



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO – 2013/2018

**O IMPACTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA
PELA TOXICIDADE URÊMICA NO DANO
CARDIOVASCULAR EM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

LIGIA MARIA CLARO

**CURITIBA
2018**

LIGIA MARIA CLARO

**O IMPACTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA
PELA TOXICIDADE URÊMICA NO DANO
CARDIOVASCULAR EM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Roberto Pecoits-Filho

**Curitiba
2018**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

C613i
2018 Claro, Ligia Maria
Impacto da resposta inflamatória induzida pela toxicidade urêmica no dano cardiovascular em doença renal crônica / Ligia Maria Claro ; orientador, Roberto Pecoits-Filho. -- 2018
71 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2018.

Inclui bibliografia

1. Insuficiência renal crônica. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Citocinas.
4. Biomarcadores. I. Pecoits-Filho, Roberto.
II. Pontifícia Universidade Católica Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 616.614



PUCPR

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

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos dezoito dias do mês de maio de 2018 às 08hs e 00min., realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese “O IMPACTO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA TOXICIDADE URÊMICA NO DANO CARDIOVASCULAR EM DOENÇA RENAL CRÔNICA” apresentado por Ligia Maria Claro para obtenção do título de Doutora; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits-Filho – Presidente (PUCPR)	
Profa. Dra. Andrea Novais Moreno do Amaral – (PUCPR)	
Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni (UFSP)	
Profa. Dra. Andrea Emília Marques Stingham – (UFPR)	
Prof. Dr. Maurilo Leite Junior – (UFRJ)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits-Filho Conceito Aprovado

Profa. Dra. Andrea Novais Moreno do Amaral Conceito APROVADA

Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni Conceito APROVADA

Profa. Dra. Andrea Emília Marques Stingham Conceito Aprovada

Prof. Dr. Maurilo Leite Junior Conceito APROVADA

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits-Filho
Presidente da Banca Examinadora

Prof.ª Dra. Cristina Pellegrini Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 – Prado Velho – CEP 80215-901
Tel./Fax: (41) 3271-2285 – E-mail: ppgcs@pucpr.br
www.pucpr.br – Curitiba – Paraná – Brasil

NOTA BIOGRÁFICA

LIGIA MARIA CLARO, graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Paraná (UFPR) em 1998, tendo sido bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq) entre os anos de 1996 – 98. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFPR em 2002. Atuou na área de Hematologia em laboratórios de Análises Clínicas e como docente em instituições de ensino superior. Foi também colaboradora na PUCPR, na área de pesquisa científica. Atualmente, trabalha no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), em Hematologia e Hemostasia

DEDICATÓRIA

À Alice, por dar mais vida às nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Pecóits-Filho, por sua paciência e apoio no amadurecimento dos meus conhecimentos em doença renal crônica e também, por ser uma pessoa entusiasta e motivadora.

A todos os pacientes que contribuíram voluntariamente com este estudo, sem vocês não seria possível a realização deste trabalho.

À Jane Fábria Domênica, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por ser tão dedicada e prontamente me auxiliar quando requisitada.

À professora Márcia Olandowski, pela realização das análises estatísticas.

À professora Lia S. Nakao e à Carla J. Dolenga, pelas dosagens das toxinas urêmicas.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, especialmente à professora Lucia de Noronha e à Marina Luise V. Azevedo pela realização da técnica de imunohistoquímica.

À professora Andréa Moreno-Amaral e à Ana Carolina Gadotti, por realizarem as leituras das lâminas de imunohistoquímica.

À Andréa Emília Marques Stinghen, amiga de longa data, por me socorrer nos momentos de “apuro intelectual”.

Aos meus pais, Messias e Luzia, por não medirem esforços para me proporcionar o melhor estudo, o qual foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Ao Christian, meu amado esposo, por me apoiar e entender “do seu jeito”.

À Alice, minha amada filha, que do alto dos seus 2 anos e nove meses soube compreender com tamanha “maturidade” as minhas ausências.

À Cinthia Barbosa Pelissari, minha amiga-irmã, que esteve presente em todos os momentos, para rir, chorar, aconselhar e também, pelo apoio e colaboração no Laboratório de Hematologia do HEMEPAR.

Aos amigos do Laboratório Experimental Multiusuário pela convivência e apoio, especialmente à amiga Irenice Cairo da Silva que sempre me ajudou e motivou.

À Maria Suely Soares, minha eterna professora, por ter despertado em mim o gosto pela pesquisa científica.

Por ter sido um trabalho realizado a muitas mãos, agradeço a todos que de uma forma ou outra, ajudaram.

A Deus, por cuidar de mim e dos meus e dar serenidade para lidar com as minhas limitações

EPÍGRAFE

Das utopias
Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!
(Mário Quintana)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

sCD36 – do inglês soluble component of differentiation 36

DCV – Doença cardiovascular

DRC – Doença renal crônica

hsCRP – do inglês high sensitivity C reactive protein

ICAM -1 – do inglês intercellular adhesion molecule – 1

IL-6 – Interleucina – 6

IL – 8 – Interleucina - 8

LDL – do inglês Low density lipoprotein

MCP -1 – do inglês monocyte chemoattractant protein - 1

MDRD – do inglês modification of diet in renal disease

PCR – proteína C reativa

sRAGE – do inglês soluble receptor advanced glycation end products

VCAM – 1 – do inglês vascular adhesion molecule – 1

TFG – taxa de filtração glomerular

TNF – α – do inglês tumoral necrosis fator

UT – do inglês uremic toxin

UTRB – do inglês uremic toxin response biomarkers

RESUMO

Em pacientes com doença renal crônica (DRC), altas concentrações de toxinas urêmicas (TU) causam disfunção em células ou sistemas biológicos, que podem ser mediados pela resposta imune. No entanto, pouco se sabe sobre a relação entre TU, biomarcadores inflamatórios e biomarcadores de resposta à toxicidade urêmica (UTRB) e seu impacto no estado cardiovascular. Nosso objetivo foi identificar as associações entre TU, biomarcadores inflamatórios e UTRB e seus papéis como preditores de desfecho em pacientes com DRC moderada a grave.

Material e métodos: Amostras de plasma obtidas de sessenta e sete pacientes nos estágios 3, 4 e 5 de DRC (coorte 1) foram usadas para determinar os níveis totais de TU (indoxil sulfato - IS, p-cresil sulfato - pCS e ácido indol-3-acético - IAA) por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As concentrações de biomarcadores inflamatórios [IL-6, proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCPR), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *vascular adhesion molecule-1* (sVCAM-1), *intercellular adhesion molecule-1* (sICAM-1) e sFas] e UTRBs [forma solúvel de CD36 (sCD36), receptor solúvel de produtos finais de glicação avançada (sRAGE), fractalcina] foram medidos por ensaios imunométricos. Para avaliar a presença do receptor da fractalcina (CX3CR1) no tecido, foi realizada imunohistoquímica dos segmentos da artéria íliaca externa e renal de uma coorte composta por pacientes com DRC em estágio 5 e seus doadores saudáveis (coorte 2). A avaliação cardiovascular foi realizada através do Doppler de carótidas. Os pacientes foram acompanhados prospectivamente por uma média de 5,2 anos e a morte por qualquer evento foi usada como desfecho primário.

Resultados: Os níveis plasmáticos da TU, bem como os níveis de biomarcadores inflamatórios (MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1, sFas) e UTRB, foram correlacionados negativamente com a TFG em pacientes com DRC. IS e p-CS correlacionaram-se com sFas ($r=0,39$, $p=0,001$; $r=0,46$; $p<0,001$), sCD36 ($r=0,62$, $p<0,001$, $r=0,55$, $p<0,001$), sRAGE ($r=0,48$, $p<0,001$, $r=0,48$, $p<0,001$) e fractalcina ($r=0,77$, $p<0,001$, $r=0,77$, $p<0,001$), respectivamente. O IAA correlacionou-se com sCD36 ($r=0,52$, $p<0,001$) e fractalcina ($r=0,41$, $p<0,001$). No coorte 2, observou-se uma expressão tecidual de CX3CR1 significativamente maior nos pacientes com DRC (receptores) que nos controles (doadores). Quando comparados os casos com e sem placa aterogênica, em relação a TU e biomarcadores, foi observada diferença significativa para sCD36 ($p=0,049$). Baixa TFG foram associados com aumento da mortalidade (HR 1,03, IC 95% 1,01-1,08; $p=0,02$), enquanto os maiores níveis séricos de IS (HR 1,02, IC95% 1,001-1,040; $p=0,03$), pCS (HR 1,005, IC95% 1,001-1,010; $p=0,007$), IL-6 (HR 1,20, IC95% 1,02 - 1,40; $p=0,026$), sFas (HR 1,002, IC95% 1,003-1,40; $p=0,001$), sCD36 (HR 1,02, IC95% 1,004-1,030, $p=0,01$) e fractalcina (HR 3,98, IC95% 1,200-13,180; $p=0,02$) foram associados a um risco aumentado de mortalidade. IAA, hsCPR, MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1 e sRAGE não foram preditores independentes ou significativos de eventos fatais na população estudada.

Conclusões: Existem fortes correlações entre TFG, TUs circulante, biomarcadores plasmáticos de inflamação sistêmica e vascular e UTRB. Tanto TU (IS, pCS), sFas e alguns UTRB (sCD36 e fractalcina) foram preditores independentes de risco de mortalidade total em pacientes com DRC moderada a grave.

Palavras-chave: Toxinas urêmicas, biomarcadores inflamatórios, sCD36, Fractalcina (CX3CL1) e sRAGE

ABSTRACT

In chronic kidney disease (CKD) patients, high concentrations of uremic toxins (UT) cause dysfunction in cells or biological systems, which may be mediated by the immune response. However, little is known about the relationship between UT, inflammatory biomarkers and uremic toxicity response biomarkers (UTRB) and their impact on cardiovascular status. We aimed to identify the associations between uremic toxins, inflammatory biomarkers and UTRB and their roles as predictors of outcome in patients with moderate to severe CKD.

Material and methods: Plasma samples obtained from sixty-seven CKD patients stages 3, 4, and 5 (coorte 1) were used to determine total levels of UT (indoxyl sulfate - IS, *p*-cresil sulfate - *p*CS and indole-3-acetic acid - IAA) by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. The concentrations of inflammatory biomarkers [IL-6, high sensitivity C protein reactive (hsCPR), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), soluble vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and sFas] and UTRBs [soluble form of CD36 (sCD36), soluble receptor of advanced glycation end products (sRAGE), fractalkine] were measured by immunometric assays. To evaluate the presence of fractalkine receptor (CX3CR1) in the tissue, immunohistochemistry of external iliac and renal artery segments from donors and stage 5 CKD patients were performed (coorte 2). Cardiovascular evaluation was performed through carotid Doppler. Patients were followed prospectively for an average of 5.2 years and death by any event was used as the primary outcome.

Results: UT plasma levels as well as the inflammatory biomarkers levels (MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1, sFas) and UTRB were correlated negatively with GFR in CKD patients. IS and *p*-CS correlated with sFas ($r=0.39$, $p=0.001$; $r=0.46$; $p<0.001$), sCD36 ($r=0.62$, $p<0.001$, $r=0.55$, $p<0.001$), sRAGE ($r=0.48$, $p<0.001$, $r=0.48$, $p<0.001$) and fractalkine ($r=0.77$, $p<0.001$, $r=0.77$, $p<0.001$), respectively. IAA correlated with sCD36 ($r=0.52$, $p<0.001$) and fractalkine ($r=0.41$, $p<0.001$). In cohort 2, significantly more CX3CR1 tissue expression was observed in patients with CKD (receptors) than in controls (donors). When comparing cases with and without atherogenic plaque, relative to UT and biomarkers, statistically significant difference for sCD36 was observed ($p=0.049$). Lower GFR were associated with increased mortality (HR 1.03, 95% CI 1.01-1.08; $p=0.02$), whereas the highest serum IS levels (HR 1.02, IC95% 1.001-1.040; $p=0.03$), *p*CS (HR 1.005, IC95% 1.001-1.010; $p=0.007$), IL-6 (HR 1.20, IC95% 1.02 – 1.40; $p=0.026$), sFas (HR 1.002, IC95% 1.003-1.40; $p=0.001$), sCD36 (HR 1.02, IC95% 1.004-1.030; $p=0.01$) and fractalkine (HR 3.98, IC95% 1.200-13.180; $p=0.02$) were associated with an increased risk of mortality. IAA, hsCPR, MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1 and sRAGE were not independent or significant predictors of fatal events in the study population.

Conclusions: There are strong correlations between GFR, circulating UT, plasma biomarkers of systemic and vascular inflammation and UTRB. Both UT (IS, *p*CS), sFas and some UTRB (sCD36 and fractalkine) were independent predictors of total mortality risk in patients with moderate to severe CKD.

