante 2 de Quimiocina
DC	Célula Dendrítica
DD	Dependentes de Diálise
DP	Diálise Peritoneal
DRC	Doença Renal Crônica
DRC-V	Doença Renal Crônica Estágio 5
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Eritropoetina
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiálise
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
KDIGO	do inglês <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LabAIRE	Laboratório de Pesquisa em Anemia e Imunologia
LEM	Laboratório Experimental Multiusuário
LPS	Lipopolissacarídeos
Mfsd2b	<i>Major Facilitator Superfamily Transporter 2b</i>
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Gás Oxigênio
PTH	Paratormônio
RBC	do inglês <i>Red Blood Cell</i>
RE	Retículo Endoplasmático
S1P	Esfingosina-1-Fosfato

S1PR ₁₋₅	Receptores de Esfingosina-1-Fosfato 1 a 5
Sph	Esfingosina
SphK 1-2	Esfingosina Quinase 1 e 2
SPL	S1P Liase
Spns2	<i>Spinster Homolog 2</i>
SPP	S1P Fosfatase
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRS	Terapia Renal Substitutiva

Sumário

Aluna: Júlia Bacarin Monte Alegre	1
1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. S1P - esfingolípido bioativo envolvido em vários processos celulares	16
3.2. Doença Renal Crônica (DRC)	26
3.3. Inflamação, Anemia e S1P na DRC.....	30
4. OBJETIVOS	33
4. 1. Objetivo Geral.....	33
4. 2. Objetivos Específicos	33
5. MATERIAIS E MÉTODOS	34
5. 1. População do estudo	34
5. 2. Critérios de inclusão e exclusão.....	34
5. 3. Análise dos dados laboratoriais	34
5. 5. Ensaio Funcionais	35
5. 6. Análise estatística	35
6. RESULTADOS	37
6. 1 Dados da população do estudo.....	37
6. 2 Dosagem de S1P na população DRC-V e correlação com níveis de Hb	38
6.3 Correlação entre a concentração plasmática de S1P e os mediadores inflamatórios.	40
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÃO	50
9. LIMITAÇÕES.....	51
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A esfingosina-1-fosfato (do inglês *Sphingosine-1-Phosphate* - S1P), um produto do catabolismo dos esfingolipídios de membrana, é um mediador pleiotrópico que regula atividades biológicas em diferentes sistemas do organismo, como a mobilização de cálcio intracelular (Olivera *et al.*, 1999), o tráfego de células imunes (Venkataraman *et al.*, 2006), e pode desempenhar papel antiapoptótico, de crescimento e de proliferação celular (Spiegel; Milstien, 2003). O mecanismo primário para a produção de S1P é altamente conservado (Hänel *et al.*, 2007) e o controle dos níveis é balanceado pela síntese e degradação (Spiegel; Milstien, 2003). O plasma apresenta níveis relativamente altos de S1P em comparação com tecidos sólidos, sugerindo um gradiente significativo entre o plasma e o fluido intersticial (Schwab *et al.*, 2007). Estudos mostram que a concentração média de S1P no plasma de indivíduos saudáveis varia de 100 a 300 nM (Knapp *et al.*, 2010, Baranowski *et al.*, 2011, Knapp *et al.*, 2013), dependendo da população analisada (Hammad *et al.*, 2010, Sattler *et al.*, 2010, Baranowski *et al.*, 2014).

Apesar de que Ito *et al.* (2007) relataram que os eritrócitos (do inglês *red blood cells* – RBC) contém uma concentração menor de S1P por célula em comparação às plaquetas, contribuem significativamente mais para o pool total de S1P devido à sua predominância no sangue (95% das células) são a principal fonte da molécula na circulação (Hänel *et al.*, 2007). No sangue total, 14% do S1P é encontrado no plasma, 32% nas plaquetas e 54% nos RBC (Ito *et al.*, 2007). Desta forma e por possuir alta atividade da enzima de síntese pela esfingosina quinase 1 (SphK1) e baixa atividade das enzimas degradantes, S1P liase e S1P fosfatase, além de serem capazes de importar S1P do microambiente circundante, os RBC são também considerados os principais armazenadores de S1P (Qadri *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 1999.)

Para exercer e regular diversas funções, a S1P se liga a receptores específicos expressos em uma ampla variedade de células e tecidos (Graler, 2010; Hänel *et al.*, 2007;

Karliner, 2004; Rosen; Goetzel, 2005). No sangue, a S1P livre é majoritariamente transportada pela lipoproteína de alta densidade (HDL). É através do HDL que a S1P se encontra bioativa no sistema cardiovascular, no qual participa na mediação de efeitos cardiovasculares (Argaves; Argaves, 2007), cumpre o papel crucial de cardioproteção (Karliner, 2013) e pode ser atribuída às propriedades de manutenção da homeostase endotelial e vasodilatação arterial (Levkau, 2015). Estudos indicam que tanto pacientes anêmicos quanto aqueles com infarto do miocárdio apresentam níveis reduzidos de S1P no plasma em comparação com indivíduos saudáveis (Knapp *et al.*, 2009; Bode *et al.*, 2010; Selim *et al.*, 2011). A concentração de S1P no plasma humano apresenta uma forte correlação positiva com parâmetros relacionados aos RBC. Em pacientes anêmicos, além da redução nos níveis plasmáticos de S1P, observa-se que a anemia afeta seletivamente o pool de S1P associado às partículas de HDL, levando ao seu esgotamento (Ohkawa *et al.*, 2008, Bode *et al.*, 2010, Selim *et al.*, 2011).

A anemia é uma complicação comum na doença renal crônica (DRC), principalmente nos estágios avançados da doença, sendo associada ao aumento no número de internações, maior mortalidade e pior qualidade de vida dos pacientes (Chen *et al.*, 2021; Malyszko *et al.*, 2007). A queda da eritropoiese pela falta da produção endógena de eritropoietina (EPO) pelos rins e falha na absorção de ferro são as principais causas da anemia renal (Portolés *et al.*, 2021). Ainda, em pacientes acometidos pela DRC o número de RBC eritóticos é significativamente maior que a população sem a doença (Dias *et al.*, 2020; Lang *et al.*, 2017; Lang; Lang, 2015). Já foi descrito que toxinas urêmicas (Dias *et al.*, 2018; Tozoni *et al.*, 2019), estresse oxidativo (Dias *et al.*, 2018; Lang *et al.*, 2016), hipoxemia (Tozoni *et al.*, 2019) e inflamação (Pretorius, 2018) contribuem para o aumento da eritose nessa população. Vários estudos indicam que a eritose aumentada em pacientes com DRC leva a eliminação precoce e acelerada dos RBC circulantes (Abed *et al.*, 2014; Bissinger *et al.*,

2021; Bonan *et al.*, 2016).

Qadri e colaboradores descreveram a indução de eriptose como uma nova função da esfingosina, com base na análise *in vitro* que mostrou aumento da atividade do Ca^{2+} citosólico, redução da fluidez da membrana e exposição de fosfatidilserina na superfície dos RBC, efeitos ausentes quando as células foram tratadas com S1P. Os autores sugerem que a conversão de esfingosina em S1P pela SphK1 pode proteger os RBC da eriptose induzida pela esfingosina (Qadri et al., 2011). Além disso, considerando que níveis elevados de S1P podem atuar como um mecanismo de proteção contra a eriptose, essa ação poderia também aumentar indiretamente a entrega de oxigênio (O_2) para os tecidos (Sun et al., 2016).

O presente estudo propõe a hipótese de que a concentração de S1P em pacientes renais crônicos é negativamente influenciada pela redução no número de eritrócitos, característica da anemia renal. Essa diminuição nos níveis de S1P poderia impactar a resposta inflamatória, devido à sua menor biodisponibilidade no plasma.

2. JUSTIFICATIVA

Embora existam interações entre anemia e alterações imunológicas associadas à redução da biodisponibilidade de esfingosina-1-fosfato, a relação desse lipídio com a doença renal crônica permanece pouco elucidada na literatura.

Nesse contexto, a S1P pode atuar como um biomarcador das disfunções nos sistemas cardiovascular e neurológico típicas dessa população e se apresentar como um potencial alvo terapêutico. Além disso, a análise dos níveis de S1P pode proporcionar uma compreensão mais detalhada da fisiopatologia da doença, possibilitar intervenções mais eficazes e contribuir positivamente para os desfechos clínicos e a qualidade de vida dos pacientes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

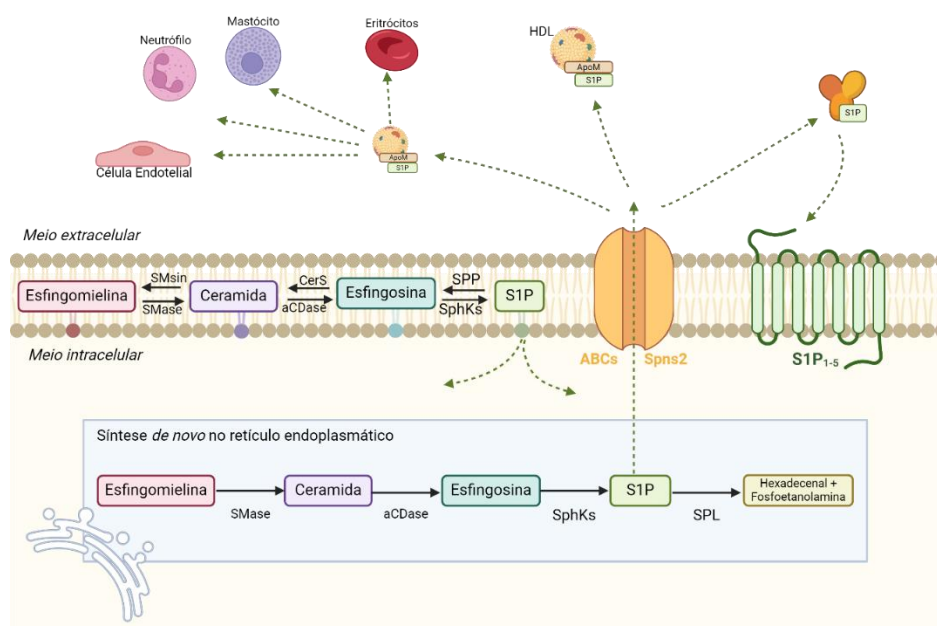
3.1. S1P - esfingolípido bioativo envolvido em vários processos celulares

Os esfingolípídios emergem como componentes cruciais na regulação dos sistemas de transdução de sinal de membrana, desempenhando um papel fundamental em uma variedade de processos celulares (Hannun; Obeid, 2018). Entre esses lipídios, a S1P destaca-se como um mediador esfingolípido bioativo único que exerce funções de mensageiro intracelular quanto extracelular (Yatomi *et al.*, 2001) e a desregulação de seu metabolismo e sinalização está envolvida em diversas doenças (Nishiuma *et al.*, 2008).

A S1P pode ser produzida no retículo endoplasmático (RE) via síntese de novo e na membrana plasmática (MP) via de síntese de salvamento, em todos os tipos celulares através da fosforilação da esfingosina (Sph) (Schwab *et al.*, 2005; Xiao, 2023), o que facilita sua capacidade de regular diferentes mecanismos (Figura 1). Todavia, RBC, plaquetas, mastócitos, neutrófilos e células endoteliais são exemplos de células associadas à secreção do lipídio, principalmente no sangue, embora seus mecanismos se diferenciem (Thuy *et al.*, 2014). Em especial, RBC se destacam no armazenamento e transporte da molécula no plasma e as plaquetas pela secreção, como evidenciado em caso de sepse (Yatomi *et al.*, 1997).

Os níveis de S1P são balanceados a partir da síntese pela ação das enzimas esfingosina quinases 1 e 2 (Sphk ou SK 1 e 2) e da degradação irreversível pela enzima S1P liases (SPL) ou degradação reversível da S1P fosfatase (SPP) no RE (Spiegel; Milstein, 2003).

Figura 1 - Síntese e degradação de esfingosina-1-fosfato.



Fonte: a autora, adaptado de Blaho; Hla (2014) e Xiao (2023).

As esfingosina quinases podem ser moduladas por estímulos agonistas e, assim, afetar os níveis de S1P. Entre eles estão a hipóxia, fatores de crescimento e sobrevivência, hormônios, antígenos e citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) (Billich *et al.*, 2006; Hannun; Obeid 2008; Kim *et al.*, 2009; Maceyka *et al.*, 2002). O TNF- α , por exemplo, ativa e transloca a SphK1 para a membrana plasmática, na qual a enzima catalisa S1P (Pitson *et al.*, 2003), molécula que medeia respostas produzidas pela citocina em inúmeros tipos celulares (de Palma *et al.*, 2006; Snider *et al.*, 2009). Essa ativação de SphK1 pelo TNF- α desencadeia efeitos secundários envolvidos na resposta imunológica como a degranulação de monócitos e a transcrição de moléculas de adesão (Snider *et al.*, 2009).

Em casos de desequilíbrio de homeostase, ambas as SphKs são capazes de abastecer o sangue e a linfa com S1P, entretanto, no ambiente extracelular, apresentam diferenciação na distribuição tecidual e expressão (Pappu *et al.*, 2007) e no ambiente intracelular diferem na localização. Enquanto a SphK1 é encontrada no citoplasma e translocada para a

membrana plasmática conforme sua ativação (Pitson *et al.*, 2003), a SphK2 está presente nas membranas do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi e de endossomos, nas mitocôndrias e no núcleo (Neubauer; Pitson, 2013; Strub *et al.*, 2011).

Outro aspecto que as diferenciam é o papel atribuído: a SphK1 promove a inflamação e a SphK2 modula a inflamação (Adada *et al.*, 2015). SphK1 induz a proliferação celular (Oliveira *et al.*, 1999), é altamente expressa e essencial para a invasão celular e angiogênese (Salama *et al.*, 2015) e pode estar envolvida na autofagia celular (Lavieu *et al.*, 2006). A síntese de S1P por essa enzima está presente em diversos processos como na regulação da proliferação e sobrevivência celular em tumores, apresenta efeito citoprotetores (French *et al.*, 2006; Neubauer; Pitson, 2013), na sepse (Spiegel; Milstein, 2011) e na migração celular (Roviezzo *et al.*, 2004). Com a inibição de SphK1, estudos apontam a supressão de moléculas que amplificam a inflamação, as citocinas TNF- α , Interleucinas 4, 5, 6 e 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), Interferon gama (IFN- γ), ao sugerir a inibição do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) (Alvarez *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2013), além de diminuir a infiltração de eosinófilos na inflamação aguda (Nishiuma *et al.*, 2008).