Running title: Uremic toxins, Inflammatory biomarkers, sCD36, Fractalkine (CX3CL1) and sRAGE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	26
3. DESENVOLVIMENTO	27
4. ARTIGO	34
5. CONCLUSÕES	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
8. ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é considerada um problema de saúde pública por sua prevalência e incidência elevadas. Pacientes com DRC apresentam alto risco de mortalidade, especialmente em decorrência da doença cardiovascular (DCV) (1). Os fatores de risco tradicionais não são suficientes para explicar esse fato e muitos fatores considerados não-tradicionais, como a inflamação e a toxicidade urêmica vêm sendo estudados (2). As toxinas urêmicas são retidas no sangue e nos tecidos, em decorrência do dano renal e são potencialmente causadores de processos degenerativos. Isto é caracterizado por um complexo de alterações celulares e moleculares, intimamente ligados à resposta imune inadequada (3). A disfunção imune da DRC se caracteriza por inflamação sistêmica e crônica, com altos e constantes níveis de marcadores de inflamação. A toxicidade urêmica ainda, pode levar a uma resposta inflamatória endotelial, seguida de aterosclerose e conseqüentemente, DCV (4). Alguns biomarcadores de inflamação crônica, disfunção endotelial e apoptose são bem conhecidos e estudados. Porém, para melhor entender a patogênese de algumas moléculas e a relação delas com a toxicidade urêmica, com a progressão e o impacto na DCV em DRC, se faz necessário buscar novos biomarcadores. Assim, talvez seja possível melhor estratificar, obter novos alvos de tratamento e reduzir a mortalidade desses pacientes.

1.1 Epidemiologia da Doença Renal Crônica e risco cardiovascular

A DRC é definida como uma condição onde a função renal está diminuída, demonstrada pela taxa de filtração glomerular (TFG) inferior a 60mL/min por 1,73/m², ou com a presença de marcadores de dano renal (proteinúria, sinais radiológicos de comprometimento renal), com pelo menos 3 meses de duração, independentemente da causa subjacente (5). O melhor indicador disponível da função renal é a TFG que pode ser determinada pela medida da depuração renal de solutos com produção estável, ausência de metabolização extra renal, filtração glomerular sem restrições e baixa

reabsorção ou secreção tubular. Na prática, a depuração de creatinina, levando-se em conta os níveis séricos e urinários, é a mais utilizada. A TFG pode também ser estimada através de equações, considerando-se níveis séricos de creatinina, e dados antropométricos e demográficos (idade, peso, sexo e raça). A primeira equação desenvolvida foi a de Cockcroft-Gault, porém nos últimos anos as fórmulas de MDRD e a CKDEpi se mostraram superiores em termos de performance, para a estratificação da DRC (6).

A DRC é considerada um problema de saúde pública, por sua prevalência e incidência elevadas (cerca de 7 a 10% da população adulta), além dos enormes custos econômicos e sociais por conta do manejo das comorbidades associadas a DRC, bem como das terapias de substituição de função renal. Inúmeros fatores como o diabetes, hipertensão arterial, obesidade e história familiar estão associados à instalação e progressão da DRC (1). A compreensão dos mecanismos da DRC e sua interação com fatores de risco tem permitido o desenvolvimento de intervenções farmacológicas e não farmacológicas, especialmente nos pilares de controle pressórico, controle glicêmico e inibição do sistema renina angiotensina aldosterona, com comprovado benefício na prevenção primária da DRC e no retardo da progressão da doença (1, 7, 8).

Além do potencial de progressão da DRC para os estágios avançados, a DRC representa um multiplicador do risco da doença cardiovascular (DCV), por mecanismos que não podem ser explicados exclusivamente pelos fatores de risco tradicionais da DCV (9). Entre os fatores não tradicionais para a DCV na DRC estão sobrecarga volêmica, os distúrbios do metabolismo mineral, e a inflamação (2). Intimamente ligados com estes fatores de risco CV que são peculiares da DRC está o fenômeno da toxicidade urêmica, que é o ponto central desta tese.

1.2. Conceitos básicos da toxicidade urêmica

Com a progressão da DRC, os rins perdem a capacidade de remover efetivamente da corrente circulatória produtos do metabolismo do organismo ou

provenientes da dieta. Quando estes produtos do metabolismo são eliminados predominantemente pelos rins, há um acúmulo no organismo e aumento na concentração circulante ou tecidual. Quando estes compostos resultam em reação deletéria em células ou tecidos, são chamados de toxinas urêmicas (10, 11). Esforços consideráveis foram realizados para identificar e compreender os mecanismos responsáveis para tal toxicidade porém, poucas formas de intervenções terapêuticas, que possam reduzir os efeitos adversos das toxinas urêmicas, foram estudadas até o presente (2).

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

- Compostos pequenos, solúveis em água, com no máximo 500 Da. Por exemplo: a ureia e a creatinina, as quais, são facilmente removidas por diálise. Os compostos neste grupo não têm necessariamente uma toxicidade funcional sobre o organismo;

- Compostos de peso molecular moderado com mais de 500 Da. Os exemplos deste grupo são β 2-microglobulina e leptina, e estas moléculas só podem ser removidas através de hemodiálise com o uso de membranas de porosidade grande. Muitos dos compostos neste grupo são peptídeos que afetam um grande número de órgãos e sistemas;

- Compostos ligados a proteínas, em geral com baixo peso molecular. Os exemplos deste grupo são os fenóis (p-cresol, p-cresil sulfato) e os indóis (indoxil sulfato, ácido-3-indol acético), compostos difíceis de remover por diálise e com diversas atividades tóxicas no organismo (12, 13).

A maioria dos estudos pioneiros com compostos fenólicos iniciou-se com o p-cresol, mas posteriormente descobriu-se que, este composto se encontra em concentrações muito pequenas no organismo, sendo logo metabolizado para seus conjugados pela microbiota intestinal (12). Durante sua passagem pelas mucosas do cólon e fígado, é metabolizado por processos de conjugação (sulfatação e glucoronidação) formando dois compostos o p-cresilsulfato e o p-cresilglucoronidato (14). Estudos *in vitro* demonstram que o p-cresol afeta a resposta inflamatória, interferindo na ativação de leucócitos polimorfonucleares e resposta endotelial a citocinas (15).

Entre as toxinas urêmicas ligadas à proteína, o indoxil sulfato (IS), p-cresil sulfato (pCS) e ácido-3-indol acético (IAA) são mais extensivamente estudadas devido ao seu impacto negativo no sistema cardiovascular (16). Estas toxinas se originam da fermentação de compostos indólicos ou fenólicos pela microbiota do intestinal (17) e são moléculas citotóxicas que, induzem efeitos cardiovasculares e respostas pró-inflamatórias. Vários estudos demonstraram que estas toxinas são marcadores confiáveis de DCV e da evolução da doença e mortalidade em DRC (18-20). O p-CS se origina da conjugação do p-cresol pelo fígado sendo considerado a toxina efetiva (18). Schepers e colaboradores (2007) observaram um efeito pró-inflamatório do p-CS, avaliado pelo aumento da formação de radicais livres produzidos por leucócitos, contribuindo para o dano vascular nos pacientes com DRC (21). O p-CS pode induzir o desprendimento de micropartículas endoteliais, mesmo na ausência de dano (22), sugerindo que esta toxina pode estar envolvida na disfunção endotelial e significativamente correlacionado com a patogênese da aterosclerose em pacientes em estágio avançado de DRC (23). O p-CS é um composto fenólico, pequeno, com características lipofílicas e por isso, facilmente penetra na membrana celular e desorganiza a célula como um todo (24). Além disso, prejudica a reatividade e remodelação vascular (25) e também, acelera o desenvolvimento da disfunção cardíaca associada à DRC, intensificando a apoptose de cardiomiócitos (26).

O IS é derivado do triptofano, o qual é metabolizado em indol que, após ser absorvido pelo sangue, é transformado em IS no fígado (27). Alguns estudos mostraram que essa toxina urêmica pode acelerar a progressão da DRC através da indução direta de uma variedade de genes envolvidos no processo inflamatório e fibrose (28, 29). O IS desempenha um papel essencial na lesão endotelial e desencadeia a produção de moléculas pró-inflamatórias, inibe o reparo do endotélio e produz radicais livres promovendo assim, a progressão da DRC (30). Além disso, pode estimular progressivamente a fibrose devido ao aumento dos níveis de expressão do fator de estimulação do crescimento (TGF- β 1), inibição de metaloproteases teciduais e colágeno pró- α 1 (31). Estudos recentes mostraram que o nível plasmático de IS é um marcador válido para DCV e mortalidade em pacientes com DRC (19, 29).

Outra toxina do grupo indol, derivada do metabolismo do aminoácido triptofano é o IAA. Dou e colaboradores (2015) mostraram que a concentração desta toxina no plasma é de 5 μM e a máxima de 50 μM e que, juntamente com o IS, o IAA induz estresse oxidativo em células tubulares e endoteliais (32). Os mesmos autores demonstraram também que, o IAA aumentou a expressão de genes de inflamação endotelial como IL-6, IL-8, ICAM-1 e MCP-1 no endotélio de pacientes com DRC (32). Então, concluíram que, o IAA mostra efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes, de inflamação vascular, estresse oxidativo e aterosclerose e age como um marcador significativo para DCV, podendo estar associado à mortalidade na DRC (32). Além disso, o IAA, assim como o IS, inicia a transcrição do fator receptor de human aryl hydrocarbon (AhR) (33) cuja a ativação está envolvida nos processos de: aterogênese, inflamação vascular e estresse oxidativo (34).

A literatura mostra que IS e pCS juntos são amplamente responsáveis pela progressão da DRC e pelo desenvolvimento de complicações, como a DCV. Estudos sugerem que as ações patogênicas do IS e p-CS derivam da indução de espécies reativas do oxigênio as quais ativam a via NF- κ B, resultando em estresse oxidativo, produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (28, 35, 36). O entendimento destes mecanismos é vital para elucidar se o IS e p-CS são potenciais alvos terapêuticos ou unicamente biomarcadores da progressão da DRC (36).

1.3. Toxicidade urêmica e inflamação

Diante do exposto acima, conclui-se que o ambiente urêmico propicia a geração de toxicidade celular e tecidual, potencialmente causadores de processos degenerativos. Isto é caracterizado por um complexo de alterações celulares e moleculares, intimamente ligados à resposta imune inadequada (3). A disfunção imune da DRC se caracteriza por inflamação sistêmica e crônica, com altos e constantes níveis de marcadores de inflamação, como a proteína C reativa (PCR), citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (37). A PCR é um marcador sistêmico da inflamação e estudos prospectivos mostraram que a mesma tem um efeito sinérgico com citocinas pró-inflamatórias como um preditor de mortalidade cardiovascular em pacientes em hemodiálise (38).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, uma foi amplamente estudada: a interleucina-6 (IL-6). Esta citocina induz a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos e à produção de proteínas de fase aguda como a PCR e o fibrinogênio (39). O fato da IL-6 promover a produção de PCR, uma proteína conhecida por diminuir a expressão de óxido nítrico sintetase, pode ser a razão pela qual foi implicada no desenvolvimento da aterosclerose através de mecanismos metabólicos, endoteliais e pró-coagulantes (40). Diante disso, estudos foram realizados correlacionando a IL-6 ao aumento da mortalidade e desfechos adversos em pacientes em estágio final de DRC (40, 41). Além disso, mostrou-se um preditor independente de mortalidade cardiovascular em um coorte de pacientes em diferentes estágios da DRC, com maior poder de predição quando comparada à PCR, TNF- α e albumina (42).

A disfunção endotelial é um evento comumente descrito na falência renal, tanto crônica como aguda, assim como em estágio final de todas as doenças renais. Acredita-se que o acúmulo de toxinas urêmicas, pode levar a uma resposta inflamatória endotelial, seguida de aterosclerose e conseqüentemente, DCV (4, 13). A aterosclerose é uma doença vascular inflamatória e frequentemente está associada à DRC (4). De fato, a exposição do endotélio a estas toxinas, leva a modificações no fenótipo celular, fazendo com que as células endoteliais respondam com a produção de moléculas pró-inflamatórias (43). A disfunção endotelial é marcada pela regulação positiva de moléculas de adesão celular, tais como a *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intercelular adhesion molecule-1* (ICAM-1) e selectinas, que desempenham um papel fundamental nas interações entre os leucócitos, plaquetas e endotélio vascular (44) e também, cooperam com quimiocinas influenciando o aumento da adesão de monócitos e neutrófilos no endotélio ativado (45). Seguindo a aderência ao endotélio, citocinas de quimioatração tais como a *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), medeiam a transmigração e ativação de células inflamatórias dentro do espaço sub-endotelial, promovendo a diferenciação de monócitos em macrófagos, os quais se tornarão as chamadas *foam cells* após a fagocitose de LDL-oxidada, e conseqüentemente influenciarão a aterosclerose em seus estágios iniciais (45, 46).

Um outro marcador envolvido na inflamação e desenvolvimento de DCV em DRC é o Fas. O sistema Fas e seu ligante (FasL) são membros da família do TNF e são relacionados à inflamação e apoptose. Foi demonstrado que o sistema Fas/FasL é expresso em lesões ateroscleróticas e está relacionado à apoptose de células endoteliais e reposta inflamatória em placas de aterosclerose (47). Blanco-Colio e colegas (2007) mostraram que o aumento da sFas e a diminuição de sFasL correlacionou-se com risco cardiovascular sugerindo que, as formas solúveis desse sistema (sFas/sFasL) sejam consideradas um novo biomarcador de dano vascular e risco cardiovascular (48). Em outro estudo, foi observado que as concentrações plasmáticas de sFas e sFasL foram significativamente maiores em pacientes com DRC quando comparados com o grupo controle. Estes resultados indicam que a DRC está fortemente associada com a inflamação, desregulação do sistema imune, disfunção endotelial e dano vascular (49).

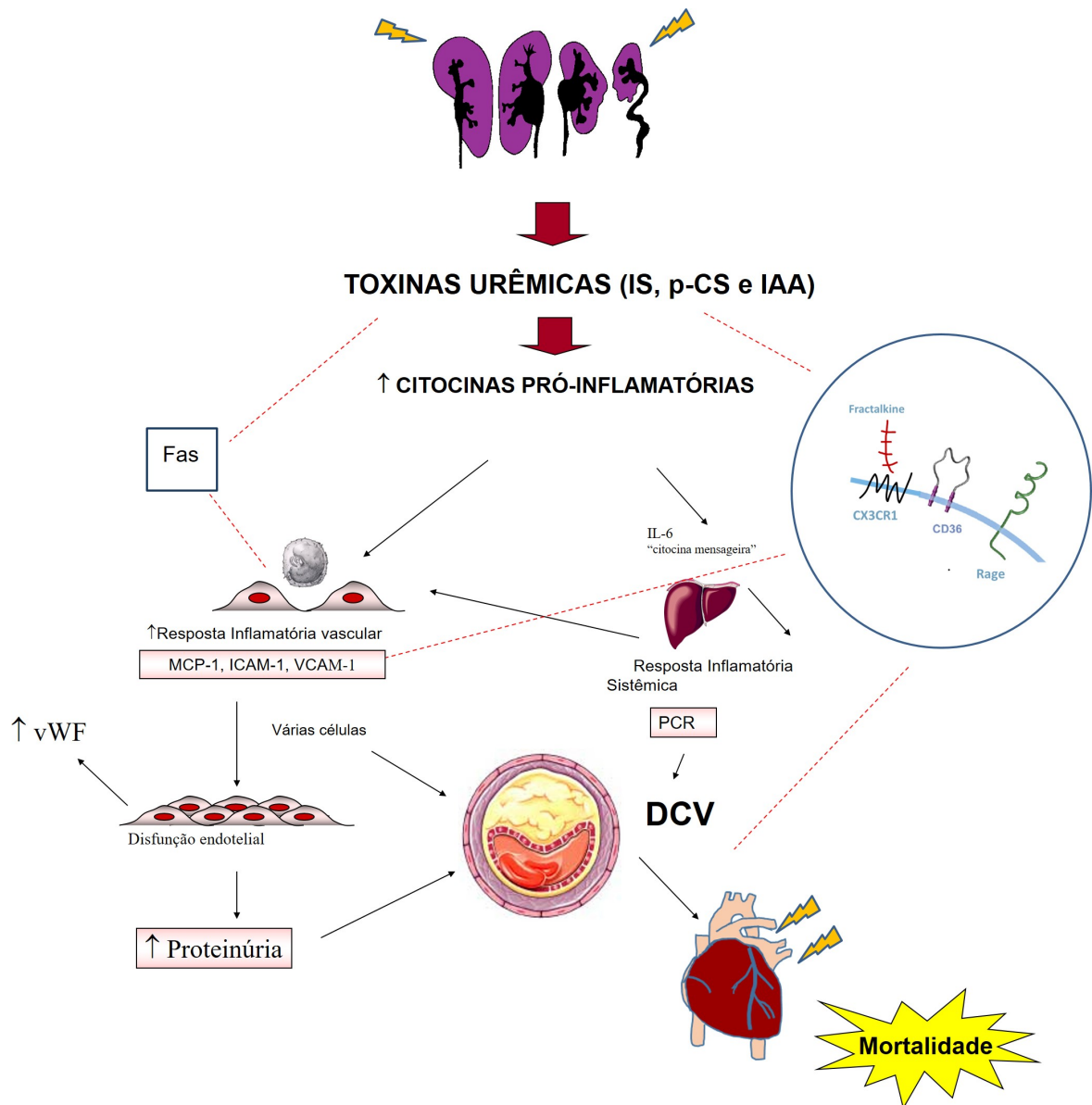


Figura 1. Efeitos das toxinas urêmicas na síndrome cardiorenal. Em condições de falência renal, ocorre o aumento de toxinas urêmicas tais como IS, pCS e IAA. A toxicidade urêmica faz com ocorra um aumento das citocinas inflamatórias, moléculas de adesão e demais biomarcadores levando à disfunção endotelial, aterosclerose, DCV e conseqüentemente à morte. Esta figura foi gentilmente cedida, para ser adaptada, pela professora Dra. Andréa Emília Marques Stingenhen.

A resposta inflamatória da DRC não somente representa um evento fisiopatológico importante, mas também abre perspectivas de identificação de múltiplos biomarcadores deste processo. Isso vem se consolidando como ferramentas de utilidade no entendimento dos mecanismos de doença, identificação de pacientes sob alto risco de complicações e na monitoração de tratamentos de redução de risco de DCV, por exemplo. Alguns biomarcadores de inflamação crônica como a IL-6, disfunção endotelial (formas solúveis de moléculas de adesão) e apoptose (Fas, Fas ligante) são bem conhecidos e estudados, mas, para melhor entender a patogênese de algumas moléculas e a relação delas com a toxicidade urêmica, com a progressão e o impacto na DCV em DRC, se faz necessário buscar novos biomarcadores. sCD36, Fractalcina e RAGE solúvel são alguns desses exemplos.

O CD36, também conhecido como translocase de ácido graxo e glicoproteína IV ou IIIb da plaqueta, é uma glicoproteína integral de membrana, multiligante, expressa na superfície de uma variedade de células incluindo: adipócitos, células musculares esqueléticas, plaquetas, células endoteliais e monócitos/macrófagos (50, 51). O CD36 atua como um receptor para a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em células apoptóticas, em macrófagos e como um transportador de ácido graxo em músculo e adipócitos (52, 53). Possui uma função muito importante na patogênese da aterosclerose pois o aumento da expressão de CD36 em macrófagos induz a internalização de LDL oxidada e leva à formação de células espumosas, presentes nos estágios precoces de aterosclerose (54).

A forma solúvel (sCD36) é considerada um biomarcador da expressão alterada de CD36 nos tecidos pois, foi observado em concentrações aumentadas nos obesos e em indivíduos com diabetes tipo II (51). Alguns estudos mostraram a influência do CD36 na progressão da DRC pois, estes pacientes não somente têm um perfil lipídico mais aterogênico como também evidências de inflamação crônica e estresse oxidativo (55, 56).

Em um estudo com animais hipercolesterolêmicos com um modelo de doença renal progressiva, reforçou-se a teoria que as lipoproteínas oxidadas estão diretamente envolvidas na ativação de vias moleculares que desencadeiam inflamação e estresse oxidativo, levando à DCV. Em ratos

geneticamente modificados CD36^{-/-} e recebendo dieta normal observou-se a diminuição da severidade da fibrose renal. Estes dados são consistentes com o fato do CD36 não somente ser um receptor para compostos oxidados mas, também propagar um estado de estresse oxidativo o que lesa o rim cronicamente (57). Chmielewski e colaboradores (2010) demonstraram que a concentração de CD36 solúvel, o 75º percentil foi associado ao aumento do risco de mortalidade cardiovascular em pacientes em diálise (58).

Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) fazem parte da grande variedade de substâncias formadas a partir de interações amino carbonila de natureza não enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (59).

Os AGEs são fortemente implicados no desenvolvimento de doença vascular e são de especial interesse como novos biomarcadores, porque eles são um elo etiológico entre hiperglicemia e complicações no diabetes. Pensa-se também, que os AGEs contribuem para o desenvolvimento de doença vascular em não diabéticos através de suas atividades pró-oxidantes (60, 61).

Os AGEs ligam-se a uma variedade de receptores e os níveis circulantes desses receptores são influenciados por fatores endógenos (glicose, insulina, inflamação, espécies reativas do oxigênio) e exógenos (tabagismo, dieta) (62). O RAGE é o receptor mais amplamente estudado e que se expressa nas células vasculares, retina, rins e células inflamatórias (63). Em resposta à formação dos AGEs, a expressão de RAGE aumenta em doenças como diabetes e DRC (63).

O receptor solúvel dos AGEs (sRAGE) é a isoforma de RAGE encontrada no soro e forma-se principalmente, por clivagem proteolítica de RAGE e secundariamente, por RAGE secretado endogenamente (esRAGE). O esRAGE pode ser medido de forma independente e compreende cerca de um quarto do RAGE sérico total e está altamente correlacionada com níveis totais de sRAGE (64). A via de sinalização do RAGE pode ser inicializada por diversos ligantes, como os AGEs, uma superfamília de imunoglobulinas, proteínas S100/ calgranulinas, peptídeo β -amilóide, entre outras moléculas. Quando estimulado por AGEs, RAGE induz inflamação, contribui para a lesão

do tecido e é um incentivo para a progressão da doença crônica através da sinalização mediada por $\text{NF}\kappa\beta$ (65, 66).

Considerando a crescente literatura sobre sRAGE e suas associações com o diabetes e a DCV, o papel deste marcador no desenvolvimento da DRC não é bem caracterizado. Estudos indicam que, os níveis de sRAGE são elevados entre os pacientes com DRC e em estágio final da DRC em relação a indivíduos sem doença renal ou com doença menos grave (67, 68).

Rebholz e colaboradores (2014) estudaram uma coorte com 15.792 pacientes onde observou-se que, as taxas de sRAGE do *baseline* foi inversamente correlacionada com a eTFG (estimada) e positivamente correlacionada com outros marcadores de filtração renal (β 2 microglobulina, por exemplo). Estes resultados sugerem que os níveis circulantes de sRAGE podem ser diretamente afetados pela insuficiência dos rins em filtrar substâncias endógenas de forma adequada ou, pelo contrário, que sRAGE impacta diretamente a função renal sendo um marcador de risco para o desenvolvimento tanto no início como no estágio final da DRC (69). A literatura mostra também que os níveis elevados sRAGE estão associados com desfechos adversos em pacientes com DRC (66, 70, 71).

O mecanismo pelo qual sRAGE exerce sua influência em tecidos e vias de sinalização não está totalmente elucidado. Uma possibilidade é que os níveis de sRAGE podem refletir o grau da atividade AGE-RAGE, a qual por sua vez pode contribuir de forma adversa na saúde (72). Isto é, na presença de níveis elevados dos AGEs circulantes ocorre aumento da expressão de mRNA, resultando na regulação positiva da produção de RAGE (73). Visto que, sRAGE é um produto da clivagem de RAGE, a concentração plasmática de sRAGE poderia corresponder à quantidade de RAGE produzido. Outra explicação possível é que, semelhante aos AGEs, níveis elevados sRAGE circulantes resultam da diminuição da depuração renal e subsequente acúmulo (74, 75). A concentração de sRAGE na prática, pode representar o estado inflamatório, e, assim, contribuir na patogênese da doença renal (76, 77).

A fractalcina (CX3CL1), uma proteína transmembrana contendo múltiplos domínios é o único membro da subfamília CX3C. A forma solúvel consiste no domínio extracelular gerado por metaloproteases e possui função

de quimioatração (78). É expressa em células endoteliais ativadas por citocinas pró-inflamatórias e age como uma molécula de adesão. A molécula é regulada *in vivo* por agentes inflamatórios tais como: lipopolissacarídeos, interleucina-1, interferon (IFN- γ) e TNF- α (79).

A fractalcina e seu receptor (CX3CR1) foram relacionados ao desenvolvimento e progressão de lesões ateroscleróticas (80). Os níveis de fractalcina e CX3CR1 estão elevados na circulação e em placas ateroscleróticas na doença arterial coronariana. Além disso, observou-se que polimorfismos do gene CX3CR1 estão associados a eventos coronarianos (81). Como já foi dito anteriormente, a DRC está associada a uma condição inflamatória permanente o que pode levar a alterações na via fractalcina-CX3CR1 aumentando assim, o risco de DCV (80). Yadav e colaboradores (2011) observaram uma associação entre a espessura média-intimal e o aumento da população de linfócitos T CD4⁺CX3CR1⁺ e fractalcina plasmática em pacientes com DRC em estágio 3 e 4. Baseando-se nesses achados e na habilidade da fractalcina em induzir quimiotaxia e promover infiltração de leucócitos dentro da parede do vaso, sugeriu-se que a via fractalcina-CX3CR1 pode ser importante no desenvolvimento e/ou progressão da aterosclerose na DRC (82).

A fractalcina foi considerada um marcador plasmático da ativação inflamatória relacionada ao p-cresol. Um estudo revelou que p-cresol, em concentrações urêmicas, inibe a migração transendotelial de leucócitos e altera a expressão de fractalcina solúvel (83). Demonstrou-se ainda que, em processos inflamatórios ocorre a elevação dos níveis plasmáticos da fractalcina, aumento do seu mRNA, assim como aumento da expressão e função do receptor CX3CR1 em linfócitos (80).

1.4. Racional e hipóteses

A literatura mostra que os pacientes com DRC apresentam um estado inflamatório crônico e que isto está relacionado com eventos cardiovasculares. Novos marcadores vêm sendo implicados no agravamento do quadro da DRC, porém, o papel desses marcadores não foi bem explorado e ainda é conflitante. A análise de biomarcadores específicos deste processo e da resposta *in vitro*

ao estímulo de toxinas representa um avanço na compreensão da toxicidade urêmica relacionada à imunidade inata. Desta forma, o estudo de biomarcadores da resposta celular à toxicidade urêmica e o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na resposta imune inata da DRC podem auxiliar a estratificação dos pacientes sob o risco das complicações da DRC e também na identificação de vias específicas de resposta imune a DRC e em novos alvos de tratamento para potencialmente reduzir a mortalidade destes pacientes.