Em paralelo, o papel da SphK2 não é igualmente elucidado. Estudos apontam que a enzima é pró-apoptótica, uma vez que é capaz de impedir a proliferação celular, suprimir o crescimento celular, elevar a apoptose e, então, neutralizar o efeito de SphK1 (Ding *et al.*, 2007; Harvald; Olsen; Faergeman, 2015; Maceyka *et al.*, 2005). Com a depleção de SphK2, a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ é aumentada (Lai *et al.*, 2009) e por se associar ao receptor de Interleucina 12 (IL-12) em linfócitos T, Yoshimoto e colaboradores (2003) sugerem que SphK2 possui uma ação imunomoduladora.

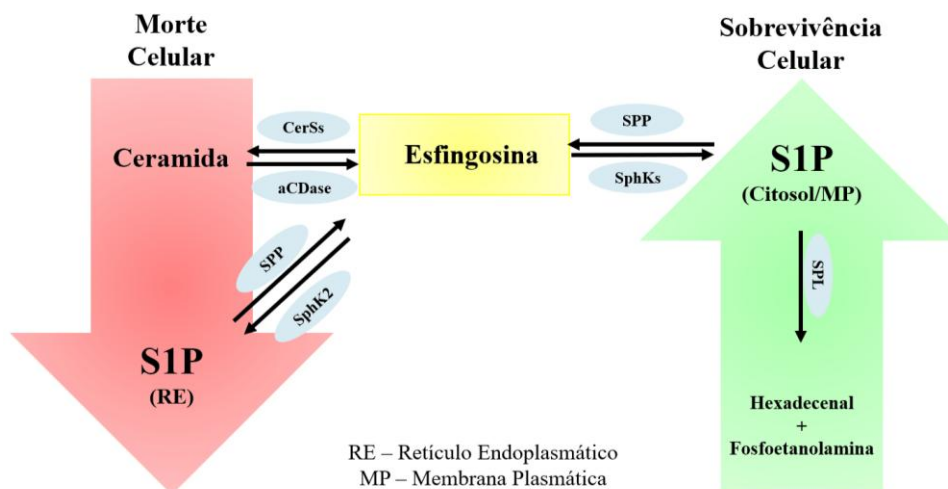
De maneira geral, a ação conjunta das enzimas quinases e a síntese de S1P estão relacionadas a uma variedade de doenças tais como doenças inflamatórias, doenças cardiovasculares, isquemia e câncer (Adada *et al.*, 2013).

Já a degradação ocorre quando a enzima SPL quebra a molécula e originam dois produtos que são reaproveitados em outros processos e as enzimas S1P fosfatases (SPP) retiram o grupo fosfato adicionado anteriormente à S1P e produzem esfingosina (Spiegel; Milstien, 2003). Esse último processo que pode induzir a apoptose e a eriptose, pela diminuição dos níveis de S1P e pelo aumento de ceramida, um esfingolípido pró-apoptótico (Mandala *et al.*, 2000; Qadri *et al.*, 2011), responsável por inibir o crescimento celular e induzir a morte celular. Por outro lado, a S1P contribui para a sobrevivência e proliferação celular (Harvald; Olsen; Faergeman, 2015).

A concentração de ambas as moléculas está intimamente ligada, uma vez que a S1P é um metabólito da ceramida. A ceramida é convertida em esfingosina pela ação da enzima ceramidase ácida e, como já mencionado, a esfingosina em S1P pelas SphKs (Osawa *et al.*, 2005) (Figura 2). Nesse caso, a inibição da expressão de SphK2 diminui a conversão de esfingosina em ceramida, enquanto a inibição de SphK1 por TNF- α aumenta essa conversão e, conseqüentemente, a concentração de ceramida, que intensifica a inibição de eritropoiese e a indução da mielopoiese (Maceyka *et al.*, 2005; Orsini *et al.*, 2019).

Ademais, o balanceamento dos níveis de S1P e ceramida compõem um mecanismo chamado “Reostato de Esfingolípido” (do inglês *Sphingolipid Rheostat*) (Figuras 2 e 3), que regula o crescimento celular, a autofagia e a apoptose, por determinar o destino celular: se a célula sobrevive ou morre (Cuvillier *et al.*, 1996; Horváth *et al.*, 2023).

Figura 2 - Regulação da morte e sobrevivência celular mediada pelos esfingolípídios ceramida e S1P.

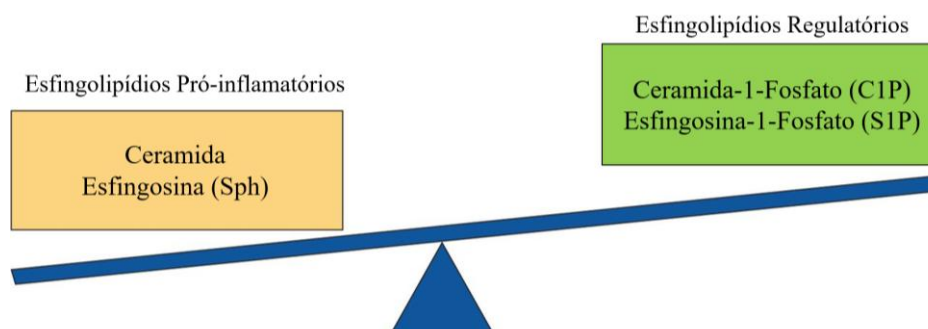


Fonte: Adaptado de Harvald; Olsen; Faergeman, (2015).

Esse mecanismo é encontrado desregulado em doenças como o câncer, por apresentar diversos efeitos inflamatórios, dos quais a ceramida e a esfingosina desempenham função pró-inflamatória e a S1P e a ceramida-1-fosfato anti-inflamatória (Chakinala *et al.*, 2019; Maceyka *et al.*, 2002) (Figura 3).

Estudos *in vivo* com roedores, demonstraram que, em tecidos pulmonares com alta expressão de ceramida, o aumento da concentração de S1P resultou na restauração da capacidade proliferativa de células endoteliais pulmonares, na preservação da morfologia e na redução dos processos de apoptose (Diab *et al.*, 2010; Schweitzer *et al.*, 2015).

Figura 3 - A balança “Reostato de Esfingolípídio”, seus componentes e suas funções quanto à inflamação.



Fonte: Adaptado de Chakinala e colaboradores (2019).

A S1P é um mediador inflamatório, que regula componentes e vias das imunidades inata e adaptativa (Rivera *et al.*, 2003) e regula atividades como a angiogênese, a homeostase da barreira endotelial (Wilkerson; Argraves, 2014), o remodelamento do citoesqueleto e a liberação de citocinas através de seus receptores (An; Zheng; Bleu, 2000; Eyster, 2007; Zhao *et al.*, 2013).

Após ser excretada no ambiente extracelular, a molécula depende de seus receptores S1PR₁₋₅ (S1P₁₋₅) para se tornar bioativa. Esses receptores pertencem à família de receptores acoplados à proteína G e são expressos em células do sistema imunológico, como linfócitos T (S1PR₁ e S1PR₄), linfócitos B (S1PR₁, S1PR₂, S1PR₃ e S1PR₄), células NK (S1PR₁ e S1PR₅) (Blaho; Hla, 2014), bem como em células endoteliais (S1PR₁ e S1PR₃) (Fukuhara *et al.*, 2012; Sanchez; Hla, 2004). Quando ligados ao lipídio, ativam diversas vias de sinalização (Spiegel; Milstien, 2011) e estão associados a mecanismos de atuação de S1P como proliferação celular, migração e adesão célula-célula (Okamoto *et al.*, 2011) e cicatrização de feridas (Moon *et al.*, 2012).

Funções específicas de S1P, em diferentes tipos celulares, dependem fundamentalmente do padrão de expressão do subtipo do receptor (Figura 4). A atuação extracelular da molécula pode, por exemplo, estimular ou inibir a migração celular, respectivamente pelas vias de S1PR₁ ou S1PR₃ e S1PR₂ (Sanchez; Hla, 2004). Dentre os cinco tipos, esses três receptores são mais aprofundados na literatura e, muitas vezes, seus papéis aliados à S1P são interligados ou opostos.

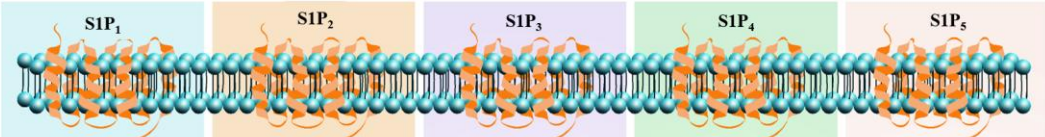
Em células endoteliais, S1PR₁, S1PR₂ e S1PR₃, regulam o desenvolvimento e integridade vascular e somente S1PR₁ e S1PR₃ estão associados com o aumento da migração dessas células (Blaho; Hla, 2014; Kimura *et al.*, 2000). Enquanto S1PR₁ possui efeitos nefroprotetores e S1PR₃ pode reduzir a injúria e inflamação renal, o S1PR₂ é relatado como antagonista desses processos (Jo *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2012). Já S1PR₂ e S1PR₃ estão

envolvidos na proliferação celular de mastócitos (Katsuma *et al.*, 2005) e, com a elevação dos níveis de S1P por macrófagos, esses receptores desencadeiam expressão de mediadores pró-inflamatórios como CCL2, IL-1 β , e IL-18 (Skoura *et al.*, 2010) e S1PR₁ e S1PR₃ medeiam a produção de IL-6 e IL-8 por lipopolissacarídeos (LPS) em células epiteliais (Eskam *et al.*, 2008).

Individualmente, o S1PR₁ está envolvido na saída de linfócitos do timo e dos órgãos linfoides periféricos, fundamental para a imunovigilância (Schwab *et al.*, 2005) e no aumento da secreção de sódio pelos rins (Zhu *et al.*, 2011). Além disso, o receptor participa do balanceamento de S1P que afeta o funcionamento dos linfócitos T, uma vez que a diminuição dos níveis de S1P inibe a proliferação de T CD4 e a produção de IFN- γ e IL-4 (Dorsam *et al.*, 2003). Já S1PR₂ está envolvido em efeitos pró-fibróticos dos quais a S1P extracelular exerce, como no desenvolvimento da permeabilidade e disfunção endotelial, ao participar da indução da resposta pró-inflamatória e ativação da NF- κ B, que influencia nos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 (Koch *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2017).

Em contrapartida, estudos com foco nos receptores S1PR₄ e S1PR₅ são escassos. Graeler e Goetzl (2002) demonstraram que, juntamente com S1PR₁, o S1PR₄ é o receptor predominante em células T CD4 e CD8 em seres humanos e em ratos e auxilia na mediação das funções celulares. Aliado a esses tipos celulares e na presença de S1PR₄, a S1P atua na inibição da proliferação celular, inibição da secreção de IFN- γ e IL-2 e elevação da concentração de IL-10. Já em relação as células B, a participação S1P em conjunto com seu receptor está associada a diminuição da proliferação celular (Jo *et al.*, 2008). Por fim, S1PR₅ é essencial para a indução de autofagia pela ação de S1P (Chang *et al.*, 2009), processos que ocorrem no sistema nervoso central e mediação de migração e funções celulares (Chun; Giovannoni; Hunter, 2020).

Figura 4 - Tipos celulares nos quais são expressos os receptores de S1P, S1P1-5 e suas funções.

Receptor					
Localização	S1P ₁ Linfócitos T e B, NK, macrófagos, monócitos, células dendríticas, endoteliais, músculo liso, células do SNC	S1P ₂ Linfócitos B, monócitos, macrófagos, células endoteliais, músculo liso, células do SNC, neurônios	S1P ₃ Linfócitos B, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, músculo liso, células do SNC, neurônios	S1P ₄ Linfócitos T e B, macrófagos, monócitos, células dendríticas, hematopoieticas, musculares lisas	S1P ₅ NK, neurônios, células do SNC
Função	Desenvolvimento e integridade vascular, migração celular, efeitos nefroprotetores, participa da produção de IL-6 por LPS e migração de linfócitos T	Desenvolvimento e integridade vascular, proliferação de mastócitos, antagonista de funções de S1P ₁ e S1P ₃ , envolvido na ação pró-fibrótica de S1Pe	Desenvolvimento e integridade vascular, migração celular, pode reduzir injúria e inflamação renal, proliferação de mastócitos	Migração de linfócitos, modulação de células dendríticas e Th17, redução da proliferação celular e inibição da secreção de IFN-γ (por T CD4+)	Indução de autofagia, mediação de funções celulares e migração celular (neurais)

Fonte: A autora, adaptado de Chun; Giovannoni; Hunter (2020).

A regulação da circulação de linfócitos, o funcionamento de linfócitos T, o tráfico de leucócitos e a manutenção da função da barreira endotelial são alguns dos processos fisiológicos dependentes do gradiente S1P (Mendoza *et al.*, 2012; Wilkerson; Argraves, 2014). A manutenção desse gradiente se dá através da síntese de S1P pelas enzimas SphKs, da degradação por SPL e SPP e da captação celular, armazenamento e liberação de S1P (Wilkerson; Argraves, 2014). Em mamíferos, a concentração de S1P é de aproximadamente de 0,0005 a 0,075nM nos tecidos, 100 a 300 nM na linfa e 100 nM e 300 nM no plasma e de 2000 nM no sangue total (Hänel *et al.*, 2007; Nagahashi *et al.*, 2016; Pappu *et al.*, 2007; Venkataraman *et al.*, 2008).

A liberação de S1P no meio extracelular ocorre através da presença de transportadores de superfície celular, que variam conforme o tipo celular. Os ABCs (do inglês *ATP-binding cassett*) estão presentes em mastócitos, células endoteliais e astrócitos, tipo celular neural (Nagahashi *et al.*, 2014), o Spns2 (do inglês *Spinster homolog 2*) que também aparece em células endoteliais e em vesículas celulares (Mendoza *et al.*, 2012) e o Mfsd2b (do inglês *Major facilitator superfamily transporter 2b*) encontrado em RBC e plaquetas (Vu *et al.*, 2017).