2. OBJETIVOS

Investigar a relação entre a concentração sérica de toxinas urêmicas, biomarcadores inflamatórios, biomarcadores de resposta à toxicidade urêmica e o impacto na estrutura e histologia de vasos de pacientes com DRC, bem como o risco de mortalidade em pacientes com DRC em fase pré-dialítica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a concentração plasmática das toxinas urêmicas p-cresil e indoxil-sulfato e ácido-3-indol acético em pacientes com DRC moderada a severa;
- Verificar a concentração plasmática de biomarcadores inflamatórios (resposta sistêmica, vascular, de apoptose) e biomarcadores resposta à toxicidade urêmica;
- Avaliar as correlações entre a TFG, os níveis de toxinas urêmicas e biomarcadores de resposta inflamatória sistêmica, vascular, de apoptose e específica da toxicidade urêmica;
- Avaliar associação de biomarcadores inflamatórios e de resposta a toxicidade urêmica em artérias (avaliação não invasiva e histológica) de pacientes com DRC;
- Avaliar o impacto das toxinas urêmicas e dos vários biomarcadores estudados no risco de mortalidade em pacientes com DRC.

3. DESENVOLVIMENTO

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob o parecer CEP nº 509 (ANEXO I) e parecer CEP nº 577 (ANEXO II). O consentimento informado foi obtido dos pacientes.

3.1 *Pacientes*

Este estudo tem duas coortes: para a análise de biomarcadores, caracterização de DCV e análise do risco de mortalidade, estudamos um grupo de pacientes com DRC em pré-diálise (coorte 1). Para a avaliação da expressão tecidual de biomarcadores em artérias, incluímos pacientes em estágio 5 da DRC submetidos a transplante renal. Os doadores de rim foram usados como controles (coorte 2). Informações detalhadas das coortes foram publicadas em outros estudos (84-86).

3.1.1 Pacientes com DRC em pré-diálise:

Sessenta e sete pacientes de nossa clínica de DRC foram incluídos no estudo. Os critérios de inclusão foram 18 anos ou mais, presença de DRC (proteinúria ou diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) em três avaliações consecutivas) e disponibilidade para participar do estudo. Os critérios de exclusão foram sinais de doença inflamatória ou infecciosa ativa (avaliada pela ausência de sinais clínicos de inflamação aguda), malignidade, terapia de reposição renal prévia ou real e o uso de drogas imunossupressoras. A TFG foi estimada pela fórmula simplificada de Modificação da Dieta na Doença Renal (MDRD) usando a média de duas determinações da concentração de creatinina.

3.1.2 Pacientes com DRC em transplante renal

Quatorze pacientes em estágios 5 da DRC e que foram submetidos a transplante renal de doador vivo foram incluídos no estudo. Seus doadores de rim serviram como grupo controle. Durante o transplante, segmentos ilíacos externos e artérias renais foram coletados dos pacientes com DRC e dos

controles, respectivamente. Os critérios de exclusão foram tabagismo, diabetes, doença inflamatória sistêmica e história ou sintomas de DCV antes do transplante. Ambos os grupos foram submetidos a uma triagem de DCV dentro de 3 meses do estudo, incluindo os biomarcadores séricos de risco CV, escore de Framingham, ecocardiograma de estresse ou cintilografia. Apenas os pacientes com baixo risco para eventos CV após a avaliação foram incluídos na análise.

3.2 Amostras de sangue

Na manhã da inclusão no estudo, amostras de sangue periférico foram coletadas em EDTA. Após a centrifugação, o plasma obtido foi dividido em alíquotas e armazenado a -80°C até a dosagem de toxinas urêmicas ou biomarcadores. Os pacientes foram classificados nos estágios 1-5 de acordo com as recomendações do KDIGO (6).

3.3 Determinação das concentrações plasmáticas de toxinas urêmicas ligadas à proteína

As concentrações plasmáticas totais das toxinas urêmicas p-cresil e indoxil-sulfato e ácido indol-3-acético foi realizada através do método de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com detecção fluorescente. Resumidamente, os plasmas foram processados conforme descrito (87). O ultrafiltrado foi injetado no sistema cromatográfico (Shimadzu Prominence Tokyo, Japão) equipado com um injetor manual modelo 7125 Rheodyne, uma bomba de quartzo (Shimadzu LC-20AD Tokyo, Japan) controlada pelo programa LC Solution (Shimadzu Tokyo, Japan) e equipada com detector de fluorescência Shimadzu RF-20 A. Definiu-se a fase móvel e os tempos de corrida necessários para a obtenção dos resultados após o processo de padronização, utilizando os compostos comerciais de indoxil-sulfato e ácido indol-3-acético e o composto sintetizado de p-cresil sulfato. Para identificação das toxinas urêmicas seguiu-se os métodos de protocolos já publicados (88-90). As toxinas foram separadas por uma coluna C8 (Phenomenex, Luna $5\mu\text{m}$, 100\AA , $150\times 4,6\text{mm}$), utilizando gradiente de concentração, eluída com 50mM de formiato de amônio, $\text{pH}=3,0$ e metanol variando entre 35% a 65%, com 0,7

mL/min de vazão. As toxinas urêmicas foram detectadas por fluorescência, e durante a corrida os comprimentos de onda foram alternados da seguinte forma: IS com comprimento de onda $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{emi} = 383$ nm até 6,5 minutos; pCS com comprimento de onda $\lambda_{exc} = 265$ nm e $\lambda_{emi} = 290$ nm de 6,51 a 10,0 minutos; e IAA com comprimento de onda $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{emi} = 383$ nm a partir de 10,01 minutos até o final da corrida, em 33 minutos.

3.4 Determinação das concentrações plasmáticas dos marcadores inflamatórios (IL-6, hsCRP, MCP-1, sICAM-1, sVCAM-1 e sFas)

Para avaliação do processo inflamatório em pacientes com DRC, foram analisados marcadores gerais de inflamação (IL-6, hsCRP), quimiocina de inflamação vascular (MCP-1), moléculas de adesão (sICAM, sVCAM) e marcador envolvido com a apoptose (sFas).

A avaliação da proteína C reativa de ultra sensibilidade (hsCRP) foi realizada em laboratório de análises clínicas, pela técnica de quimioluminescência (Immulite; DPC Biermann, Bad Nauheim, Alemanha). O intervalo de detecção para hsCRP e IL-6 foi de 0,175 a 1,100 mg/L e 0,5 a 1.500 pg/mL, respectivamente.

Os níveis plasmáticos de MCP-1, ICAM-1 solúvel (sICAM-1) e VCAM-1 solúvel (sVCAM-1) foram medidos por um ensaio imunoenzimático (ELISA) 'in house', utilizando anticorpos disponíveis comercialmente (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Isso possibilitou a redução significativa de custos dos experimentos através da compra. Desta forma, todos os anticorpos (captura, detecção e recombinante, marca R&D Systems), assim como as placas de ELISA (Nunc), Streptavidina (Zymed) e substrato cromogênico (TMB – Zymed) e demais reagentes necessários para a técnica foram adquiridos comercialmente. A realização de um ensaio de ELISA, "in house" requer uma série de cuidados técnicos, como por exemplo, experiências em análises laboratoriais, conhecimentos de técnicas de preparo de soluções e cálculos de concentração e de conceitos imunológicos e de estatística básicos.

As concentrações plasmáticas dos Fas solúveis (sFas) foram realizadas em outro laboratório de pesquisa, através de um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando um kit comercialmente disponível (OptEIA, PharMingen, San Diego,

CA, U.S.A.) de acordo com as instruções do fabricante.

3.5 Determinação das concentrações plasmáticas dos marcadores de resposta à toxicidade urêmica - UTRB - (sCD36, fractalcina e sRAGE)

Os níveis plasmáticos do CD36 solúvel (sCD36), fractalcina solúvel e RAGE solúvel (sRAGE) foram medidos por um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando um kit comercialmente disponível (Cusabio Technology® - Houston, TX, EUA para sCD36 e Quantikine® Immunoassay - R&D Systems, Minneapolis, MN., EUA para os outros biomarcadores). O intervalo de medição do sistema ELISA foi de 2,5 a 160 ng/mL para sCD36, 75 - 5000 pg/mL para sRAGE e 0,15 a 10 pg/mL para fractalcina. O CV intra-ensaio para sCD36, fractalcina, sRAGE foi de 7,5, 7,2 e 8,2%, respectivamente, e o inter-ensaio CV 7,0, 7,5 e 8,1%, respectivamente.

3.6 Imunohistoquímica (IHC) de artérias de pacientes com DRC e controles saudáveis

A presença de IL-6, MCP-1, CD36, fractalcina e receptor de fractalcina (CX3CR1) em tecido, foi avaliada em segmentos de artéria renal e ílaca de pacientes com DRC em estágio 5 e seus doadores, respectivamente. Durante o transplante, foram coletados os segmentos de artéria renal e ílaca e imediatamente fixados em formalina a 10%. Após 12 horas, os espécimes foram embebidos em parafina. As análises IHC foram realizadas no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Os tecidos embebidos em parafina foram seccionados, montados em lâminas, secos, deparafinados e reidratados. As secções foram incubadas com Imuno Retrifer (Dako™; Santa Clara, CA, EUA), em banho-maria por 30 min. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo monoclonal de camundongo (ABCAM - Cambridge, MA, EUA) para anticorpos anti-IL-6 e anticorpos policlonais de coelho (ABCAM - Cambridge, MA, EUA): anti-MCP-1, anti-CD36, anti-fractalcina ou anti CX3CR1 em uma câmara úmida a 2-8 ° C durante a noite. As secções foram incubadas com anticorpo secundário (Spring Reveal Complement; Spring Bioscience™; Fremont, CA, EUA), tratadas com complexo avidina biotina-peroxidase (Spring Reveal Conjugate; Spring

Bioscience™; Fremont, CA, EUA) e coradas com diaminobenzidina (DAB solução de substrato cromogênico - Dako™; Santa Clara, CA, EUA). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e montadas em resina histológica para microscopia (Entellan, Merck™). Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações. Para a análise morfológica, imagens representativas da expressão tecidual de IL-6, MCP-1, CD36, fractalcina e CX3CR1 foram capturadas com um Scanner Zeiss Axio Scan Slide (Alemanha) equipado com uma objetiva de 20X. As imagens foram otimizadas no software Adobe Photoshop CS6 v 13.0, removendo as áreas brancas. Vinte campos de *mediun-power* (MPF) foram selecionados aleatoriamente (ampliações de 200x) em cada lâmina. A fotomicrografia MPF de controle positivo foi escolhida como a “máscara”, que continha níveis adequados de sinal positivo de expressão tecidual e, em seguida, a máscara foi sobreposta às fotomicrografias das amostras. Com base no sinal de imunexpressão tecidual positivo ideal obtido, o *software* de análise de imagem Image-Pro Plus 4.5™ da Media Cybernetics™ (Rockville, MD, EUA) identificou as áreas positivas e transformou os resultados em área de imunexpressão tecidual positiva por micrômetro quadrado (μm^2). A área em μm^2 obtida foi dividida pela área total do MPF, gerando um valor percentual para cada imagem. Uma porcentagem média de área positiva foi determinada em 20 imagens MPF para cada lâmina.

3.7 Avaliação não invasiva de DCV aterosclerótica

O exame ecográfico de carótidas foi realizado na tarde do dia da coleta de sangue, para evitar a interferência nas flutuações diárias da inflamação. As artérias carótidas direita e esquerda foram examinadas com um *scanner duplex* de alta resolução (Apogee Plus; ATL-Phillips, Washington, DC, EUA) usando um transdutor linear de 5 a 10 MHz. Os sujeitos foram investigados em decúbito dorsal com a cabeça levemente virada para o ultra-sonografista, o qual realizou todas as varreduras. A parede distante das artérias carótidas comuns (CCA), 0,5-1,0 cm proximal ao início do bulbo carotídeo, foi usada para medições da espessura média-intimal (IMT) em cada lado em intervalos de 0,5 cm. O IMT foi definido como a distância entre a borda principal do lúmen-íntima

e a borda inicial do eco média-adventícia. As medidas foram sempre realizadas em segmentos arteriais sem placa. A camada íntima-média também foi analisada quanto à presença de formação de placa e história de DCV. A placa foi definida como uma área claramente identificada de espessura focal aumentada (>1 mm) da camada íntima-média.

3.8 Análise estatística e Análise de sobrevivência

Os resultados foram expressos como média \pm DP, mediana e intervalo ou frequência, conforme apropriado. A condição de normalidade das variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados de variáveis que não atenderam esta condição foram submetidos a uma transformação logarítmica. A comparação entre dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi realizada usando-se o teste *t* de Student para amostras independentes. Para a avaliação da correlação entre as variáveis quantitativas foram estimados os coeficientes de Pearson (*r*). Para estudar as associações de eTFG, os níveis plasmáticos de toxinas urêmicas ligadas à proteína, biomarcadores inflamatórios e UTRB com a presença de todas as causas de risco de mortalidade, após 5,2 anos de acompanhamento e ajuste para idade, sexo, diabetes e DCV, foram realizadas análises univariadas usando modelos de regressão de Cox e o teste de Wald, para avaliar a significância de co-variáveis. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram analisados com os programas estatísticos IBM SPSS v.20 (IBM SPSS, Inc., Chicago, IL) e STATA 14[®] (StataCorp, College, Station, TX, USA).

3.9 Captação de recursos e estruturação do laboratório

O presente projeto, submetido a órgão de fomento, foi contemplado em dois editais:

- Fundação Araucária: Programa de apoio à pesquisa básica e aplicada – Edital Universal FA 05/2011, Modalidade D, (R\$ 82.000,00);
- CNPq: Edital Universal CNPQ 014/2011 – Modalidade B, (R\$ 45.400,00)
- Total de recursos: R\$ 127.400,00.

Os recursos obtidos foram utilizados para compra de insumos de laboratório, reagentes como *kits* comerciais e anticorpos para determinação das dosagens por ELISA e imunohistoquímica. Além disso, foi adquirido um freezer -80°C e pipetas micrométricas.

4. ARTIGO

**THE IMPACT OF UREMIC TOXICITY INDUCED INFLAMMATORY
RESPONSE ON THE CARDIOVASCULAR BURDEN IN CHRONIC KIDNEY
DISEASE**

The Impact of Uremic Toxicity Induced Inflammatory Response on the Cardiovascular Burden in Chronic Kidney Disease

Ligia Maria Claro ¹, Andrea N. Moreno-Amaral ¹, Ana Carolina Gadotti ¹, Carla J. Dolenga ², Lia S. Nakao ², Marina L.V. Azevedo ¹, Lucia de Noronha ¹, Marcia Olandoski ¹, Thyago P. de Moraes ¹, Andréa E. M. Stinghen ² and Roberto Pécoits-Filho ^{1,*}

1 Graduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR 80215-901, Brazil; lmlclaro@gmail.com (L.M.C.); deamoreno@gmail.com (A.N.M.-A.); ana_raixu3@hotmail.com (A.C.G.); malu_tu@yahoo.com.br (M.L.V.A.); lno.noronha@gmail.com (L.d.N.); bio.estadistica@pucpr.br (M.O.); thyago.moraes@pucpr.br (T.P.d.M.)

2 Basic Pathology Department, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR 80050-540, Brazil; carla.vet10@gmail.com (C.J.D.); lia.nakao@ufpr.br (L.S.N.); andreastighen@ufpr.br (A.E.M.S.)

* Correspondence: r.pecoits@pucpr.br; Tel.: +55-41-999-826-800

Abstract: Uremic toxin (UT) retention in chronic kidney disease (CKD) affects biological systems. We aimed to identify the associations between UT, inflammatory biomarkers and biomarkers of the uremic cardiovascular response (BUCVR) and their impact on cardiovascular status as well as their roles as predictors of outcome in CKD patients. CKD patients stages 3, 4 and 5 (n = 67) were recruited and UT (indoxyl sulfate/IS, p-cresil sulfate/pCS and indole-3-acetic acid/IAA); inflammatory biomarkers [Interleukin-6 (IL-6), high sensitivity C reactive protein (hsCRP), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), soluble vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble Fas (sFas)] and BUCVRs [soluble CD36 (sCD36), soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE), fractalkine] was measured. Patients were followed for 5.2 years and all causes of death was used as the primary outcome. Artery segments collected at the moment of transplantation were used for the immunohistochemistry analysis in a separate cohort. Estimated glomerular filtration rate (eGFR), circulating UT, plasma biomarkers of systemic and vascular inflammation and BUCVR were strongly interrelated. Patients with plaque presented higher signs of UT-induced inflammation and arteries from CKD patients presented higher fractalkine receptor (CX3CR1) tissue expression. Circulating IS (p = 0.03), pCS (p = 0.007), IL-6 (p = 0.026), sFas (p = 0.001), sCD36 (p = 0.01) and fractalkine (p = 0.02) were independent predictors of total mortality risk in CKD patients. Our results reinforce the important role of uremic toxicity in the pathogenesis of cardiovascular disease (CVD) in CKD patients through an inflammatory pathway.

Keywords: uremic toxins; inflammatory biomarkers; sCD36; sRAGE; fractalkine (CX3CL1); fractalkine receptor (CX3CR1)

Key Contribution: The role of uremic toxicity in the pathogenesis of CVD in CKD patients through an inflammatory pathway

1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is the main cause of morbidity and mortality of chronic kidney disease (CKD) patients [1,2] and the high CVD risk cannot be fully explained by traditional risk factors (hypertension, diabetes, dyslipidemia) [2]. CKD specific risk factors have been described as 'missing links' that explain the high cardiovascular burden in CKD [3,4]. Uremic toxicity has been highlighted as a pivotal risk factor for CVD in CKD.

Uremic toxins (UTs) cause cell or system dysfunction, and experimental studies have described that the immune activation induced by several UTs [5,6,7,8] is associated with circulating UT levels and inflammatory biomarkers [5,8,9]. In order for us to understand the mechanisms relating the immuno-inflammatory response to uremic toxicity and its CVD consequences, we need a comprehensive approach to the UT analysis, circulating biomarkers of systemic and vascular inflammation, and particularly inflammatory mediators that capture the specific immune response to uremic toxicity.

We hypothesize that circulating UT [indoxyl sulfate (IS), p-cresyl sulfate (p-CS) and indole-3-acetic acid (IAA)] are associated with inflammatory [Interleukin-6 (IL-6), high sensitivity C-reactive protein (hsCRP)], and vascular inflammation [monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), soluble vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1), soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and soluble Fas (sFas)] biomarkers, including those particularly involved in mechanisms related to the cardiovascular response to specific uremic toxins [soluble CD36 (sCD36), soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) and fractalkine]. These biomarkers were previously described to be activated specifically by the UTs, oxidized LDL, advanced glycation end products (AGEs) and indoxil sulphate, respectively. In this study, these biomarkers will be named as biomarkers of the uremic cardiovascular response-BUCVR. In addition, we hypothesize that UT-induced inflammatory reaction leads to vascular structural and histological changes and to increased mortality risk. To advance in the understanding of mechanisms linking UT to cardiovascular (CV) burden in CKD, we aim to analyse the relationship between UTs, inflammatory biomarkers and BUCVRs and their association with atherosclerotic CVD and mortality risk in patients with moderate to severe CKD.

2. Results

The demographic, clinical and laboratory characteristics of chronic kidney disease (CKD) population of the study are shown in [Table 1](#).

Patients were divided according to the stages of CKD (1 to 5) and, most were in stage 3 (31%) and stage 4 (22%). Patients were taking angiotensin-converting enzyme inhibitors in 69% of the cases, diuretics in 57%, aspirin in 54% and statins in 13% of cases. No patients were in treatment with erythropoietin stimulants or vitamin D analogues.

Table 1. Main clinical and laboratory characteristics of the study population (cohort 1).

Patients, n	Analyzed Parameters				
	67				
Traditional risk factors	CKD 1 (n = 7)	CKD 2 (n = 15)	CKD 3 (n = 20)	CKD 4 (n = 16)	CKD 5 (n = 9)
Mean age \pm SD, years	45 \pm 16.7	54 \pm 11.2	61 \pm 11.2	56 \pm 14.9	61 \pm 8.7
Gender, % females	6	12	21	10	8
Race, % caucasians	9	17	28	22	14
Mean BMI \pm SD	29.6 \pm 5.3	28.2 \pm 3.7	28.4 \pm 4.0	28.4 \pm 4.5	28 \pm 6.1
Diabetes, %	3	9	12	9	3
Hypertension, %	3	12	19	15	8
CVD, %	9	13	15	10	6
Dyslipidemia, %	5	6	6	5	5
Smoking, %	2	3	3	2	3
LVH, %	-	6	6	9	3
Plaques, %	3	5	8	9	6
Primary Kidney Disease					
Diabetic nephropathy, %	3	9	9	5	5
Glomeruloesclerosis hypertensive, %	-	5	10	9	5
Chronic glomerulonephritis, %	6	2	2	5	-
Others and unknown, %	2	3	3	3	2
Laboratory Parameters					
GFR (CKD-EPI), mL/min	101.0	74.6	41.4	19.4	12.3
Median (range)	90.6–125	60.1–89	30–59.3	15–27.5	8.1–14.4
Proteinuria, mg/24 h	222.1	277.0	1091.0	879.0	3232.0
Albumin, mg/dL	4.2	4.0	3.8	3.8	3.8
Glucose, mg/dL	85.5	92.2	106.4	122.8	107.8
HDL cholesterol, mg/dL	47.6	41.0	44.4	38.2	39.7
LDL cholesterol, mg/dL	112.0	100	122	109.6	135.4
Triglycerides, mg/dL	175.1	217.2	168.2	202.3	191.1
Calcium, mg/dL	9.2	9.3	8.9	9.0	9.2
Phosphorus, mg/dL	3.3	3.7	3.7	4.3	5.0
Hemoglobin, g/dL	14.6	14.4	13.9	12.0	12.3

CVD = Cardiovascular disease, LVH = Left ventricular hypertrophy, BMI = Body mass index; GFR (CKD-EPI) = Glomerular filtration rate estimated by Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation, LDL = Low-density lipoprotein; HDL = High-density lipoprotein

The demographic, clinical and laboratory characteristics of CKD transplant recipients are shown in [Table 2](#).

Table 2. Main clinical and laboratory characteristics chronic kidney disease (CKD) transplant recipients (cohort 2).

Analyzed Parameters		
Traditional risk factors	Control group (<i>n</i> = 12)	CKD group (<i>n</i> = 14)
Mean age ± SD, years	41.6 ± 10.1	37.1 ± 13.1
Gender, % females	50	43
Mean BMI ± SD	24.7 ± 3.5	24.3 ± 3.2
Hypertension, %	0	100
Primary Kidney Disease		
Hypertensive nephrosclerosis, %	-	43
Chronic glomerulonephritis, %	-	43
Others and unknown, %	-	14
Laboratory Parameters		
Creatinine, mg/dL	0.8 ± 0.2	8.6 ± 3.2
Glucose, mg/dL	93 ± 17.2	112.0 ± 28.1
HDL cholesterol, mg/dL	50.1 ± 10.7	45.4 ± 17.4
LDL cholesterol, mg/dL	112 ± 28.2	114 ± 30.3
Calcium, mg/dL	9.1 ± 0.5	9.5 ± 0.9
Phosphorus, mg/dL	4.01 ± 1.0	5.8 ± 1.9
Hemoglobin, g/dL	13.5 ± 1.9	10.6 ± 1.5

BMI = Body mass index; LDL = Low-density lipoprotein; HDL = High-density lipoprotein.

Most patients (86%) were treated with hemodialysis before the transplantation and remaining were on peritoneal dialysis. The mean time on renal replacement therapy was 37 ± 8 months.

The overall results for UT, inflammatory biomarkers and BUCVR in the study population are described on [Table 3](#).

Table 3. Uremic toxins, Inflammatory biomarkers and BUCVR of the study population.

Analyzed Parameters	Mean ± SD	Median (Range)
Uremic Toxins		
IS, uM	15.8 ± 19.4	7.6 (1.1–100.5)
pCS, uM	91.5 ± 92.2	60.7 (0.9–501.0)
IAA, uM	0.80 ± 0.57	0.66 (0.06–3.28)
Inflammatory Biomarkers		
IL-6, pg/mL	4.91 ± 3.37	3.69 (0.67–11.0)
hsCRP, mg/L	5.18 ± 6.66	2.8 (0.30–39.9)
MCP-1, pg/mL	105.9 ± 31	102.9 (54.4 0–229.0)
sVCAM, ng/mL	806 ± 392	689 (378–1849)
sICAM, ng/mL	81 ± 14.5	80.8 (39.6–156.8)
sFas pg/mL	1339 ± 659	1253 (306–4181)
BUCVR		
sCD36, ng/mL	66.6 ± 34.4	60.9 (5.8–157.9)
sRAGE, pg/mL	2594 ± 1115	2552 (795–4827)
Fractalkine, ng/mL	1.30 ± 0.46	1.24 (0.27–2.42)

IS (indoxyl sulfate), pCS (para-cresyl sulfate), IAA (indole-3-acetic acid); IL-6 (Interleukin-6), hsCRP (High sensitivity C-reactive protein), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), sVCAM-1 (soluble vascular adhesion molecule-1), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1); BUCVR = biomarkers of the uremic cardiovascular response, sRAGE (soluble receptor for advanced glycation end products).

2.1. Correlations between eGFR and Uremic Toxins, Inflammatory Biomarkers and BUCVR

We observed a negative correlation between eGFR and UTs (IS, pCS and IAA) ([Figure 1a–c](#)). No significant correlations were observed between GFR and IL-6 and hsCRP. In contrast, we observed negative correlations between eGFR and biomarkers of vascular inflammation [MCP-1 ($r = -0.28$, $p < 0.05$), sVCAM-1 ($r = -0.35$, $p < 0.005$), sFas ($r = -0.49$, $p < 0.001$)] but not to sICAM-1. In addition, we observed strong correlations between eGFR and BUCVRs (sCD36 ($r = -0.86$, $p < 0.001$), sRAGE ($r = -0.44$, $p < 0.001$) and fractalkine ($r = -0.72$, $p < 0.001$) ([Figure 1d–f](#)).