Por meio de Spns2, a S1P é secretada na linfa e no sangue (Mendonza *et al.*, 2012) e pode se ligar ao receptor S1PR₂ (Adada *et al.*, 2015). Tanto Spns2 quanto Mfsd2b são capazes de exportar e importar o lipídio nas células que os possuem, além de participarem da manutenção dos níveis de S1P plasmático, que é essencial contra a anafilaxia e a regulação do desenvolvimento vascular (Le *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2020). De acordo com Ghaderi e Levkau (2023), em RBC deficientes de Mfsd2b, o acúmulo celular de S1P resulta em anormalidades na membrana e estomatocitose, doença na qual há distúrbios na permeabilidade da membrana (Gallagher, 2013), o que confirma que S1P participa da regulação da forma celular, hidratação e organização do citoesqueleto dessas células.

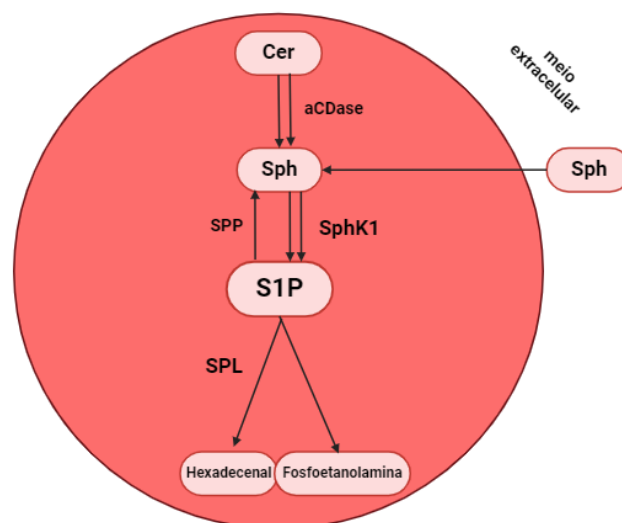
Nos compartimentos vasculares, a S1P é carregada por lipoproteínas, em especial pelas HDL, através da ligação à Apolipoproteína M (ApoM), e em menor quantidade pela albumina (Murata *et al.*, 2000; Okajima, 2002) e na corrente sanguínea, é transportada majoritariamente por RBC. Dessa forma, a regulação da atividade biológica da S1P não só está relacionada ao seu nível total circulante, como também à sua distribuição pelos RBC, que desempenham um papel essencial ao tamponar, capturar e liberar esse lipídio bioativo.

Estudos prévios sugerem que a anemia em humanos está associada a uma redução nos níveis plasmáticos de S1P e que a capacidade total de armazenamento de S1P nos RBC pode influenciar os níveis plasmáticos de S1P em humanos (Bode *et al.*, 2010; Hanel *et al.*, 2007; Venkataraman *et al.*, 2008). Além disso, tanto o HDL quanto a albumina têm o poder de induzir a liberação de S1P dos RBC (Bode *et al.*, 2010). Essas descobertas, aliadas à capacidade dos RBC isolados de absorver S1P do meio, deram origem a um modelo proposto de homeostase circulante de S1P. Nesse modelo, os RBC atuam como protetores do lipídio, enquanto a capacidade de ligação de componentes plasmáticos, como HDL e albumina, regula a liberação da S1P dessas células.

Não somente responsáveis pelo transporte, RBC são adaptados para armazenar e proteger altas concentrações de S1P da degradação, o que corresponde a cerca de 50% da concentração encontrada no plasma e, como já mencionado, de 2000 nM no sangue total (Hänel *et al.*, 2007; Pappu *et al.*, 2007). A capacidade eficaz de armazenamento é atribuída a um possível mecanismo de “reciclagem” para a esfingosina (Sph), uma vez que os RBC importam essa molécula do ambiente extracelular e possuem altos níveis de atividade da enzima SphK1 (Figura 5) (Yang *et al.*, 1999). Estudos relatam que essas células não possuem as enzimas degradantes, SPL e SPP, entretanto, Selim e colaboradores (2011) demonstraram que há baixa atividade de ambas as enzimas na membrana plasmática de RBC (Figura 5), o que pode impactar no armazenamento prolongado de S1P no sangue.

A diminuição acentuada dos níveis de S1P em RBC parece contribuir para eventos clínicos adversos, como edema pulmonar e função imunológica prejudicada (Selim *et al.*, 2011). Em pacientes com infarto do miocárdio, a diminuição nos níveis plasmáticos de S1P se associa ao aumento da atividade da enzima SphK, em especial da expressão de SphK1, nos RBC (Knapp *et al.*, 2013).

Figura 5 - Síntese e degradação de S1P no RBC.



Fonte: A autora, adaptado de Ksiazek e colaboradores (2015).

Embora as funções de S1P plasmática estejam bem descritas na literatura, a relação entre as funções de S1P e a fisiologia eritrocitária ainda são desconhecidas. De acordo com Qadri e colaboradores (2011), níveis elevados de S1P no plasma humano, funcionam como um mecanismo de proteção contra eriptose, além de que a S1P é responsiva ao estímulo desencadeado pela hipóxia intracelular, que promove a glicólise eritrocitária e aumenta a entrega de oxigênio (O^2) para as células nucleadas (Sun *et al.*, 2016). Como já relatado, estudos apontam que quando comparadas com amostras de voluntários saudáveis, amostras de pacientes anêmicos possuem redução nos níveis de hematócrito e de S1P plasmático (Bode *et al.*, 2010; Selim *et al.*, 2011).

3.2. Doença Renal Crônica (DRC)

A DRC é considerada um problema de saúde pública e afeta de 10 a 12% da população mundial, causada pelo aumento da expectativa de vida e de doenças como o diabetes *mellitus* e a hipertensão arterial e impacta econômica e socialmente (Bauer *et al.*, 2024; Gansevoort *et al.*, 2013; Hallan *et al.*, 2006). No Brasil, entre os anos de 2009 e 2020, foram registradas mais de 80 mil mortes, associadas com a elevação da idade e com o sexo masculino (Gouvêa *et al.*, 2023).

A doença é classificada com base na redução da taxa de filtração glomerular (TFG), categorizada entre os estágios G1 a G5 e determina o estadiamento da função renal, e do aumento da albuminúria, de A1 a A3 e que demonstra o estágio de dano do rim (KDIGO, 2024) (Figura 6). Embora possibilitem reversão do quadro clínico, os estágios iniciais da doença são quase sempre assintomáticos (Levey; Coresh, 2011). Ao atingir o estágio G4, os nefrologistas preparam o paciente para o encaminhamento às terapias renais substitutivas (TRS), hemodiálise (HD) ou diálise peritoneal (DP), conforme a disponibilidade ou caso, enquanto aguardam o transplante renal, terceira modalidade de TRS, que ocorre em G5

(Titan, 2013).

A HD é a TRS mais conhecida e é realizada em uma unidade de diálise ambulatorial, em clínicas e em hospitais, 3 vezes por semana e durante cerca de 3 a 4 horas, sob responsabilidade de funcionários capacitados e que possibilita a utilização de uma mesma máquina por diferentes pacientes. Embora proporcione socialização e reduza a responsabilidade do paciente, a HD possui baixa tolerância hemodinâmica, altos riscos de bacteremia e necessita de manutenção do acesso vascular (Rubin *et al.*, 2004; Sinnakirouchenan; Holley, 2011).

Por outro lado, a DP é utilizada pelo indivíduo em sua própria casa, sem a necessidade de se deslocar ao centro de diálise com frequência, após passar por treinamento com a equipe. Pode ser realizada de duas maneiras: por diálise peritoneal ambulatorial contínua, que consiste em 4 ou 5 trocas manuais de fluido de dialisato ou por uma máquina cicladora automatizada, cíclica e pré-programada (diálise peritoneal automática - DPA), que deposita e aspira o líquido na cavidade peritoneal (Rubin *et al.*, 2004; Teitelbaum, 2021). Quando divulgada de forma adequada aos pacientes, a DP possui uma alta taxa de escolha e de avaliações positivas quanto aos cuidados dialíticos, além de apresentar maiores taxas de sobrevivência até os 2 primeiros anos de uso, corroborar com a manutenção da função renal residual e reduzir a necessidade de voltar à diálise pós transplante. Todavia, é limitada por possíveis peritonites, baixo *clearance* peritoneal e transferências para a HD (Rubin *et al.*, 2004; Sinnakirouchenan; Holley, 2011), sem contar que após 2 anos, as taxas de mortalidade de DP podem se igualar ou ultrapassar HD (Sinnakirouchenan; Holley, 2011). As duas modalidades apresentam uma taxa de sobrevida similar, uma vez que as comorbidades, a idade e a causa da diminuição da TFG são responsáveis por esse fator (Vonesh *et al.*, 2004).

Na DRC, a anemia é a complicação de maior incidência e prevalência e que se instala de maneira gradual, conforme o agravamento da perda da função renal (Yilmaz *et al.*, 2011) e diminuição da TFG (McClellan *et al.*, 2004). Para um indivíduo ser considerado anêmico, necessita, em um primeiro momento, ter diminuição de na concentração de hemoglobina (Hb) e número eritrocitário (de Santis, 2019). A patogênese da anemia em pacientes com DRC é multifatorial, tendo como causa predominante a deficiência na produção de EPO pelos fibroblastos peritubulares renais e deficiência de ferro (KDIGO, 2012).

Em ambientes com alta concentração de solutos acumulados na circulação pela perda da função renal, chamados de toxinas urêmicas, a eriptose, morte não programada e precoce de RBC circulantes, é acentuada, o que diminui a porcentagem de hematócrito no sangue e contribui para a anemia em pacientes renais crônicos (Ahmed *et al.*, 2013; Bonan *et al.*, 2016; Nicolay *et al.*, 2006; Tozoni *et al.*, 2019). Além das toxinas urêmicas, estudos demonstram que em doentes renais crônicos, a eriptose é também associada ao estresse oxidativo, à inflamação e ao paratormônio (PTH) (Cachoeiro *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2018; Vaziri *et al.*, 2012).

Os primeiros sinais da anemia se tornam evidentes quando a TFG chega em 50mL/min, e em média a concentração de Hb nesse grupo é 2,5 g/dL menor em relação aos indivíduos com TFG maior (Zoccali, 2002). Isso pode ser observado em indivíduos possuem a classificação da sua doença no estágio G3a (Figura 6), na qual a função renal possui diminuição leve a moderada.

Figura 6 - Classificação da DRC com base no dano renal

DRC Classificação e Estadiamento				Estágio de dano do rim		
Verde: Risco baixo (RB)				Razão albumina/creatinina urinária		
Amarelo: Risco moderado (RM)				Descrição e variação		
Laranja: Risco alto (RA)				A1	A2	A3
Vermelho: Risco muito alto (RMA)				Aumento normal a leve < 30 mg/g	Aumento moderado 30-300 mg/g	Aumento grave > 300 mg/g
Estadiamento da função renal TFG (mL/min/1,73m ²) Descrição e variação	G1	Normal ou alto	≥ 90	RB	RM	RA
	G2	Diminuição leve	60-89	RB	RM	RA
	G3a	Diminuição leve a moderada	45-59	RM	RA	RMA
	G3b	Diminuição moderada a grave	30-44	RA	RMA	RMA
	G4	Diminuição grave	15-29	RMA	RMA	RMA
	G5	Insuficiência renal	<15	RMA	RMA	RMA

Retirado de KDIGO, 2012. Mantida no KDIGO de 2024.

A anemia renal é caracterizada como normocítica e normocrômica e hipoproliferativa, na qual não há alteração na cor e formato do eritrócito e é causada pela falha produção de EPO, agravada pela inflamação (Adamson *et al.*, 2009; Mims; Miller-Chism; Sosa, 2020). É definida pelos níveis de Hb menores que 12,0g/dL em homens e que 11,0g/dL em mulheres (KDIGO, 2024), e ocorre em cerca de 70% dos pacientes que se encontram em estágios avançados da DRC (Yilmaz *et al.*, 2011) e em cerca de 93% dos pacientes dependentes de diálise (DD) (Evans *et al.*, 2020). Consequentemente à redução de RBC, há diminuição no transporte do oxigênio para os tecidos e aumento no estresse oxidativo, visto que essas células comportam moléculas de defesa antioxidante, o que resulta na piora de qualidade de vida e pior prognóstico para os pacientes (Bissinger *et al.*, 2018).

No estudo multicêntrico de Wong e colaboradores (2020) o aumento da porcentagem de anemia foi relacionada com a redução da TFG na amostra da população brasileira avaliada. Dentre os pacientes classificados como estágio 3, cerca de 28% possuíam anemia, no estágio 4 foram 49% e no estágio 5 foram 77% dos pacientes. Nesse mesmo estudo, a

hipertensão arterial e a diabetes foram as principais causas primárias da DRC e comorbidades que afetam os pacientes recrutados (Wong *et al.*, 2020).

Nessa população de renais crônicos, a anemia é comumente tratada através do uso dos agentes estimuladores da eritropoiese (AEEs) e de suplementos de ferro via oral ou intravenosa (Portolés *et al.*, 2021), com o objetivo de conduzir o paciente até 11,5g/dL de Hb (KDIGO, 2012). Para Evans e colaboradores, cerca de 82% dos pacientes dependentes de diálise fazem uso de AEEs e 62% de ferro.

3.3. Inflamação, Anemia e S1P na DRC

Indivíduos acometidos pela DRC enfrentam um estado inflamatório crônico, o qual está intrinsecamente vinculado a diversos fatores subjacentes, como uma maior propensão a infecções, elevação e produção persistente de citocinas pró-inflamatórias por células efetoras circulantes e residentes, ambiente urêmico, disseminação da arteriosclerose, estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2021; Malyszko *et al.*, 2007). A própria perda gradual da função renal leva à inflamação crônica sistêmica na progressão da doença, impulsionada por fatores como a diabetes *mellitus*, hipertensão e obesidade comumente presente nessa população (Chen *et al.*, 2021).

De acordo com estimativas, mais de 30% a 50% dos pacientes com doença renal avançada apresentam evidência sorológica de um estado inflamatório ativo, conforme indicado por níveis elevados de proteína C reativa e citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Kimmel *et al.*, 1998; Yeun *et al.*, 2000; Stenvinkel *et al.*, 2002). Entre os fatores associados à persistência da inflamação de baixo grau em pacientes com DRC, estão o estresse oxidativo, complicações infecciosas, diminuição da depuração de citocinas e fatores relacionados à diálise (Stenvinkel; Alvestrand, 2002).

O estresse oxidativo, promovido pelas toxinas urêmicas como o indoxil sulfato (IS),

induz a inflamação ao ativar o NF- κ B que produz e eleva os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, exacerbando o estado inflamatório (Queisser; Schupp, 2012; Stockler-Pinto *et al.*, 2016). O TNF- α participa da regulação positiva de outros marcadores inflamatórios e na fibrose renal através da diminuição dos sinais pró-apoptóticos (Taguchi *et al.*, 2021), ativa respostas inflamatórias endoteliais e recruta células imunológicas como monócitos e macrófagos. Ainda, essa citocina inibe a liberação da hepcidina, molécula responsável por regular o ferro celular e que é liberada por LPS e a IL-6 (Nemeth *et al.*, 2004). Já a IL-6 juntamente com IL-1 β são associados com cicatrizes renais e supressão da secreção de PTH, e somente a secreção de IL-1 β por macrófagos pode resultar em fibrose renal (Feroze *et al.*, 2011; Mack, 2018).

Foi demonstrado que as citocinas pró-inflamatórias afetam simultaneamente a eritropoiese em vários níveis, incluindo a supressão da proliferação de células progenitoras eritróides (Yilmaz *et al.*, 2011). Allen e colaboradores (1999) mostraram inibição da formação de colônias eritróides por fatores solúveis no soro de pacientes com doença renal em estágio avançado e doença inflamatória. Estudos *in vivo* confirmaram que a administração de TNF- α promove anemia hipoproliferativa através de um efeito direto nas células progenitoras eritróides e estimulação indireta da produção de IFN- γ (Goicoechea *et al.*, 1998).

Por outro lado, um estudo conduzido por Schaper e colaboradores (2014) evidencia que a S1P desencadeia uma redução na produção das citocinas IL-12 e IL-23 por células dendríticas (DC) estimuladas por LPS, sendo essa modulação predominantemente mediada pelo S1PR₁. Este achado sugere que a sinalização induzida pela S1P pode gerar alterações funcionais nas DC, o que influencia na polarização da resposta imune adaptativa e, por conseguinte, afeta as respostas inflamatórias (Idzko *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a S1P, somada às citocinas TNF- α e IL-1 β , desempenha um papel

crucial na ativação do NF- κ B, um regulador central na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6, e em outros processos inflamatórios. Essa ativação só é possível pela presença de TNF- α e IL-1 β que estimulam a enzima SphK1 que, por sua vez, produz S1P e é necessária para desencadear a transcrição de moléculas como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Billich *et al.*, 2006; Kunkel *et al.*, 2013; Moon *et al.*, 2012).

Essas interações complexas destacam a multifuncionalidade da sinalização da S1P no contexto imunológico, delineando caminhos cruciais que modulam a resposta inflamatória e a regulação de citocinas. Essas descobertas contribuem para uma compreensão mais abrangente dos mecanismos envolvidos nas respostas imunes mediadas pela S1P, apresentando potenciais alvos terapêuticos para intervenções específicas em processos inflamatórios. Diante desse contexto, o objetivo deste estudo é investigar a associação dos níveis plasmáticos da S1P com a anemia e a inflamação em pacientes com DRC.

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo Geral

Determinar o impacto da anemia e da inflamação na biodisponibilidade plasmática da esfingosina-1-fosfato (S1P) em pacientes renais crônicos.

4. 2. Objetivos Específicos

- a) Mensurar os níveis plasmáticos de S1P em pacientes renais crônicos dependentes de diálise (DD).
- b) Avaliar os níveis de S1P em plasma enriquecido com RBC.
- c) Correlacionar a anemia e os níveis de S1P em pacientes DD.
- d) Mensurar os níveis de citocinas inflamatórias nos pacientes DD.
- e) Correlacionar as citocinas com os níveis de S1P na DRC.
- f) Determinar a relação dos níveis de S1P com a anemia e a inflamação em pacientes DD.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo observacional transversal foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos CEP/PUCPR, sob o número de 5.587.701 e é de cunho experimental, realizado no Laboratório de Pesquisa em Anemia e Imunologia (LabAIRe), localizado no Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) – PPGCS/PUCPR.

5. 1. População do estudo

Os pacientes em tratamento de diálise foram recrutados do Hospital Santa Casa de Misericórdia em Curitiba, Paraná. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), amostras biológicas foram coletadas pela própria equipe do hospital, no momento anterior da HD ou anterior a consulta, para os pacientes em DP.

5. 2. Critérios de inclusão e exclusão

a) Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo: pacientes maiores de 18 anos, no quinto estágio da DRC (DRC-V), no mínimo há 3 meses em HD ou em DP no centro de diálise pertencente ao Hospital Santa Casa de Curitiba, e que tenham assinado o TCLE.

b) Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo: indivíduos em tratamento com anti-inflamatórios por qualquer razão no momento da coleta, grávidas, com doença autoimune e com câncer.

5. 3. Análise dos dados laboratoriais

Os dados clínicos, demográficos e laboratoriais foram obtidos dos prontuários dos pacientes no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba.

5. 5. Ensaios

A fim de evitar desconfortos desnecessários aos pacientes, a coleta de sangue foi realizada em tubos de soro com gel separador e de EDTA para plasma, durante os procedimentos de rotina e por funcionários do hospital. Em seguida, as amostras foram transportadas até a PUCPR e utilizadas em experimentos no LabAIRe, localizado no LEM, vinculado ao PPGCS.

Posteriormente às coletas, os tubos com as amostras foram centrifugados, em 3000 rpm por 15 min a 4°C, para a separação do soro e do plasma dos demais componentes do sangue. Realizou-se também o isolamento de RBC para enriquecimento autólogo de plasma (plasma+RBC). As amostras de plasma e plasma com RBC isolados foram armazenadas em tubos *ependorf* de 1,5mL em *freezer* à -80°C, devidamente identificadas, até que ocorressem as dosagens.

As amostras de soro foram utilizadas para as dosagens das citocinas humanas IL-6, INF- γ , IL-1 β e TNF- α por meio do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), de acordo com instruções do fabricante (*Immunotools*, Alemanha).

Já as dosagens de S1P, em plasma e em plasma com eritrócitos (plasma+RBC), foram realizadas através do kit ELISA *Human S1P* da marca *FineTest* – cat. EH2564 (*Fine Biotech*, China).

Ambos os ensaios utilizaram placas de 96 poços para comportar amostras e curva, conforme as instruções do fabricante. A absorbância de cada poço foi lida pelo leitor de microplaca VersaMax, em comprimento de onda de 450nm.

5. 6. Análise estatística

Inicialmente, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk para avaliar se a distribuição das amostras é normal. Para avaliar as comparações de médias dos dados

demográficos e laboratoriais entre os dois grupos de paciente (HD e DP) foram utilizados os testes *t* de Student e Mann-Whitney e entre os pacientes agrupados (DRC-V: HD + DP) foram utilizados os testes ANOVA e *Kruskal Wallis*, conforme a normalidade.

Para todas as comparações dos níveis de S1P, entre tipos de amostras (plasma e plasma com RBC), entre cada grupo de paciente (HD x DP), foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A correlação entre os níveis de S1P com valores de Hb ou com os níveis de citocinas dos grupos de pacientes foi realizada através dos testes de correlação de Spearman, de acordo com a normalidade.

Análises de regressão linear simples foram utilizadas para definir uma relação entre as variáveis “níveis de S1P”, “valores de Hb” e “valores de citocinas” na população estudada. Foi considerado o Intervalo de Confiança (IC) de 95% em todas as análises. O programa computacional utilizado para a análise de dados, comparação de médias e desenvolvimento dos gráficos foi o Graphpad Prism (GraphPad Software LLC, EUA).

6. RESULTADOS

6. 1 Dados da população do estudo

Foram recrutados um total de 45 pacientes em estágio V da doença renal crônica (DRC-V), classificados conforme a TRS em DP (n=26) ou HD (n=19). Dentre as variáveis, apenas o ferro obteve significância estatística entre DP e HD (p=0,0482) (Tabela 1). A partir dessa análise, e considerando a falta de diferença estatística em relação às variáveis Hb (p=0,8914) e hematócrito (p=0,9376), importantes para a avaliação da anemia e mesmos valores de TFG, ambos os grupos foram agrupados em DRC-V (n=45), o que possibilitou aumentar o valor da amostra populacional. Esse terceiro grupo também está presente na Tabela 1 e foi utilizado nas análises a seguir, porém, não foi adicionado à comparação a seguir.

Tabela 1: Caracterização da população do estudo.

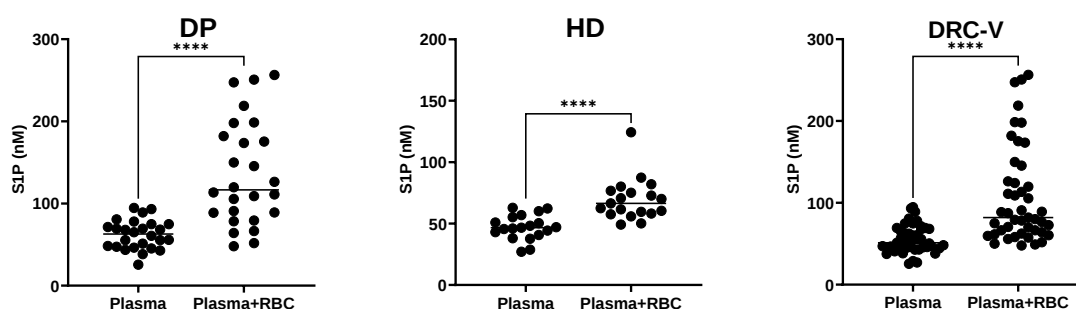
Parâmetros	DRC-V (n=45)	DP (n=26)	HD (n=19)	Valor de p
Dados Demográficos				
Idade (anos)	61,87 ± 14,54	64,46 ± 12,62	58,32 ± 16,52	0,1639
Idade Mínimo e Máximo	20 e 84	37 e 82	20 e 84	
Idoso (>60 anos) (%)	80	61	52	
Gênero Masculino (%)	78	50	63	
IMC (kg/m ²)	24,86 ± 7,7	25,19 ± 5,06	27,06 ± 6,21	0,2768
Dados Laboratoriais				
Ureia (mg/dL)	111 ± 31,21	110,8 ± 30,28	111,2 ± 33,26	0,9695
Creatina (mg/dL)	7,53 ± 3,38	7,58 ± 4,06	7,46 ± 2,24	0,4836
Albumina (g/dL)	3,67 ± 0,45	3,58 ± 0,53	3,8 ± 0,3	0,0981
Hemoglobina (g/dL)	11,08 ± 1,68	11,1 ± 1,64	11,04 ± 1,79	0,8914
Hematócrito (%)	32,3 ± 5,46	32,36 ± 4,96	32,23 ± 6,21	0,9376
Ferro (µg/dL)	87,43 ± 44,09	97,78 ± 51,57	73,27 ± 26,32	0,0482*
Ferritina (ng/mL)	263,5 ± 178,8	275,5 ± 206,8	247 ± 135,1	0,9863
PTH Mínimo e Máximo (pg/mL)	31 e 1645,3	63 e 1645,3	31 e 624	
Tempo de Diálise Mínimo e Máximo (meses)	4 e 128	4 e 128	4 e 95	
Dados Clínicos				
Anemia (%)	53	38	52	
Diabetes (%)	48	53	42	
Hipertensão Arterial (%)	91	92	89	

Dados expressos como média ± desvio-padrão e mínimo e máximo. Variáveis categóricas expressas como frequência (%). *significância estatística entre DP e HD (p<0,05).

6. 2 Dosagem de S1P na população DRC-V e correlação com níveis de Hb

A concentração de S1P plasmático foi avaliada em três grupos: DP, HD e DRC-V. As medições foram realizadas em plasma isolado e em uma combinação de plasma enriquecido com RBC (Plasma+RBC). Em todos os grupos, foi observada uma elevação estatisticamente significativa nos níveis médios de S1P quando o plasma foi enriquecido com RBC (**** $p < 0,0001$) (Figura 7). Esse padrão sugere uma maior concentração de S1P nos compartimentos celulares, evidenciando o RBC como célula essencial no armazenamento, transporte e liberação do lipídio na circulação. Nos pacientes em DP a concentração média de S1P no plasma foi de $61,98 \pm 17,63$ nM, enquanto no Plasma+RBC foi significativamente maior $136,1 \pm 63,6$ nM (**** $p < 0,0001$). Nos paciente em HD o mesmo padrão foi observado com concetração média de S1P plasmático de $46,91 \pm 10,03$ nM, enquanto no Plasma+RBC atingiram $69,46 \pm 17,05$ nM (**** $p < 0,0001$). Mesmo padrão observado quando avaliado os dados da população como um todo (DRC-V) com çconcentração média de S1P plasmático de $55,61 \pm 16,56$ nM, aumentando para $107,9 \pm 59,36$ nM no Plasma+RBC (**** $p < 0,0001$).

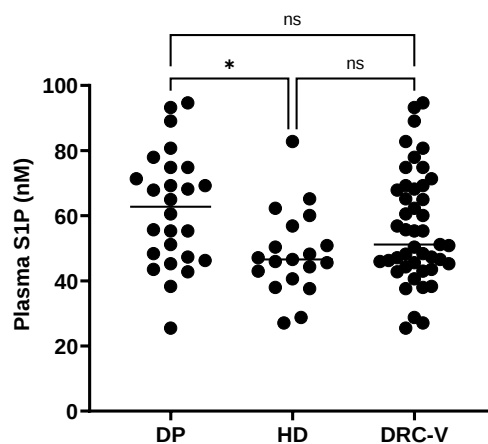
Figura 7 - Comparação da concentração plasmática e de plasma enriquecido com RBC de S1P (nM) na população estudada.



Avaliou-se a existência de diferença entre os níveis de S1P plasmático nos grupos estudados e observou-se não ter diferença estatística entre a concentração de S1P população

geral DRC-V ($56,28 \pm 17,08$ nM) não houve diferença estatística na concentração plasmática de S1P comparado as populações isoladas DP ($61,98 \pm 17,63$ nM) ou HD ($46,91 \pm 10,03$ nM) (Figura 8). Porém, observou-se que a concentração de S1P no plasma de pacientes em HD mostrou-se significativamente menor que os valores encontrados nos pacientes em DP ($p < 0.02$) (Figura 8).