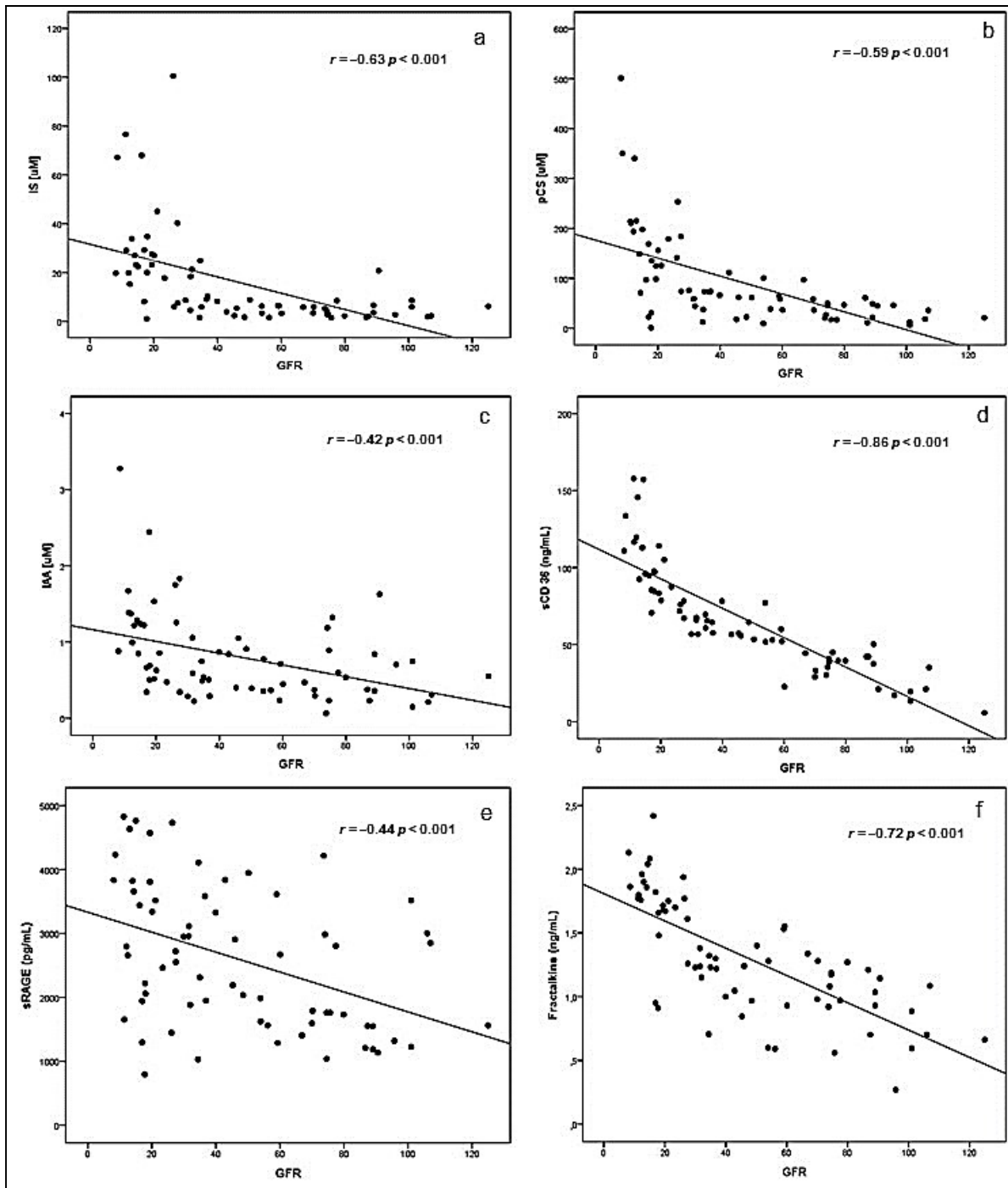


Figure 1. The scatter plots (a–c) show the relationship between the concentrations of UTs and glomerular filtration rate (GFR) in CKD patients in pre-dialysis. Similarly, the scatter plots (d–f) show the correlation with biomarkers of the uremic cardiovascular response and GFR.

2.2. Correlations between Plasma Levels Uremic Toxins, Inflammatory Biomarkers and BUCVR

In the analysis of inflammatory biomarkers, MCP-1 correlated positively with IS, pCS and IAA ($r = 0.38$; $r = 0.42$; $r = 0.29$; $p = 0.001$, $p < 0.001$ and $p = 0.015$, respectively). sVCAM-1 showed correlation with IS, pCS and IAA ($r = 0.29$; $r = 0.29$; $r = 0.27$; $p = 0.019$, 0.017 and 0.025 respectively). IL-6, hsCRP and sICAM-1 were not correlated with any of the UTs. sFas showed positive correlations with IS ($r = 0.39$; $p = 0.001$) and pCS ($r = 0.46$; $p < 0.001$) but no significant correlations with IAA ([Table 4](#)).

Table 4. Correlations between uremic toxins and inflammatory biomarkers.

	IS		pCS		IAA	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
IL-6, pg/mL	0.13	0.29	0.236	0.055	0.078	0.53
hsCRP, mg/L	0.10	0.42	0.024	0.84	0.020	0.87
MCP-1, pg/mL	0.38	0.001	0.42	<0.001	0.29	0.015
sVCAM, ng/mL	0.29	0.019	0.29	0.017	0.27	0.025
sICAM, ng/mL	0.047	0.71	0.12	0.34	0.087	0.48
sFas, pg/mL	0.41	0.001	0.46	<0.001	0.19	0.13

IL-6 (Interleukin-6), hsCRP (High sensitivity C-reactive protein), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), sVCAM-1 (soluble vascular adhesion molecule-1), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), IS (indoxyl sulfate), pCS (para-cresyl sulfate), IAA (indole-3-acetic acid).

sCD36 presented a moderate correlation with IS, pCS and IAA ($r = 0.62$; $r = 0.55$, $r = 0.52$; $p < 0.001$ respectively). Fractalkine had a strongly positive correlation with IS and pCS ($r = 0.77$; $p < 0.001$ for both). There was no significant correlation between IAA and biomarker sRAGE ($r = 0.20$; $p = 0.108$). For other BUCVRs, the IAA showed a weak correlation ([Table 5](#)).

Table 5. Correlations between uremic toxins and BUCVR.

	IS		pCS		IAA	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
sCD36, ng/mL	0.62	<0.001	0.55	<0.001	0.52	<0.001
sRAGE, pg/mL	0.48	<0.001	0.48	<0.001	0.20	0,108
Fractalkine, ng/mL	0.77	<0.001	0.77	<0.001	0.41	<0.001

BUCVR (biomarkers of the uremic cardiovascular response), UTs (uremic toxin), IS (indoxyl sulfate), pCS (para-cresyl sulfate), IAA (indole-3-acetic acid), sRAGE (soluble receptor for advanced glycation end products).

There was no significant difference between plasma levels of inflammatory biomarkers (hsCRP, MCP-1, sVCAM-1 and sICAM-1) and BUCVR in patients with or without the following comorbidities: diabetes, obesity, hypertension, dyslipidemia, history of CVD and smoking. On the other hand, we observed a significant difference between IL-6 plasma levels and CVD ($p = 0.036$). We also found no differences between race and gender.

[Table 6](#) shows correlations between plasma levels of inflammatory biomarkers and BUCVR. We also observed that MCP-1 had a positive correlation with IL-6 ($r = 0.36$, $p = 0.003$), sVCAM-1 ($r = 0.41$, $p = 0.001$) and all BUCVRs while, sICAM-1 correlated only with hsCRP ($r = 0.37$, $p = 0.002$). sFas correlated positively with all BUCVRs but not with the inflammation markers. With respect to BUCVR, we observed that only sCD36 correlated positively with sVCAM-1. BUCVRs had a significant correlation between each other; however, the relation was the strongest between sCD36 and Fractalkine ($r = 0.73$, $p < 0.001$).

Table 6. Correlations between inflammatory biomarkers (IL-6, hsCRP, MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1, sFas) and BUCVR (sCD36, sRAGE, Fractalkine).

	MCP-1		sICAM		sCD36		sRAGE		Fractalkine	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
IL-6, pg/mL	0.36	0.003	NS		NS		NS		NS	
hsCRP, mg/L	NS		0.37	0.002	NS		NS		NS	
MCP-1, pg/mL	-		NS		0.30	0.015	0.28	0.022	0.38	0.002
sVCAM, ng/mL	0.41	0.001	NS		0.33	0.006	NS		NS	
sICAM, ng/mL	NS		-		NS		NS		NS	
sFas, pg/mL	NS		NS		0.47	<0.001	0.39	0.001	0.43	<0.001
sCD36, ng/mL	0.30	0.015	NS		-		0.42	<0.001	0.73	<0.001
sRAGE, pg/mL	0.28	0.022	NS		0.42	<0.001	-		0.50	<0.001
Fractalkine, ng/mL	0.38	0.002	NS		0.73	<0.001	0.50	<0.001	-	

IL-6 (Interleukin -6), hsCRP (High sensitivity C-reactive protein), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), sVCAM-1 (soluble vascular adhesion molecule-1), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1), BUCVR (biomarkers of the uremic cardiovascular response). NS (Not significant).

2.3. Tissue Expression of Inflammatory Biomarkers and BUCVR in Human Renal Arteries

No statistical difference was observed upon comparing the tissue expression of inflammatory biomarkers (IL-6, MCP-1) and BUCVR (CD36, fractalkine) between human renal arteries of CKD transplant recipients and donor (control). In contrast, we observed that CKD transplant recipient group showed stronger tissue expression for CX3CR1 ($p = 0.002$) when compared to the donor samples ([Figure 2](#)).

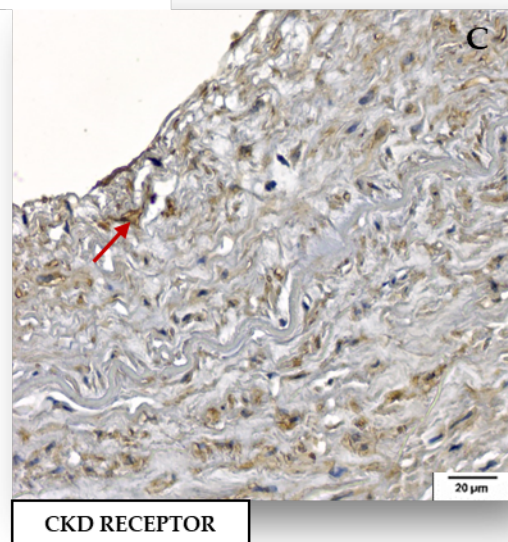
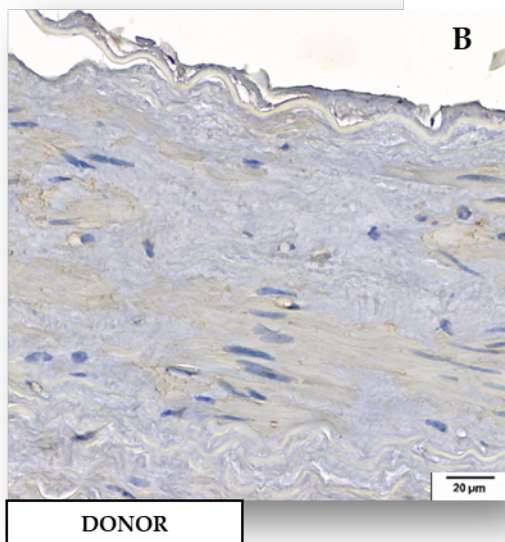
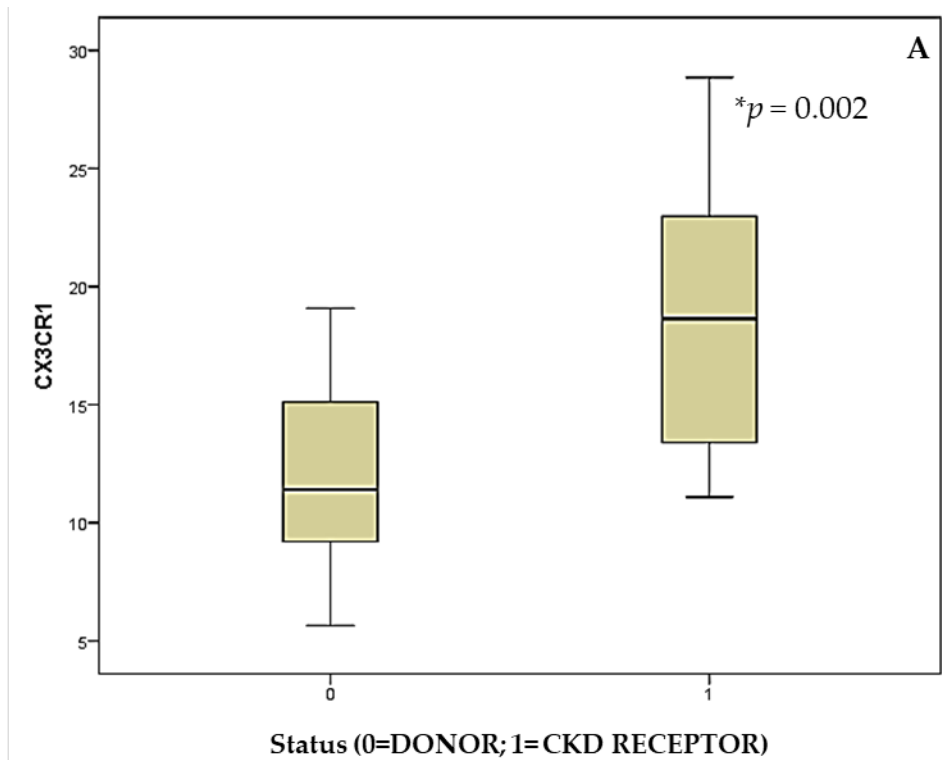


Figure 2. (A) Graph with the total percentage (%) of tissue expression of fractalkine receptor (CX3CR1) by immunohistochemistry (IHC). * $p = 0.002$, significant difference between donor and CKD receptor tissue expression of CX3CR1; t Student ($p < 0.05$). Demonstrative images showing the negative (B) and immunopositivity (C) (red arrow) tissue expression of CX3CR1 for medium power field (200 \times), in the renal arteries.