Figura 08 - Comparação da concentração plasmática de S1P (nM) na população estudada.

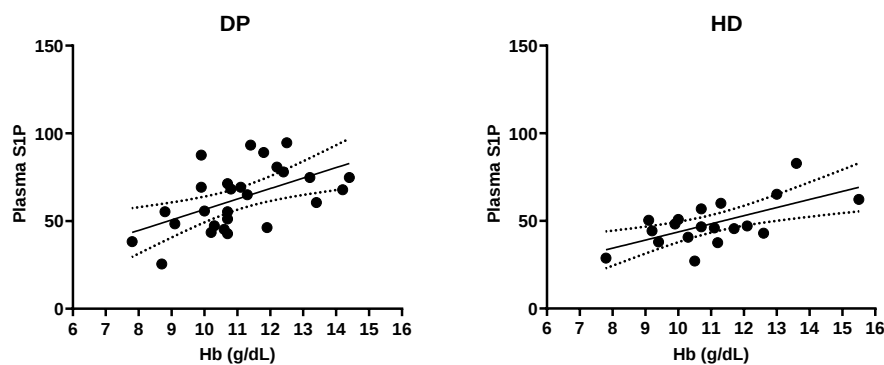


Como o enriquecimento do plasma com RBC, mesmo apresentando aumento significativo, esse aumento não se mostrou efetivo quando comparado ao descrito na literatura, que em plasma total os níveis de S1P chegam a 2000 nM. Ainda, como a amostra se mostrou pareada tanto para os parâmetros da DRC-V como para anemia dentro da população (Tabela 1). Desta forma, no presente estudo os dados obtidos das populações isoladas (DP e HD) foram utilizadas para determinar as diferenças na anemia e inflamação com os níveis de S1P plasmático.

A análise da correlação entre os níveis de Hb e a concentração de S1P em pacientes em DP e em HD, foi realizada utilizando o teste de correlação de Spearman. Os resultados indicam uma correlação positiva moderada e estatisticamente significativa entre essas variáveis tanto na população DP ($r = 0,5635$, intervalo de confiança de 95%: 0,2222 a

0,7817, $p = 0,0022$) como HD ($r = 0,4853$, intervalo de confiança de 95%: 0,02541 a 0,7757, $p = 0,0352$) (Figura 09). Esses achados sugerem que concentrações mais elevadas de S1P podem estar associadas a níveis mais altos de Hb na população estudada, mesmo com concentrações diferentes, o que pode refletir a função dos RBC como principais armazenadores e transportadores desse lipídeo na circulação.

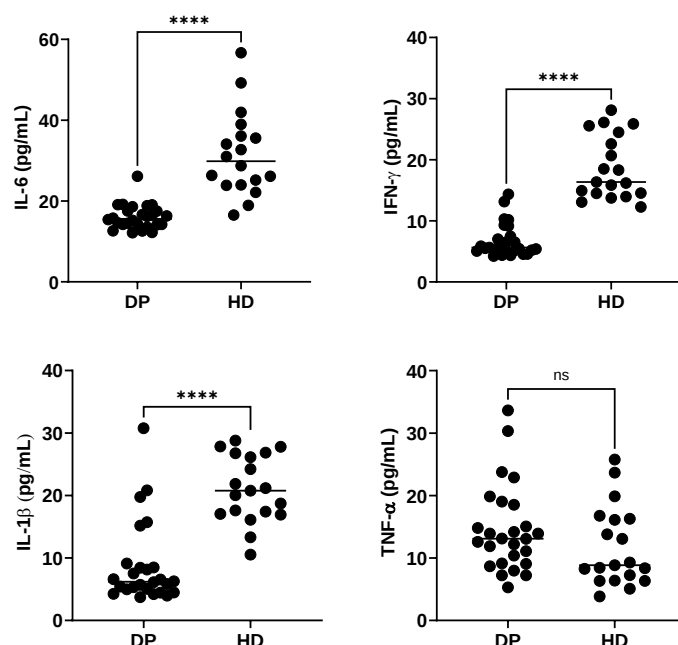
Figura 09 – Correlação entre a concentração plasmática de S1P (nM) e níveis de Hb na população estudada.



6.3 Correlação entre a concentração plasmática de S1P e os mediadores inflamatórios

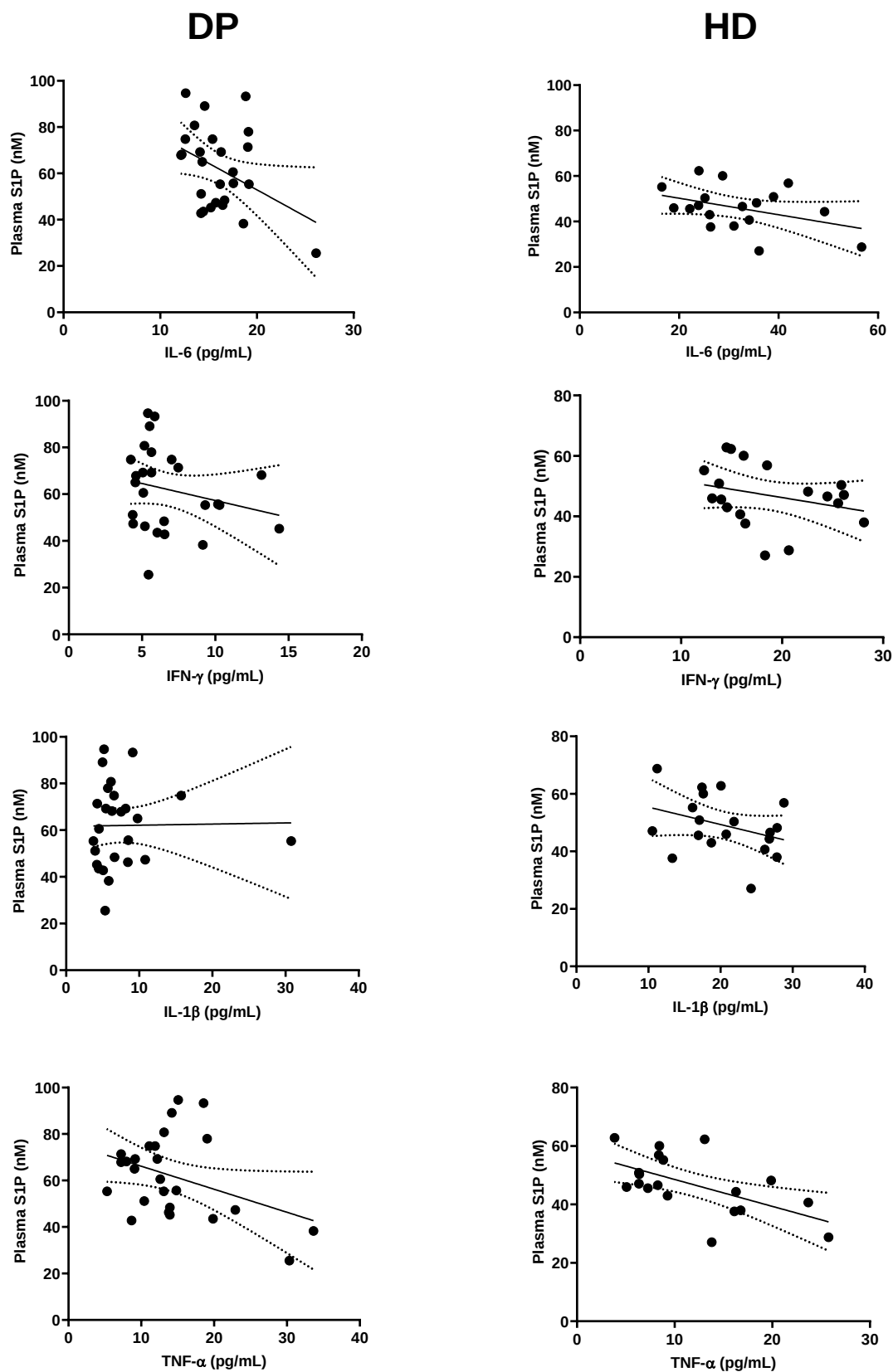
Para avaliar diferença no estado inflamatório entre as populações incluídas no estudo, foi realizada uma análise pareada pelo teste de Mann-Whitney. As médias das concentrações das citocinas na população estudada revelaram diferença significativa entre os pacientes DP e HD, com exceção de TNF- α (Figura 10). A mensuração de IL-6 resultou na concentração de $16,04 \pm 3$ pg/mL em DP e $31,5 \pm 10,4$ em HD (**** $p < 0,001$). Para IFN- γ , a média da concentração em DP foi de $6,7 \pm 2,7$ e em HD de $18,7 \pm 5,1$ (**** $p < 0,001$). E a concentração média de IL-1 β em DP foi de $8,7 \pm 6,5$ e em HD foi $21,05 \pm 5,3$ (**** $p < 0,001$). A concentração média de TNF-a foi estatisticamente igual entre os grupos, sendo para DP de $11,5 \pm 3,5$ e para HD de $14,4 \pm 5,6$ (ns = não significativo, com $p < 0,1378$) (Figura 10).

Figura 10 - Comparação da concentração sérica dos mediadores inflamatórios na população estudada.



Como S1P tem uma forte relação com a regulação da atividade imunológica, avaliou-se a correlação entre os mediadores inflamatórios (determinados pelos níveis de citocinas) com a concentração plasmática de S1P nos grupos estudados (Figura 11). Mesmo que os gráficos demonstrem uma inclinação entre maior concentração plasmática de S1P e menores níveis de citocinas séricas para ambos os grupos, na população em DP apenas a correlação entre S1P e IFN- γ foi significativa e negativa ($r=-0,4503$; $p=0,021$), sugerindo uma potencial relação inversa entre essas moléculas nesse grupo. Enquanto para HD a correlação significativa foi observada entre S1P e IL-1 β , também negativa, indicando um padrão semelhante ($r = -0,4579$; $p = 0,0487$), sugerindo que níveis mais altos de S1P no plasma podem estar associados a níveis mais baixos de IL-1 β .

Figura 11 – Correlação entre a concentração sérica dos mediadores inflamatórios com os níveis plasmáticos de S1P na população estudada.

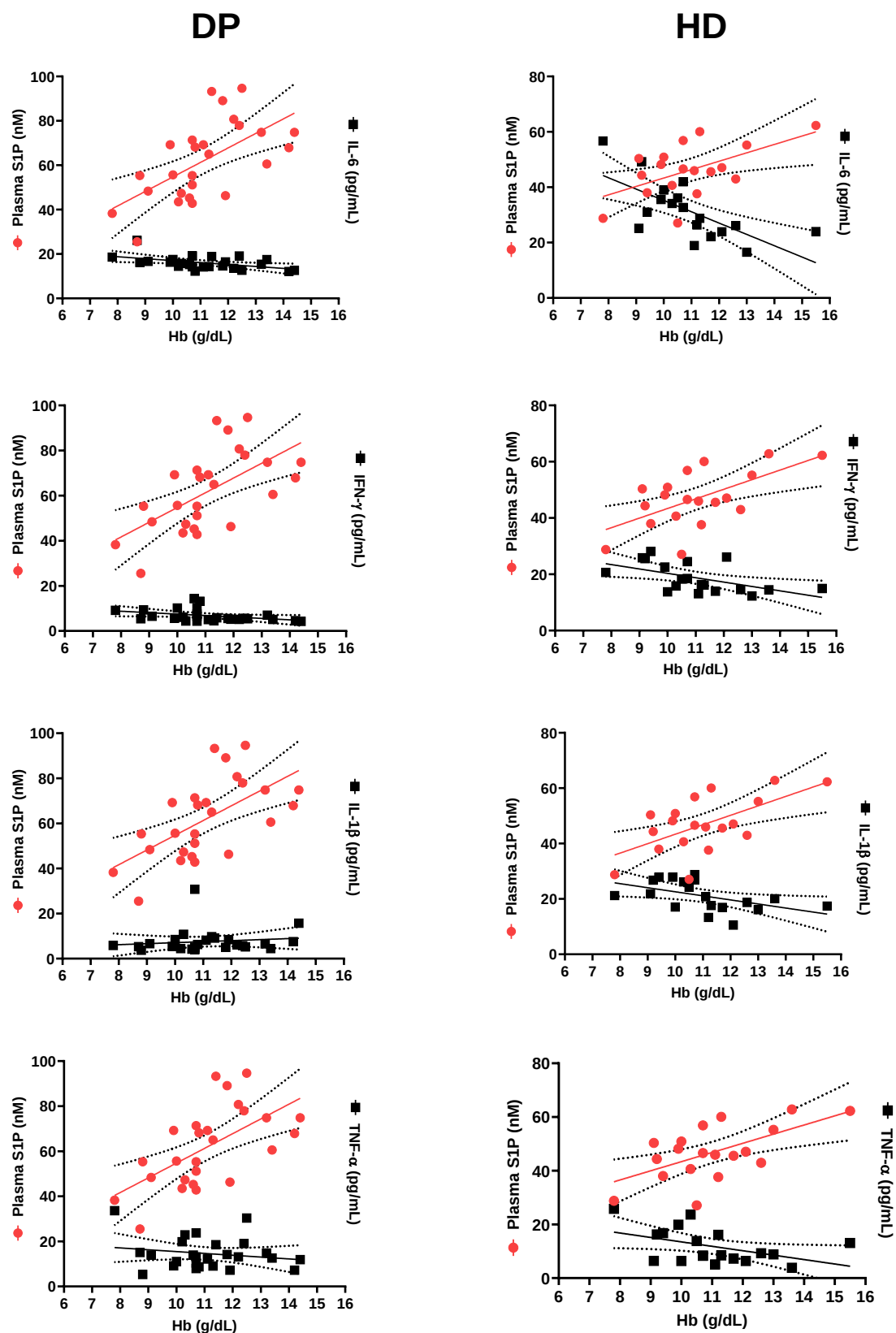


6.4 Relação entre as variáveis do estudo - concentração plasmática de S1P, níveis de Hb e mediadores inflamatórios

A análise de regressão linear simples entre os níveis de Hb e as concentrações plasmáticas de S1P ou níveis séricos de citocinas revelou padrões distintos nas populações em DP e HD (Figura 12). Na população em DP, houve uma relação positiva significativa entre Hb e S1P ($r^2=0.3702$, $p=0,001$), indicando que a anemia (Hb reduzida) pode estar associada a menores níveis de S1P, possivelmente devido ao papel dos RBC como fonte de S1P. Um aumento de 1 g/dL na Hb foi associado a um incremento de aproximadamente 6,534 nM em S1P. Para as citocinas, observou-se uma correlação negativa significativa entre Hb e IL-6 ($r^2=0,227$, $p=0,0139$), sugerindo que níveis reduzidos de Hb podem refletir um estado inflamatório mais intenso, com redução estimada de 0,8763 pg/mL em IL-6 por cada aumento de 1 g/dL na Hb. Não foram observadas associações significativas entre Hb e IFN- γ ($r^2=0,148$, $p=0,0522$), IL-1 β ($r^2=0,0183$, $p=0,5089$) ou TNF- α ($r^2=0,0365$, $p=0,3493$).

Na população em HD, também houve uma correlação positiva entre Hb e S1P ($r^2=0,3056$, $p=0,0174$), indicando uma relação consistente. Para as citocinas, identificou-se uma tendência geral de correlação negativa, com associação mais forte entre Hb e IL-6 ($r^2=0,464$, $p=0,0019$), sugerindo que níveis mais altos de Hb estão ligados a menor inflamação sistêmica. Não foram observadas associações significativas entre Hb e as demais citocinas (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) (Figura 12).

Figura 12 – Regressão linear simples entre as variáveis Hb (g/dL), S1P (nM) e citocinas (pg/mL).



7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam uma diminuição na biodisponibilidade plasmática do lipídio bioativo S1P em pacientes renais crônicos, especialmente aqueles em hemodiálise. Essa diminuição na concentração de S1P nessa população específica foi correlacionada com a anemia e a inflamação.

Esta pesquisa foi motivada por várias vertentes de evidências. Primeiro, a anemia na DRC está associada a maior mortalidade, hospitalização e progressão da doença, além de prejudicar a qualidade de vida dos pacientes com sintomas como fadiga, depressão, intolerância ao exercício e comprometimento cognitivo, além de aumentar o risco de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Gluba-Brzózka *et al.*, 2020, Johansen *et al.*, 2012, Matsushita *et al.*, 2022, Pépin *et al.*, 2023).

Segundo, na DRC avançada, a vida útil dos RBC é reduzida, contribuindo para a anemia (Sato *et al.*, 2012), principalmente devido à eriptose, desencadeada pela uremia (Tozoni *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2021) e pela inflamação (Pretorius, 2018). Esse processo, mediado por aumento de Ca^{2+} intracelular, leva à fagocitose dos RBC por macrófagos (Bonomini *et al.*, 2001) e monócitos inflamatórios (Bonan *et al.*, 2016).

Terceiro, os RBC são uma das principais fontes de S1P no sangue, uma vez que possuem altas concentrações de esfingosina quinase 1 (SphK1), a enzima responsável pela síntese de S1P (Hänel *et al.*, 2007, Ito *et al.*, 2007). A redução no número de RBC, como em condições de anemia, pode levar a uma diminuição dos níveis circulantes de S1P.

Por último, S1P é crucial para a manutenção da barreira endotelial e da integridade vascular (Qiu *et al.*, 2022). O desequilíbrio de S1P pode exacerbar a inflamação crônica, característica da DRC, alterando a sinalização dos receptores de S1P (S1PR1-S1PR5) (Nagahashi *et al.*, 2018, Sun *et al.*, 2024). Ainda, níveis reduzidos de S1P podem levar a uma resposta imune desbalanceada, com efeitos negativos tanto na imunossupressão quanto

no aumento de reações autoimunes (Li, *et al.*, 2023, Sun *et al.*, 2024).

Os resultados do estudo reforçam a função dos RBC no armazenamento e transporte de S1P, uma vez que plasma de pacientes renais crônicos mostraram níveis baixos de S1P quando comparado com o descrito na literatura para a população saudável. A dosagem de S1P em plasma de pacientes em DP foi de $61,98 \pm 17,63\text{nM}$, enquanto pacientes em HD tiveram média de S1P significativamente menores ($46,91 \pm 10,03\text{nM}$) em relação a DP. Poppe e colaboradores (2019) observaram que as concentrações de S1P foram superiores em produtos sanguíneos, como RBC e plaquetas, em relação ao plasma. Quando o plasma dos pacientes foi enriquecido com RBC, observamos aumento dos níveis de S1P, mas ainda muito abaixo do que o relatado por outras pesquisas. Foi reportado que a concentração média de S1P no plasma na população saudável varia entre 100 e 300nM (Knapp *et al.*, 2013) podendo chegar a 2000nM no sangue total contendo RBC e plaquetas (Nagahashi *et al.*, 2016). Esses achados corroboraram com a capacidade dos RBC de armazenar e influenciar os níveis plasmáticos desse esfingolípido nos seres humanos (Bode *et al.*, 2010; Hanel *et al.*, 2007; Venkataraman *et al.*, 2008).

Observou-se também que a concentração de S1P foi maior em pacientes em DP comparado ao observado no plasma de pacientes em HD. Winkler e colaboradores (2021) sugeriram que a presença de níveis elevados de S1P, em indivíduos infectados pelo vírus SARS-CoV-2 ao comparar com indivíduos saudáveis, pode ser devido a um mecanismo adaptativo para a manutenção do tecido vascular e da imunidade, além da prevenção da hipóxia tecidual.

Embora a função desempenhada por S1P na DRC ser escassa na literatura, foi demonstrado que, em situação de hipóxia renal e a partir da indução de SphK1, S1P é capaz de reprogramar o metabolismo da glicólise dentro dos RBC, o que possibilita uma melhoria no carreamento do oxigênio (D'Alessandro; Xia 2020; Xie *et al.*, 2020). Ainda, é preciso

reforçar o fato de que a DP está associada à melhoria nos resultados clínicos em pacientes acometidos pela disfunção renal, ao cooperar com a homeostase dos tecidos peritoneais e renais, e à baixa mortalidade, ao comparar com os pacientes designados à HD (Caprara *et al.*, 2021; Fenton *et al.*, 1997).

Valores baixos de Hb (<11 g/dL) indicam anemia e são comumente considerados fatores de risco para a incidência da DRC-V (Yi *et al.*, 2019). No presente estudo, a correlação entre os níveis de S1P com os de Hb em pacientes renais crônicos revelou que valores baixos de Hb são correlacionados positivamente com valores baixos de S1P em ambos os grupos avaliados (DP ou HD). A partir disso, pode-se sugerir que a anemia nesses pacientes pode explicar em parte a redução dos níveis de S1P. A redução de Hb e de S1P também foi encontrada em pacientes com malária cerebral ao comparar com um grupo controle, sugerindo a desregulação da via de sinalização de S1P nessa doença e o surgimento de um possível alvo terapêutico (Finney *et al.*, 2011).

Ademais, altos níveis de S1P são considerados essenciais para neutralizar os efeitos da hipertensão grave (Xie *et al.*, 2020), fator presente na DRC como uma das principais causas primárias e principal comorbidade presente nessa população (HD: 89% e DP: 92%) (Wong *et al.*, 2020). Já a comparação de níveis de S1P plasmáticos entre diabetes (HD: 42% e DP: 53%) e indivíduos controle é imprecisa: estudos apontam tanto altos quanto baixos níveis (Lopes-Virella *et al.*, 2024; Randriamboavonjy *et al.*, 2009).

Segundo Greiwe e colaboradores (2021) o uso de heparina em pacientes com DRC pode promover a inflamação e reduzir a concentração de S1P (Law *et al.*, 2020). A redução do lipídio é, ainda, associada à longa permanência em UTI, à piora no estado clínico, à sepse, ao choque séptico, a lesões renais e ao prognóstico na doença hepática em seu estágio final (Becker *et al.*, 2017; Bekpinar *et al.*, 2015; Greiwe *et al.*, 2021; Winkler *et al.*, 2015).

No contexto da DRC, no entanto, a literatura apresenta escassez na relação entre

marcadores inflamatórios e níveis de S1P, embora o lipídio seja apontado como um mediador bioativo em doenças causadas por inflamação crônica (Terlizzi *et al.*, 2022). O presente estudo também buscou avaliar essa relação utilizando a mensuração das citocinas IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α . Resultados divergentes foram encontrados, enquanto a população em DP mostrou correlação entre S1P e IFN- γ de forma significativa, sugerindo uma potencial relação inversa entre essas moléculas nesse grupo, amostras de pacientes em HD mostraram correlação significativa entre S1P e IL-1 β , sugerindo que níveis mais altos de S1P no plasma podem estar associados a níveis mais baixos de IL-1 β . Esses dados sugerem que o S1P pode estar relacionado à regulação de algumas citocinas inflamatórias, com potenciais diferenças entre os tipos de diálise. É sabido que a carga inflamatória de pacientes em HD é maior que pacientes em DP (Sahib *et al.*, 2024), resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Entretanto, estudos futuros devem explorar os mecanismos subjacentes a essas associações e seu impacto clínico. Na asma, foi demonstrado que o aumento nos níveis das citocinas IL-13, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-1 β funciona como regulador “*upstream*” da S1P (Bahlas *et al.*, 2020).

De maneira geral, a S1P parece exercer tanto funções inflamatórias como anti-inflamatórias. Neste último caso, ao reduzir os níveis de IL-6, IL-12 e CCL2 (Hughes *et al.*, 2008). Todavia, curiosamente, Terlizzi e colaboradores (2022) sugeriram a capacidade desse lipídio em induzir e em aumentar a produção de IL-6 em casos específicos, possuindo também uma função pró-inflamatória. O aumento de IL-6 e de IFN- γ pode silenciar o gene do receptor S1P₂ em camundongos, o que diminui a capacidade de ligação de S1P com esse receptor específico e induz maiores danos endoteliais no intestino (Chen *et al.*, 2018). Já a redução na expressão de IFN- γ por DC deficientes das enzimas SphK1-2, sintetizadoras de S1P, interfere de forma significativa em uma resposta inflamatória precoce (Thuy *et al.*, 2020).

Na DRC, a IL-6 é comumente associada ao declínio na TFG estimada, à predição de eventos cardiovasculares adversos importantes, alterações no endotélio e anormalidades patológicas do mesângio (Amdur *et al.*, 2016; Batra *et al.*, 2021; Lu; Zhou, 2008; Wassmann *et al.*, 2004). Em indivíduos hipertensos, a ativação das DC contribui para a produção de IL-6 e a IL-1 β , com o intuito de promover a proliferação e recrutamento de linfócitos T de órgãos linfoides secundários para os rins (Kirabo *et al.*, 2014). Os presentes resultados reforçam a importância da IL-6 na população renal crônica, evidenciando uma associação robusta entre Hb e IL-6 em ambas as populações DP e HD, sugerindo que IL-6 pode ser um biomarcador sensível para inflamação relacionada à Hb, enquanto outras citocinas parecem ser reguladas por mecanismos distintos.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho reafirmou a capacidade dos eritrócitos de armazenar e influenciar os níveis plasmáticos de S1P, demonstrando concentrações elevadas em amostras enriquecidas de RBC em comparação com aquelas sem eritrócitos. Esse achado destaca a relevância dos eritrócitos como reservatórios de S1P no contexto da DRC.

Um ponto forte do estudo foi a identificação de uma possível função adaptativa da S1P nos pacientes com DRC. Sua concentração pode estar relacionada à manutenção da integridade vascular e imunológica em um ambiente de inflamação persistente e alterações metabólicas. Além disso, a menor concentração de S1P em pacientes submetidos à HD, quando comparados à DP, sugere diferenças significativas entre as modalidades de TRS, com impacto potencial na inflamação que compromete a qualidade de vida e nos desfechos clínicos.

Outro avanço foi a demonstração da interação entre os níveis de S1P e Hb, já observada em outras condições. Essa associação reforça o papel crítico dos eritrócitos na liberação e armazenamento do lipídio. O estudo também explorou a relação entre S1P e marcadores inflamatórios (IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α), mostrando papel crucial da IL-6 nesse contexto.

Portanto, tanto a anemia como a inflamação parecem impactar negativamente a biodisponibilidade de S1P plasmático, sugerindo possíveis estratégias terapêuticas como os análogos de S1P, bem intervenções para regular a atividade de enzimas como esfingosina quinase (SphK) ou esfingosina-1-fosfatase (SPP) podem ajudar a restaurar os níveis de S1P com intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DRC.

9. LIMITAÇÕES

O estudo não explorou a fundo o impacto funcional da S1P no contexto clínico, limitando a interpretação de seu papel adaptativo.

A análise comparativa entre as TRS poderia ser ampliada para incluir fatores clínicos e laboratoriais adicionais, fortalecendo as conclusões sobre diferenças nos desfechos dos pacientes.

Esses resultados fornecem novas perspectivas sobre o papel da S1P na DRC, mas destacam a necessidade de estudos futuros para validar os achados e aprofundar o entendimento das interações entre S1P e inflamação.

O número pequeno de participantes no estudo pode ter influenciado em resultados negativos, principalmente relacionados aos mediadores inflamatórios.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa consolidou a relevância da S1P como um mediador bioquímico importante na fisiopatologia da DRC. Demonstrou-se que os eritrócitos são fontes significativas de S1P e que suas alterações, comuns na DRC, impactam diretamente os níveis plasmáticos desse lipídio.

Sugere-se que a alta concentração de S1P nos pacientes com DRC propicie um mecanismo adaptativo em resposta ao ambiente inflamatório crônico e alterações metabólicas, promovendo a manutenção vascular e imunológica. Além disso, a interação entre S1P e marcadores inflamatórios, especialmente IL-6, reforça seu potencial anti-inflamatório, enquanto as diferenças nos níveis de S1P entre modalidades de TRS, como hemodiálise e diálise peritoneal, abrem novas perspectivas para a avaliação de desfechos clínicos e qualidade de vida.

Por fim, a correlação entre S1P e hemoglobina destaca o papel dos eritrócitos na liberação desse lipídio e sugere implicações para o manejo da anemia na DRC.