2.4. Comparisons between Plasma Levels Uremic Toxins, Inflammatory Biomarkers, Vascular Inflammation, BUCVR in Patients with and without Carotid Artery Plaques

The t-test comparing cases with and without atherogenic plaque relative to UT, inflammatory biomarkers, vascular inflammation and BUCVR showed a statistically significant difference only for sCD36 ($p = 0.049$) ([Table 7](#)).

Table 7. Comparing cases with and without plaques with respect to uremic toxins, inflammatory biomarkers and BUCVR.

		PLAQUES		P
		No (n = 44)	Yes (n = 20)	
UT	IS, uM	16.6 ± 21.3	14.9 ± 16.0	0.957
	pCS, uM	74.9 ± 66.1	113 ± 96.5	0.160
	IAA, uM	0.75 ± 0.47	0.92 ± 0.77	0.378
Inflammatory Biomarkers	IL-6, pg/mL	4.4 ± 3.1	5.9 ± 3.6	0.106
	hsCRP, mg/L	5.1 ± 7.5	5.3 ± 4.6	0.921
	MCP-1, pg/mL	102.9 ± 27.9	113.4 ± 36.3	0.212
	sVCAM-1, ng/mL	772.7 ± 341.1	884.1 ± 480.4	0.293
	sICAM-1, ng/mL	81.0 ± 9.5	82.2 ± 22.3	0.762
	sFas, pg/mL	1418.8 ± 694.8	1224.0 ± 584.7	0.289
BUCVR	sCD 36, ng/mL	61.0 ± 30.2	79.1 ± 40.1	0.049
	sRAGE, pg/mL	2661 ± 1108	2508 ± 1129	0.611
	Fractalkine, ng/mL	1.25 ± 0.45	1.40 ± 0.45	0.223

UT (uremic toxin), IS (indoxyl sulfate), pCS (para-cresyl sulfate), IAA (indole-3-acetic acid); IL-6 (Interleukin-6), hsCRP (High sensitivity C-reactive protein), MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), sVCAM-1 (soluble vascular adhesion molecule-1), sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1); sRAGE (soluble form receptor for advanced glycation end products), BUCVR (biomarkers of the uremic cardiovascular response); Mean ± SD; Test *t* Student ($p < 0.05$).

2.5. Survival Analysis According to eGFR, Plasma Levels Uremic Toxins, Inflammatory Biomarkers and BUCVR

The survival analysis shows the relationship between independent co-variables and clinical outcomes in CKD patients of the study ([Figure 3](#)). After 5.2 years of follow-up, twenty-two patients presented a composite cardiovascular event, which included total cardiovascular mortality, non-fatal myocardial infarction (MI), revascularization, amputation or non-fatal stroke. After follow-up and adjustments for age, sex, diabetes and CVD we observed that lower eGFRs were associated with increased mortality (HR 1.03, IC 95% 1.010–1.060; $p = 0.02$). The highest serum levels of IS (HR 1.02, IC 95% 1.001–1.040; $p =$

0.03), pCS (HR 1.005, IC 95% 1.001–1.010; $p = 0.007$), IL-6 (HR 1.20, IC 95% 1.02–1.40; $p = 0.026$), sFas (HR 1.002, IC 95% 1.003–1.40; $p = 0.001$), sCD36 (HR 1.02, IC 95% 1.004–1.030; $p = 0.01$) and fractalkine (HR 3.98, IC 95% 1.20–13.18; $p = 0.02$) were associated with an increased risk of mortality. On the other hand, hsCPR, MCP-1, sVCAM-1, sICAM-1, sRAGE and IAA were not independent or significant predictors of fatal events in the study population.

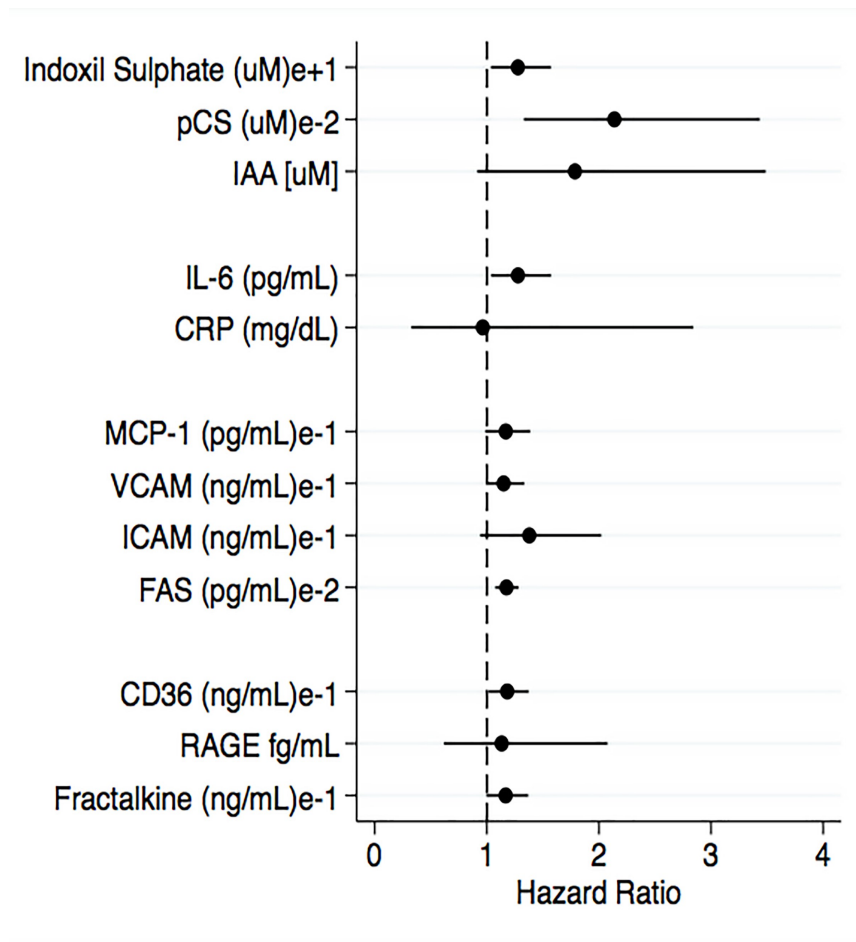


Figure 3. Cox regression univariate analysis for evaluating the relationship between independent co-variables and clinical outcomes in CKD patients of the study.

3. Discussion

The association between general inflammatory markers and poor outcomes in CKD has been consistently described, but the role of inflammatory pathways linking uremic toxicity to CVD is largely unknown [10]. Here we studied a population with moderate to advanced CKD and described (1) strong correlations between eGFR, circulating uremic toxins, serum biomarkers of systemic and vascular inflammation and BUCVR (2) evidence of the impact of inflammation triggered by uremic toxicity in arteries (both in a non-invasive evaluation and also in tissue) of CKD patients; and (3) that several biomarkers of uremic toxicity and inflammation were associated with mortality in patients with moderate to severe CKD.

In agreement with previous studies [9,11,12,13], we observed that UT accumulated in the circulation of CKD patients as kidney function declines. Similarly, MCP-1, sVCAM-1, sFas and several BUCVR are all correlated negatively with eGFR. These correlations have been described in previous isolated studies, however, our study was the first to concomitantly describe the associations between eGFR and UT, inflammatory biomarkers and vascular inflammation, and the first to describe BUCVR in relation to kidney function. We previously observed not only relationships between renal function and various inflammatory biomarkers [14], but also an increased expression of this inflammatory molecules by endothelial cells in vitro [15]. The present results support the hypothesis that uremic toxicity, inflammation and vascular response are interrelated processes.

In the current study, the correlation between IS, p-CS and IAA levels and the biomarkers of systemic inflammation, namely C-reactive protein (CRP) and IL6 contrasts with a previous study [8] that found that IS and p-CS correlated significantly with IL-6 in stages 3 and 4 CKD patients. Also, Dou et al. [16] found a significant positive correlation between IAA and CRP. On the other hand, IS, p-CS and IAA correlated positively with MCP-1 and sVCAM-1 in the present study. These results corroborate the concept that UT, mainly IS and p-CS, mediate an increased MCP-1 expression, and this could present a possible mechanism for the induction of vascular pro-inflammatory phenotype observed in CKD [5]. Another important observation of the present study is the significant correlation between UT (IS, p-CS) and sFas. This corroborates with the information that sFas has been defined as a marker of inflammation and endothelial dysfunction in adults with coronary artery disease and CKD [17,18].

To the best of our knowledge, this is the first study demonstrating a relationship between UT and BUCVR. We observed that plasma levels of two UTs analyzed (IS, p-CS),

showed a positive correlation with sCD36, sRAGE and fractalkine. Until now, little is known about the impact of UTs on immune cells and chronic inflammatory responses that can accelerate the development and progression of CVD in CKD patients. A recent study, demonstrated that IS, but not p-CS, induces the secretion of fractalkine by human monocytes, a CX3CR1-specific chemokine ligand, which is highly expressed in lymphocytes [19]. Increased concentrations of sCD36 in CKD patients is another example of the uremia-related immune dysfunction. Previous studies have demonstrated that the ox-LDL, inflammatory chemokines and cytokines induce CD36 expression in CKD [20,21]. UTs (mainly IS and p-CS) are implicated in the pathogenesis of atherosclerosis as well as non-atherosclerotic vascular diseases commonly found in the CKD setting [22]. Kashiwama and colleagues (2015) show that plaque volume was significantly greater in CKD 4–5 than in other stages and that CKD stage is an independent predictor of plaque progression [23]. This is explained by the uremic milieu that promotes endothelial dysfunction and increased serum levels of inflammatory markers that play an important role in the development of atherosclerosis [24]. Under these conditions, levels of cell adhesion molecules, such as ICAM-1 and VCAM-1, promote monocyte infiltration into the activated endothelium [25,26]. High levels of CD36 could promote atherogenesis through enhanced ox-LDL clearance and, consequently, through foam cell formation [20]. Higher concentration of CD36 in patients with atherosclerotic plaques supports the hypothesis that this biomarker has pro-atherogenic properties. On other hand, there was no difference between the UTs, fractalkine and sRAGE with presence or absence of plaque. Similarly, in a previous study fractalkine and its receptor (CX3CR1) were increased in circulation as well as in atherosclerotic plaque in coronary artery disease [27], providing a potential link between uremic toxicity and accelerated atherogenesis. Reinforcing this information, through IHC of renal arteries we observed that CKD transplant recipients group showed stronger CX3CR1 tissue expression when compared to the donor samples. Unfortunately, it's not possible to know precisely which cells types are expressing CX3CR1 in [Figure 2](#) but, the literature shows that CX3CR1 is mainly expressed in T lymphocytes, monocytes, natural killer cells and mast cells [28]. In addition, intimal smooth muscle cells in atherosclerotic vessels and stimulated endothelial cells also express CX3CR1 [29].

In recent meta-analysis, involving patients with CKD stage 3 and above, the authors concluded that elevated levels of p-CS and IS are associated with increased mortality in patients with CKD corroborating with our study that shows an impact of uremic toxicity, inflammation and CKD disease. p-CS, but not IS, is associated with an increased risk of CV events [30]. Dou et al (2015) observed that IAA serum levels were a significant

predictor of mortality and cardiovascular events [16]. In disagreement with these findings, our results showed that IAA was not a significant predictor of fatal events in the study population. Similar to protein-bound UTs, higher serum levels of IL-6, sFas, sCD36 and fractalkine were associated with increased risk of mortality. In a different CVD setting, a study assessed fractalkine plasma levels in 349 patients with advanced systolic heart failure. The authors observed over a median follow-up of 4.9 years that fractalkine was a significant predictor of all-cause mortality [31]. Like a fractalkine, sCD36 was also considered a predictor of CV mortality, since sCD36 concentration in dialysis patients were at increased risk of 3-year cardiovascular mortality, as compared to the rest of the cohort [20]. We observed that sRAGE was not a significant predictor of fatal events in the study population, in contrast to previous findings that showed elevated sRAGE levels associated with adverse outcomes in patients with CKD [32,33]. In addition, high levels of circulating sRAGE were associated with worse kidney function and increased risk in CKD progression [34].

There are some limitations of the present study. First, our cohort was relatively small and several patients lost to follow up and data should be confirmed in larger CKD populations with a standardized follow up, particularly powered for the survival analysis. Secondly, we did not measure free concentrations of IS and p-CS. Liabeuf et al. (2010) observed that total p-CS levels and free fraction are higher in advanced stage CKD patients, but only free fraction was associated with mortality in these patients [12]. In addition, it can be speculated that the influence of p-CS and IS concentration on overall mortality among CKD patients is more likely to be a group effect for protein-bound solutes as a whole. Furthermore, evidence of increased risk should be reproduced in multiple groups of CKD patients and in a wide range of clinical settings. Thirdly, we measured sRAGE individually, however, ideally the levels of sRAGE should be considered in conjunction with plasma levels of AGEs. In the literature, the lack of consistent association of AGE/RAGE pathway with CKD and its complications, may reflect difficulties in measuring AGE products. Immunologic techniques such as ELISA have been employed more commonly but are much less specific, capturing molecules other than the target [35]. In conclusion, we described several associations between eGFR, circulating UTs, serum biomarkers of systemic and vascular inflammation and BUCVR. We also observed a modest impact of inflammation potentially triggered by uremic toxicity in arteries (both in a non-invasive evaluation-observed specifically for CD36 as well as in tissue—particularly related to CX3CR1) and its association with mortality (taking into consideration the limitations imposed by the potential lack of power of the survival analysis) in this group of

CKD patients. Our results reinforce the important role of uremic toxicity in the pathogenesis of CVD in CKD patients through an inflammatory pathway.