REFERÊNCIAS

- ABED, M. et al. Suicidal erythrocyte death in end-stage renal disease. **Journal of molecular medicine**, v. 92, p. 871-879, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1151-4>
- ADADA, M. M. et al. Intracellular sphingosine kinase 2-derived sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced ezrin-radixin-moesin phosphorylation and cancer cell invasion. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 11, p. 4654–4669, 24 jul. 2015. doi: 10.1096/fj.15-274340
- ALLEN, D. A. et al. Inhibition of CFU-E colony formation in uremic patients with inflammatory disease: role of IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 47, n. 5, p. 204–211, 1 maio 1999.
- ALVAREZ, S. E. et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. 1084–1088, jun. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09128>
- AMDUR, R. L. et al. Inflammation and progression of CKD: the CRIC study. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 9, p. 1546-1556, 2016. DOI: 10.2215/CJN.13121215.
- AN, S; ZHENG, Y.; BLEU, T.. Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 1, p. 288-296, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.288>.
- ARGRAVES, K. M.; ARGRAVES, W. S. HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 11, p. 2325-2333, 2007. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700011-JLR200>
- BAHLAS, S. et al. Decoding the role of sphingosine-1-phosphate in asthma and other respiratory system diseases using next generation knowledge discovery platforms coupled with luminex multiple analyte profiling technology. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 444, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00444>
- BARANOWSKI M., CHARMAS M., DŁUGOŁĘCKA B., GÓRSKI J. 2011. Exercise increases plasma levels of sphingoid base-1 phosphates in humans. *Acta Physiol. (Oxf.)*. 203: 373–380. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2011.02322.x
- BARANOWSKI M., GÓRSKI J., KLAPCINSKA B., WASKIEWICZ Z., SADOWSKA-KREPA E. 2014. Ultramarathon run markedly reduces plasma sphingosine-1-phosphate concentration. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 24: 148–156. DOI: <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2013-0093>
- BATRA, G. et al. Interleukin 6 and cardiovascular outcomes in patients with chronic kidney disease and chronic coronary syndrome. **JAMA cardiology**, v. 6, n. 12, p. 1440-1445, 2021. doi:10.1001/jamacardio.2021.3079.
- BAUER, A. C. et al. Chronic Kidney Disease in Brazil: Current Status and Recommended Improvements. **Kidney Diseases**, v. 10, n. 3, p. 213-223, 2024. <https://doi.org/10.1159/000538068>
- BECKER, S. et al. Low sphingosine-1-phosphate plasma levels are predictive for increased mortality in patients with liver cirrhosis. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174424, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174424>
- BEKPINAR, Seldağ et al. The effect of nephropathy on plasma sphingosine 1-phosphate concentrations in patients with type 2 diabetes. **Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 18, p. 1264-1267, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.08.001>
- BISSINGER, R. et al. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. **The FEBS journal**, v. 286, n. 5, p. 826-854, 2019. <https://doi.org/10.1111/febs.14606>

BISSINGER, R et al. Proteinuric chronic kidney disease is associated with altered red blood cell lifespan, deformability and metabolism. **Kidney international**, v. 100, n. 6, p. 1227-1239, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2021.08.024>

BILLICH, A. et al. Basal and induced sphingosine kinase 1 activity in A549 carcinoma cells: function in cell survival and IL-1 β and TNF- α induced production of inflammatory mediators. **Cellular signalling**, v. 17, n. 10, p. 1203-1217, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.12.005>

BLAHO, V. A.; HLA, T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. **Journal of lipid research**, v. 55, n. 8, p. 1596-1608, 2014. DOI: 10.1194/jlr.R046300

BODE, C. et al. Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. **Journal of cellular biochemistry**, v. 109, n. 6, p. 1232-1243, 2010. <https://doi.org/10.1002/jcb.22507>

BONAN, N. B. et al. Uremic toxicity-induced eryptosis and monocyte modulation: the erythrophagocytosis as a novel pathway to renal anemia. **Blood purification**, v. 41, n. 4, p. 317-323, 2016. doi: 10.1159/000443784.

CACHOFEIRO, V. et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease: New strategies to prevent cardiovascular risk in chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 74, p. S4-S9, 2008. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.516>.

CAPRARA, C. et al. Differential effects of peritoneal and hemodialysis on circulating regulatory T cells one month post initiation of renal replacement therapy. **Clinical Nephrology**, v. 95, n. 1, p. 37, 2021. doi: 10.5414/CN110158

CHEN, T. et al. The Sphingosine-1-Phosphate/Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 Axis in Intestinal Epithelial Cells Regulates Intestinal Barrier Function During Intestinal Epithelial Cells-CD4⁺ T-Cell Interactions. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 1188-1200, 2018. <https://doi.org/10.1159/000491985>

CHEN, X. J. et al. DNA methylation sustains “inflamed” memory of peripheral immune cells aggravating kidney inflammatory response in chronic kidney disease. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 637480, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.637480>

CHUN, J.; GIOVANNONI, G.; HUNTER, S. F. Sphingosine 1-phosphate receptor modulator therapy for multiple sclerosis: differential downstream receptor signalling and clinical profile effects. **Drugs**, v. 81, n. 2, p. 207-231, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01431-8>

CUVILLIER, O. et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. **Nature**, v. 381, n. 6585, p. 800-803, 1996. <https://doi.org/10.1038/381800a0>

D’ALESSANDRO, A.; XIA, Y.. Erythrocyte adaptive metabolic reprogramming under physiological and pathological hypoxia. **Current opinion in hematology**, v. 27, n. 3, p. 155-162, 2020. doi: 10.1097/MOH.0000000000000574

DE PALMA, C. et al. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor α through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 1, p. 99-105, 2006. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000194074.59584.42>

DE SANTIS, G. C.. Anemia: definição, epidemiologia, fisiopatologia, classificação e tratamento. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 52, n. 3, p. 239-251, 2019. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v52i3p239-251>.

DIAB, K. J. et al. Stimulation of sphingosine 1-phosphate signaling as an alveolar cell survival strategy in emphysema. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 181, n. 4, p. 344-352, 2010. doi: 10.1164/rccm.200906-0826OC

DIAS, G. F. et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, stimulates reactive oxygen species production and erythrocyte cell death supposedly by an organic anion transporter 2 (OAT2) and NADPH oxidase activity-dependent pathways. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 280, 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10070280>

DIAS, G. F. et al. The role of eryptosis in the pathogenesis of renal anemia: insights from basic research and mathematical modeling. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 598148, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598148>

DING, G. et al. Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27493-27502, 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701641200>

DORSAM, G. et al. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3500-3507, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3500>

ESKAN, M. A. et al. TLR4 and S1P receptors cooperate to enhance inflammatory cytokine production in human gingival epithelial cells. **European journal of immunology**, v. 38, n. 4, p. 1138-1147, 2008. doi: 10.1002/eji.200737898

EVANS, M. et al. Contemporary management of anaemia, erythropoietin resistance and cardiovascular risk in patients with advanced chronic kidney disease: a nationwide analysis. **Clinical kidney journal**, v. 13, n. 5, p. 821-827, 2020. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfaa054>

EYSTER, K. M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. **Advances in physiology education**, v. 31, n. 1, p. 5-16, 2007. <https://doi.org/10.1152/advan.00088.2006>

FENTON, S. S. A. et al. Hemodialysis versus peritoneal dialysis: a comparison of adjusted mortality rates. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 30, n. 3, p. 334-342, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0272-6386\(97\)90276-6](https://doi.org/10.1016/S0272-6386(97)90276-6)

FEROZE, U. et al. Insights Into Nutritional and Inflammatory Aspects of Low Parathyroid Hormone in Dialysis Patients. **Journal of Renal Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 100-104, jan. 2011. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2010.10.006>

FINNEY, C. A. M. et al. S1P is associated with protection in human and experimental cerebral malaria. **Molecular medicine**, v. 17, p. 717-725, 2011. DOI:10.2119/molmed.2010.00214

FRENCH, K. J. et al. Antitumor Activity of Sphingosine Kinase Inhibitors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, n. 2, p. 596-603, 1 ago. 2006. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101345>

FUKUHARA, S. et al. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1416-1426, 2012. <https://doi.org/10.1172/JCI60746>

GANSEVOORT, R. T. et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. **The Lancet**, v. 382, n. 9889, p. 339-352, 2013. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60595-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60595-4)

GHADERI, S.; LEVKAU, B. A. erythrocyte-centric view on the MFSD2B sphingosine-1-phosphate transporter. **Pharmacology & Therapeutics**, p. 108483, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108483>

GOICOECHEA, M. et al. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 54, n. 4, p. 1337-1343, out. 1998. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00084.x

GOUVÊA, E. C. D. P. et al. Mortality trend due to chronic kidney disease in Brazil: an ecological study. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 32, n. 3, p. e2023313, 2023. <https://doi.org/10.1590/S2237-96222023000300010.EN>

GRÄLER, M. H. Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 79-86, 2010. <https://doi.org/10.1159/000315108>

GREIWE, G. et al. Dynamics of vascular protective and immune supportive sphingosine-1-phosphate during cardiac surgery. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 761475, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761475>

HALLAN, S. I. et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. **Journal of the American society of nephrology**, v. 17, n. 8, p. 2275-2284, 2006. DOI: 10.1681/ASN.2005121273

HAMMAD S. M., PIERCE J. S., SOODAVAR F., SMITH K. J., AL GADBAN M. M., REMBIESA B., KLEIN R. L., HANNUN Y. A., BIELAWSKI J., BIELAWSKA A. 2010. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J. Lipid Res.* 51: 3074–3087. DOI: 10.1194/jlr.D008532

HÄNEL, P.; ANDRÉANI, P.; GRÄLER, M. H. Erythrocytes store and release sphingosine 1-phosphate in blood. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 4, p. 1202-1209, 2007. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7433com>

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 139–150, fev. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrm2329>

HANNUN, Y. A.; OBEID, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 175-191, 2018. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>

HARVALD, Eva Bang; OLSEN, Anne Sofie Braun; FÆRGEMAN, Nils J. Autophagy in the light of sphingolipid metabolism. **Apoptosis**, v. 20, p. 658-670, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1108-2>

HORVÁTH, P. et al. The link between the sphingolipid rheostat and obstructive sleep apnea. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 7675, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34717-4>

HUGHES, J. E. et al. Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. **Circulation research**, v. 102, n. 8, p. 950-958, 2008. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.170779>

IDZKO, M. et al. Sphingosine 1-phosphate induces chemotaxis of immature and modulates cytokine-release in mature human dendritic cells for emergence of Th2 immune responses. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 6, p. 625–627, 1 abr. 2002. DOI: 10.1096/fj.01-0625fje

ITO K., ANADA Y., TANI M., IKEDA M., SANO T., KIHARA A., IGARASHI Y. 2007. Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357: 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.123>

JO, S. K. et al. Divergent roles of sphingosine kinases in kidney ischemia–reperfusion injury. **Kidney international**, v. 75, n. 2, p. 167-175, 2009. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.400>

KARLINER, J. S. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart: a decade of progress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 1, p. 203-212, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.06.006>

KDIGO Kidney Disease: Improving Global Outcomes Anemia in CKD. **Kidney International**, v. 2 n. 4, p 1-64, 2012. Disponível em: <https://kdigo.org/guidelines/anemia-in-ckd/>.

KDIGO. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD Work Group - clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney International**, v 105, n 45, 2024. Disponível em: <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/>

KIM, R. H. et al. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-**

Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1791, n. 7, p. 692-696, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.011>

KIMMEL, P. L. et al. Immunologic function and survival in hemodialysis patients. **Kidney International**, v. 54, n. 1, p. 236–244, jul. 1998. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00981.x

KIMURA, T. et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. **Biochemical Journal**, v. 348, n. 1, p. 71-76, 2000. <https://doi.org/10.1042/bj3480071>

KIRABO, A. et al. DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 10, p. 4642-4656, 2014. doi: 10.1172/JCI74084

KNAPP, M. et al. Plasma sphingosine-1-phosphate concentration is reduced in patients with myocardial infarction. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 9, p. 493, 2009. Disponível em: <https://medscimonit.com/abstract/index/idArt/878180>

KNAPP, M. et al. Sustained decrease in plasma sphingosine-1-phosphate concentration and its accumulation in blood cells in acute myocardial infarction. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 106, p. 53-61, 2013. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2013.10.001

LANG, E.; LANG, F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.01.009>

LANG, E. et al. Storage of erythrocytes induces suicidal erythrocyte death. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 668-676, 2016. <https://doi.org/10.1159/000445657>

LANG, F. et al. Eryptosis-the neglected cause of anemia in end stage renal disease. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 42, n. 4, p. 749-760, 2017. <https://doi.org/10.1159/000484215>

LAVIEU, G. et al. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8518-8527, 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506182200>

LAI, W. Q. et al. Distinct roles of sphingosine kinase 1 and 2 in murine collagen-induced arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 3, p. 2097-2103, 2009. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804376>

LAW, J. P. et al. Anticoagulant strategies for the patient with chronic kidney disease. **Clinical Medicine**, v. 20, n. 2, p. 151, 2020. <https://doi.org/10.7861/clinmed.2019-0445>

LE, T. N. U. et al. Mfsd2b and Spns2 are essential for maintenance of blood vessels during development and in anaphylactic shock. **Cell Reports**, v. 40, n. 7, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111208>

LEVEY, A. S.; CORESH, J.. Chronic kidney disease. **The lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165-180, 2012. DOI:10.1016/S0140-6736(11)60178-5

LEVKAU, B.. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 164686, 2015. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00243>

LOPES-VIRELLA, M. F. et al. Circulating Lipoprotein Sphingolipids in Chronic Kidney Disease with and without Diabetes. **Biomedicines**, v. 12, n. 1, p. 190, 2024. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12010190>

LU, H.; ZHOU, J.. HBV X gene transfection upregulates IL-1 β and IL-6 gene expression and induces rat glomerular mesangial cell proliferation. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 28, n. 3, p. 247-250, 2008. doi: 10.1007/s11596-008-0304-5

MANDALA, S. M. et al. Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1- phosphate and induces cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 97, n. 14, p. 7859–7864, 20 jun. 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.120146897>

MACEYKA, M. et al. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1585, n. 2-3, p. 193–201, dez. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00341-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00341-4)

MACEYKA, M. et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 37118–37129, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502207200>

MACK, M. Inflammation and fibrosis. **Matrix Biology**, v. 68-69, p. 106–121, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.11.010>

MALYSZKO, J.; MYSLIWIEC, M. Hepcidin in Anemia and Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 30, n. 1, p. 15–30, 2007. DOI: 10.1016/bs.vh.2019.01.012.

MCCLELLAN, W. et al. The prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease. **Current medical research and opinion**, v. 20, n. 9, p. 1501–1510, 2004. <https://doi.org/10.1185/030079904X2763>

NEMETH, E. et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271–1276, 1 maio 2004. <https://doi.org/10.1172/JCI20945>.

MENDOZA, A. et al. The Transporter Spns2 Is Required for Secretion of Lymph but Not Plasma Sphingosine-1-Phosphate. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1104–1110, 1 nov. 2012. doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.021

MIMS, M. P.; MILLER-CHISM, C.; SOSA, I. R. **Handbook of benign hematology**. New York: Demos Medical Publishing, 2020. p. 137.

MOON, M. H. et al. Sphingosine-1-phosphate inhibits interleukin-1 β -induced inflammation in human articular chondrocytes. **International journal of molecular medicine**, v. 30, n. 6, p. 1451–1458, 2012. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1135>

NAGAHASHI, M. et al. Sphingosine-1-Phosphate Transporters as Targets for Cancer Therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. e651727, 15 jul. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/651727>

NAGAHASHI, M. et al. Sphingosine-1-phosphate in the lymphatic fluid determined by novel methods. **Heliyon**, v. 2, n. 12, 2016. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00219

NEUBAUER, H. A.; PITSON, S. M. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. **FEBS Journal**, v. 280, n. 21, p. 5317–5336, 1 nov. 2013. <https://doi.org/10.1111/febs.12314>

NGUYEN, T. Q. et al. Erythrocytes efficiently utilize exogenous sphingosines for S1P synthesis and export via Mfsd2b. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2021. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012941>

OHKAWA R., NAKAMURA K., OKUBO S., HOSOGAYA S., OZAKI Y., TOZUKA M., OSIMA N., YOKOTA H., IKEDA H., YATOMI Y. 2008. Plasma sphingosine-1-phosphate measurement in healthy subjects: close correlation with red blood cell parameters. *Ann. Clin. Biochem.* 45: 356–363. DOI: 10.1258/acb.2007.007189

ORSINI, M. et al. Sphingolipid-mediated inflammatory signaling leading to autophagy inhibition converts erythropoiesis to myelopoiesis in human hematopoietic stem/progenitor cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 9, p. 1796–1812, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0245-x>

- OLIVERA, A. et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. **The Journal of cell biology**, v. 147, n. 3, p. 545-558, 1999. doi: 10.1083/jcb.147.3.545
- OKAMOTO, Y. et al. Sphingosine-1-phosphate-specific G protein-coupled receptors as novel therapeutic targets for atherosclerosis. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 1, p. 117-137, 2011. doi:10.3390/ph4010117
- OSAWA, Y. et al. Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27879-27887, 2005. doi: 10.1074/jbc.M503002200
- PAPPU, R. et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. **Science**, v. 316, n. 5822, p. 295-298, 2007. DOI: 10.1126/science.1139221
- PARK, S.W. et al. Inhibition of sphingosine 1-phosphate receptor 2 protects against renal ischemia-reperfusion injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 2, p. 266-280, 2012. DOI: 10.1681/ASN.2011050503
- PHAM, T. H. M. et al. Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 1, p. 17-27, 2010. doi: 10.1084/jem.20091619
- PIAGNERELLI, M. et al. Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques. **Journal of clinical pathology**, v. 60, n. 5, p. 549-554, 2007. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.037523>
- PITSON, S. M. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 20, p. 5491-5500, 15 out. 2003. doi: 10.1093/emboj/cdg540.
- PORTOLÉS, J. et al. Anemia in chronic kidney disease: from pathophysiology and current treatments, to future agents. **Frontiers in Medicine**, v. 8, p. 642296, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.642296>
- PRETORIUS, E. Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 69, n. 4, p. 545-550, 2018. doi: 10.3233/CH-189205.
- QADRI, S. M. et al. Sphingosine but not sphingosine-1-phosphate stimulates suicidal erythrocyte death. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 339-346, 2011. <https://doi.org/10.1159/000331750>.
- QUEISSER, N.; SCHUPP, N. Aldosterone, oxidative stress, and NF- κ B activation in hypertension-related cardiovascular and renal diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 2, p. 314-327, jul. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.011>
- RANDRIAMBOAVONJY, V. et al. The S1P 2 receptor expressed in human platelets is linked to the RhoA-Rho kinase pathway and is down regulated in type 2 diabetes. **Basic research in cardiology**, v. 104, p. 333-340, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0769-1>
- REN, Kun et al. ApoA-I/SR-BI modulates S1P/S1PR2-mediated inflammation through the PI3K/Akt signaling pathway in HUVECs. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 73, p. 287-296, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0553-5>
- ROSEN, H.; GOETZL, E. J. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 7, p. 560-570, 2005. <https://doi.org/10.1038/nri1650>
- ROVIEZZO, F. et al. Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1-phosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 30, p. 11170-11175, 2004. doi: 10.1073/pnas.0401439101
- RUBIN, H. R. et al. Patient ratings of dialysis care with peritoneal dialysis vs hemodialysis. **Jama**, v. 291, n. 6, p. 697-703, 2004. doi:10.1001/jama.291.6.697

- RUIZ, M. et al. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein M limits endothelial inflammation by delivering sphingosine-1-phosphate to the sphingosine-1-phosphate receptor 1. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 1, p. 118-129, 2017. DOI:10.1161/ATVBAHA.116.308435.
- SALAMA, M. F. et al. A novel role of sphingosine kinase-1 in the invasion and angiogenesis of VHL mutant clear cell renal cell carcinoma. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 7, p. 2803-2813, 24 mar. 2015. doi: 10.1096/fj.15-270413.
- SANCHEZ, T.; HLA, T.. Structural and functional characteristics of S1P receptors. **Journal of cellular biochemistry**, v. 92, n. 5, p. 913-922, 2004. <https://doi.org/10.1002/jcb.20127>
- SATTler K. J., et al. 2010. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res. Cardiol.* 105: 821-832. DOI: 10.1007/s00395-010-0112-5
- SCHAPER, K.; KIETZMANN, M.; BÄUMER, W. Sphingosine-1-phosphate differently regulates the cytokine production of IL-12, IL-23 and IL-27 in activated murine bone marrow derived dendritic cells. **Molecular Immunology**, v. 59, n. 1, p. 10-18, maio 2014. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.015.
- SCHWAB, S. R. et al. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. **Science**, v. 309, n. 5741, p. 1735-1739, 2005. DOI: 10.1126/science.1113640
- SCHWAB S. R., CYSTER J. G. 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat. Immunol.* 8: 1295-1301. DOI: 10.1038/ni1545
- SCHWEITZER, K. S. et al. Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 309, n. 2, p. L175-L187, 2015. doi: 10.1152/ajplung.00411.2014
- SELIM, S. et al. Plasma levels of sphingosine 1-phosphate are strongly correlated with haematocrit, but variably restored by red blood cell transfusions. **Clinical science**, v. 121, n. 12, p. 565-572, 2011. <https://doi.org/10.1042/CS20110236>
- SINNAKIROUCHENAN, R.; HOLLEY, J. L. Peritoneal dialysis versus hemodialysis: risks, benefits, and access issues. **Advances in chronic kidney disease**, v. 18, n. 6, p. 428-432, 2011. <https://doi.org/10.1053/j.ackd.2011.09.001>
- SKOURA, A. et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 function in myeloid cells regulates vascular inflammation and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 1, p. 81-85, 2011. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.213496>
- SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signaling lipid. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 4, n. 5, p. 397-407, 2003. <https://doi.org/10.1038/nrm1103>
- SPIEGEL, S.; MILSTIEN, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 6, p. 403-415, 6 maio 2011. <https://doi.org/10.1038/nri2974>
- STENVINKEL, P. et al. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6? **Kidney International**, v. 61, p. S103-S108, maio 2002. DOI: 10.1046/j.1523-1755.61.s80.19.x.
- STENVINKEL, P.; ANDERS ALVESTRAND. Review Articles: Inflammation in End-stage Renal Disease: Sources, Consequences, and Therapy. **Seminars in Dialysis**, v. 15, n. 5, p. 329-337, 1 out. 2002. DOI: 10.1046/j.1525-139x.2002.00083.x
- STOCKLER-PINTO, M. B. et al. The uremic toxin indoxyl sulfate exacerbates reactive oxygen species production and inflammation in 3T3-L1 adipose cells. **Free radical research**, v. 50, n. 3, p. 337-344, 14 jan. 2016. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1125996>

- STRUB, G. M. et al. Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 2, p. 600–612, 19 out. 2010. doi: 10.1096/fj.10-167502.
- SUN, K. et al. Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 12086, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms12086>.
- TANAKA, M.; KOMABA, H.; FUKAGAWA, M. Emerging Association Between Parathyroid Hormone and Anemia in Hemodialysis Patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 22, n. 3, p. 242–245, 16 maio 2018. <https://doi.org/10.1111/1744-9987.12685>
- TANAKA S, et al Sphingosine 1-phosphate signaling in perivascular cells enhances inflammation and fibrosis in the kidney. *Sci Transl Med*. 2022 Aug 17;14(658):eabj2681. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj2681
- TAGUCHI, S. et al. Effects of tumor necrosis factor- α inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 23587, 8 dez. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02864-1>
- TEITELBAUM, I. Peritoneal dialysis. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 19, p. 1786-1795, 2021. Doi: 10.1056/NEJMr2100152
- TERLIZZI, M. et al. S1P-induced TNF- α and IL-6 release from PBMCs exacerbates lung cancer-associated inflammation. **Cells**, v. 11, n. 16, p. 2524, 2022. doi: 10.3390/cells11162524
- THUY, A.V. et al. Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 158-171, 2014. <https://doi.org/10.1159/000362992>
- THUY, A. V. et al. The impact of sphingosine kinases on inflammation-induced cytokine release and vascular endothelial barrier integrity. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 21, p. 12848, 2022. doi: 10.3390/ijms232112848
- TITAN, S. **Princípios Básicos de Nefrologia**. 1. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013. p. 100–128.
- TOZONI, S. S. et al. Uremia and hypoxia independently induce eryptosis and erythrocyte redox imbalance. **Cell Physiol Biochem**, v. 53, n. 5, p. 794-804, 2019. DOI: 10.33594/000000173.
- VAZIRI, N. D. CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. *Current opinion in nephrology and hypertension*, v. 21, n. 6, p. 587, 2012. doi: 10.1097/MNH.0b013e328358c8d5.
- VENKATARAMAN, K. et al. Extracellular export of sphingosine kinase-1a contributes to the vascular S1P gradient. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 461-471, 2006. <https://doi.org/10.1042/BJ20060251>
- VENKATARAMAN, K. et al. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. **Circulation research**, v. 102, n. 6, p. 669-676, 2008. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165845
- VONESH, E. F. et al. The differential impact of risk factors on mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis. **Kidney international**, v. 66, n. 6, p. 2389-2401, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.66028.x>
- VU, T. M. et al. Mfsd2b is essential for the sphingosine-1-phosphate export in erythrocytes and platelets. **Nature**, v. 550, n. 7677, p. 524-528, 2017. <https://doi.org/10.1038/nature24053>
- WASSMANN, S. et al. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation research**, v. 94, n. 4, p. 534-541, 2004. DOI: 10.1161/01.RES.0000115557.25127.8D

WILKERSON, B. A.; ARGRAVES, K. M. The role of sphingosine-1-phosphate in endothelial barrier function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 10, p. 1403-1412, 2014. doi: 10.1016/j.bbalip.2014.06.012

WINKLER, M. S. et al. Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. **Critical Care**, v. 19, p. 1-8, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-1089-0>

WINKLER, M S et al. Erythrocytes increase endogenous sphingosine 1-phosphate levels as an adaptive response to SARS-CoV-2 infection. **Clinical Science**, v. 135, n. 24, p. 2781-2791, 2021. <https://doi.org/10.1042/CS20210666>

WONG, M. M. Y. et al. Anemia and iron deficiency among chronic kidney disease Stages 3–5ND patients in the Chronic Kidney Disease Outcomes and Practice Patterns Study: often unmeasured, variably treated. **Clinical kidney journal**, v. 13, n. 4, p. 613-624, 2020. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz091>

XIAO, J.. Sphingosine 1-Phosphate Lyase in the Developing and Injured Nervous System: a Dichotomy?. **Molecular Neurobiology**, v. 60, n. 12, p. 6869-6882, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03524-3>

XIE, T. et al. Erythrocyte metabolic reprogramming by sphingosine 1-phosphate in chronic kidney disease and therapies. **Circulation research**, v. 127, n. 3, p. 360-375, 2020. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316298>

YANG, L. et al. Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells. **British journal of haematology**, v. 107, n. 2, p. 282-293, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01697.x>

YATOMI, Y. et al. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. **The journal of biochemistry**, v. 121, n. 5, p. 969-973, 1997. 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021681

YEUN, J. Y. et al. C-reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 35, n. 3, p. 469–476, mar. 2000. DOI: 10.1016/s0272-6386(00)70200-9.

YI, S.W.; MOON, S. J.; YI, J. J.. Low-normal hemoglobin levels and anemia are associated with increased risk of end-stage renal disease in general populations: a prospective cohort study. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0215920, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215920>

YILMAZ, M. I. et al. Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory. **Blood purification**, v. 32, n. 3, p. 220-225, 2011. doi: 10.1159/000328037.

YOSHIMOTO, T. et al. Positive modulation of IL-12 signaling by sphingosine kinase 2 associating with the IL-12 receptor β 1 cytoplasmic region. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1352-1359, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.3.1352>

ZHAO, C. G. et al. Sphingosine-1-phosphate is a possible fibrogenic factor in gluteal muscle fibrosis. **Physiological Research**, v. 62, n. 6, p. 691, 2013. DOI: 10.33549/physiolres.932441

ZHU, Q. et al. A novel lipid natriuretic factor in the renal medulla: sphingosine-1-phosphate. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 301, n. 1, p. F35-F41, 2011. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00014.2011>

ZOCCALI, C. et al. Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 2, p. 490-496, 2002. Doi: 10.1681/ASN.V132490