4. Materials and Methods

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Paraná (Curitiba, Brazil) under registration numbers CEP/PUCPR 509 (approved on 1 June 2005) and CEP/PUCPR 577 (approved on 6 April 2005), respectively and informed consent was obtained from all patients recruited. Detailed information of these cohorts has been published elsewhere [[15,36,37](#)].

4.1. Subjects

4.1.1. Pre-Dialysis CKD Patients

For the analysis of biomarkers, characterization of CVD and analysis of mortality risk, 67 patients from our CKD clinic were included (cohort 1). Inclusion criteria were age >18 years old, presence of CKD (proteinuria or decreased glomerular filtration rate-GFR in 3 consecutive evaluations) and willingness to participate in the study. Exclusion criteria were active inflammatory or infectious disease, malignancy and use of immunosuppressive drugs ([Figure 4](#)). GFR was estimated by CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation [[38](#)]. Diabetes was defined according to a medical history of diabetes, use of hypoglycemic agents or compatible levels of fasting glycemia or HbA1C. Hypertension was defined according to a medical history of hypertension or the use of anti-hypertensive agents at the visit. Cardiovascular disease was defined according to a history of a previous stroke, myocardial infarction or amputation. LVH was documented when the patients presented an echocardiogram reporting LVH. Smoking was defined as previous or present history of smoking any number of tobacco product.

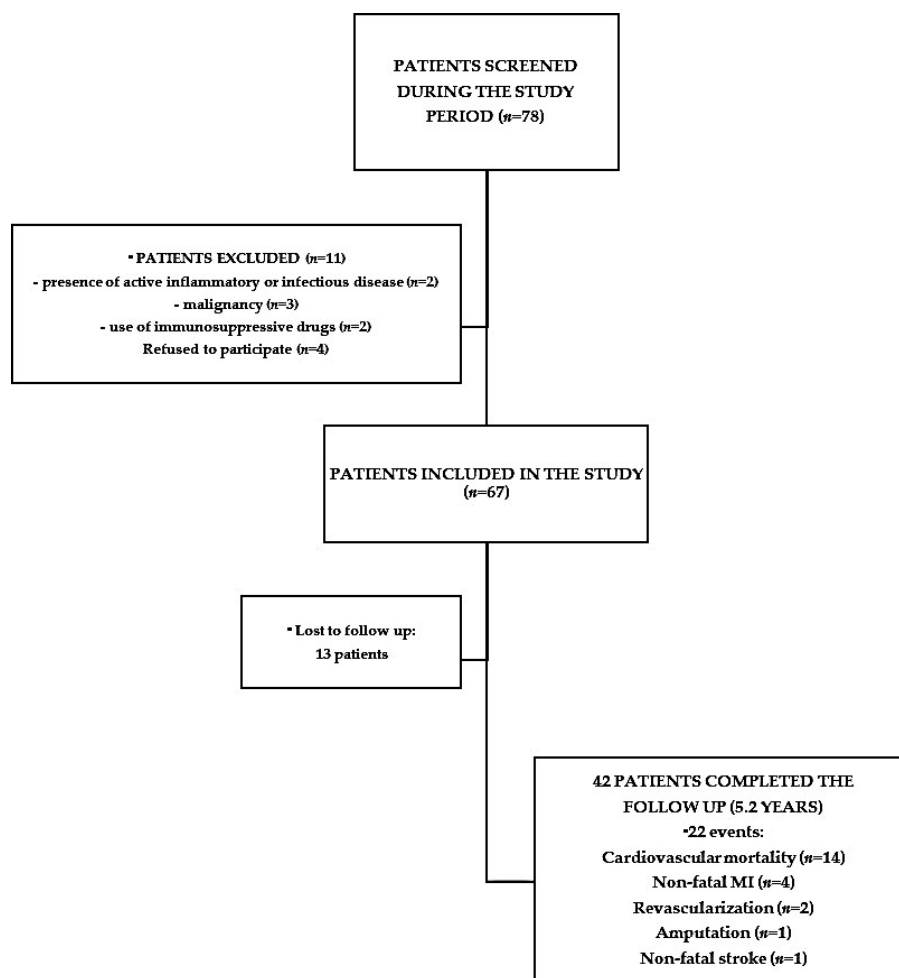


Figure 4. Flow chart of the study.

4.1.2. CKD Transplant Recipients

For the evaluation of the tissue expression of biomarkers in arteries, 14 stage 5 CKD patients who underwent a living donor renal transplantation (cohort 2) were included. Their kidney donors served as the control group. Exclusion criteria included smoking, diabetes, systemic inflammatory disease and history or symptoms of CVD prior to the transplantation. Both groups underwent CVD screening within 3 months of the study, including serum biomarkers of CV risk, Framingham score, stress echocardiogram, or scintigraphy. Only patients with low risk for CV events after the evaluation were included in the analysis.

4.2. Material

4.2.1. Blood Sampling

Peripheral blood samples from patients with pre-dialysis CKD were collected in EDTA. After centrifugation (15 mins, 1200× g, 18 °C), the obtained plasma was divided into aliquots and stored at –80 °C until analysis of UT or biomarkers. Patients were classified in stages 1–5 according to the KDIGO recommendations [39].

4.2.2. Renal Arteries Samples

During kidney transplantation, external iliac and renal artery segments were collected from CKD patients and controls, respectively, and were immediately fixed in 5 mL of 10% formalin. After an overnight period, specimens were embedded in paraffin.

4.2.3. Clinical and Biochemical Characteristics of the Patients (Cohort 1)

Data regarding anthropometry, age, gender, primary kidney disease, smoking habit, history of dyslipidemia, diabetes mellitus, hypertension and clinically detected cardiovascular disease (coronary heart disease, cerebrovascular disease, peripheral vascular disease and heart failure) were recorded by a detailed analysis of medical records, patient interview and physical examination. Biochemical parameters were measured by colorimetric methods (Cobas Mira Plus; Roche, Montclair, NJ, USA).

4.3. Measurement of Plasma Levels of Uremic Toxins

Total concentrations of UTs pCS, IS and IAA were quantified by HPLC method (High Performance Liquid Chromatography) with fluorescent detection. The ultrafiltered plasma was injected into HPLC system (Shimadzu Prominence, Tokyo, Japan) equipped with a manual injector model 7125 Rheodyne, a quaternary pump (Shimadzu LC-20AD, Tokyo, Japan), controlled by LC Solution software (Shimadzu, Tokyo, Japan) and equipped with a fluorescence detector Shimadzu RF-20A. Identification of UTs followed the protocols of the published methods [17,18]. The toxins were separated by a C8 column (Phenomenex,

Luna 5 μ m, 100A, 150 \times 4.6 mm) using concentration gradient eluted with 50 mM ammonium formate pH 3.0 and methanol whose proportion increased from 35% to 70% along the run, at a flow rate of 0.7 mL/min. During the run, the fluorescence wavelengths varied as follows: λ_{exc} = 280 nm and λ_{em} = 383 nm to IS and IAA, λ_{exc} = 265 nm and λ_{em} = 290 nm to pCS.

4.4. Measurement of Plasma Levels of Inflammatory Biomarkers (IL-6, hsCRP, MCP-1, sICAM-1, sVCAM-1 and sFas)

General markers of inflammation (IL-6, hsCRP), vascular inflammation chemokine (MCP-1), adhesion molecules (sICAM, sVCAM) and cell death marker (sFas) were analyzed. The IL-6 concentration was performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercially available kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Ultra-high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) concentration was performed by the chemoluminescence technique (Immulite; DPC Biermann, Bad Nauheim, Germany). The concentration range to IL-6 and hsCRP were 0.5–1.500 pg/mL and 0.175–1.100 mg/L, respectively.

Plasma concentration of MCP-1, soluble ICAM-1 (sICAM-1) and soluble VCAM-1 (sVCAM-1) were measured by ELISA using commercially available antibodies. The chemokines concentrations (pg/mL) and soluble adhesion molecules (ng/mL) were calculated against standard curves obtained using the corresponding recombinant molecules. The measuring range was 31.25–2.000 pg/mL for MCP-1 and 0.03–2 ng/mL for sICAM-1 and sVCAM-1. The intra-assay coefficients of variation (cv) for MCP-1, sICAM-1 and sVCAM-1 were 6.0%, 7.9% and 8.2%, respectively, and the inter-assay cv 6.2, 7.7% and 8.1%, respectively. Soluble Fas (sFas) was measured by ELISA using commercially available kit (OptEIA, PharMingen, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The lower limit of detection for sFas was 8 pg/mL.

4.5. Biomarkers of the Uremic Cardiovascular Response (BUCVR)-sCD36, Fractalkine and sRAGE Plasma Levels

BUCVRs were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercially available kit (Cusabio Technology[®]-Houston, TX, USA for sCD36 and Quantikine[®] Immunoassay-R&D Systems, Minneapolis, MN, USA for fractalkine and

sRAGE). The ELISA system measuring range was 2.5–160 ng/mL for sCD36, 75–5000 pg/mL for sRAGE and 0.15–10 pg/mL for fractalkine. The intra-assay cv for sCD36, fractalkine, sRAGE were 7.5%, 7.2% and 8.2%, respectively, and the inter-assay cv 7.0%, 7.5% and 8.1% respectively.

4.6. Histology and Immunohistochemistry (IHC) of Arteries from CKD Patients and Healthy Controls

Serial sections of external iliac and renal artery segments from stage 5 CKD patients and donor controls, respectively, were deparaffinized and rehydrated for routine IHC. Antigen retrieval was made by incubation with Immuno Retrival (Dako™; Santa Clara, CA, USA), in a water bath for 30 min. To detect IL-6 (monoclonal mouse anti-IL-6 antibody [ABCAM-Cambridge, MA, USA]); MCP-1, CD36, fractalkine and fractalkine receptor (CX3CR1) (polyclonal rabbit anti-MCP-1, -CD36, -fractalkine and, -CX3CR1 antibodies [ABCAM-Cambridge, MA, USA]) sections were incubated in a humid chamber at 2–8 °C overnight. After incubation with a secondary antibody (Spring Reveal Complement; Spring Bioscience™; Fremont, CA, USA), the sections were treated with an avidin-biotin-peroxidase complex (Spring Reveal Conjugate; Spring Bioscience™; Fremont, CA, USA) and colored with diaminobenzidine (1:1; DAB chromogen-substrate solution-Dako™; Santa Clara, CA, USA). The slides were counterstained with Harris hematoxylin and were mounted in histological resin for microscopy (Entellan, Merck™, Kenilworth, NJ, USA). Positive and negative controls were included in all reactions.

For the morphometric analysis, representative images of tissue expression of all biomarkers studied were captured with a Zeiss Axio Scan Slide Scanner (Carl Zeiss, Jena, Germany). Images were optimized in Adobe Photoshop CS6 V13.0 software, by removing the white areas. Twenty randomly selected medium-power fields (200× magnifications) in each slide were captured. The positive control MPF photomicrography was chosen as the “mask”, which contained adequate levels of positive tissue expression signal and was subsequently superimposed to the samples photomicrographs. Based on the ideal positive tissue immune expression signal obtained, the image analysis Image-Pro Plus 4.5™ of Media Cybernetics™ (Rockville, MD, USA) identified the positive areas and transform these results into positive tissue immune expression area per square micrometer (μm^2). The area in μm^2 obtained was divided by the total area of the MPF, thus generating a

percentage value for each image. An average percentage of positive area was determined in 20 MPF images for each slide.

4.7. Non-Invasive Evaluation of Atherosclerotic CVD

Carotid ultrasonographic examination was performed in the afternoon of the day of blood collection, to avoid interference from daily fluctuations of inflammation biomarkers. The right and the left carotid arteries were examined with a high-resolution duplex scanner (Apogee Plus; ATL-Phillips, Washington, DC, USA) using a 5- to 10-MHz linear array transducer. The subjects were examined in dorsal decubitus with the head slightly turned to the sonographer. All the evaluations were performed by the same trained sonographer. The distal wall of the common carotid arteries (CCA), 0.5–1.0 cm proximal to the beginning of the carotid bulb, was used to determine the intima-media thickness (IMT) on each side at 0.5-cm intervals. The IMT was defined as the distance between the leading edge of the lumen-intima echo and the leading edge of the media-adventitia echo. Measurements were always performed on arterial segments without plaque. The intima-media layer was analyzed for the presence of plaque formation and CVD history. Plaque was defined as a clearly identified area of focal increased thickness (>1 mm) from the intima-media layer.

4.8. Cardiovascular Events during the Follow Up

For the analysis of predictors of cardiovascular events during the follow up, total cardiovascular mortality, non-fatal MI, revascularization, amputation or non-fatal stroke. This information was obtained by a detailed analysis of medical records and patient interview (including telephone contacts for confirmation). Patients who lost to follow up were censored.

4.9. Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm SD, median and range or frequency. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of the quantitative variables. Variables that did not meet this condition underwent a logarithmic transformation. Student t-test for independent samples was used for comparison between two groups in relation to quantitative variables. Pearson's coefficients (r) was used for estimating correlation between quantitative variables. To examine the associations of eGFR, UT plasma levels,

inflammatory biomarkers and BUCVR with all causes mortality risk after 5.2 years of follow-up and adjustment for age, sex, diabetes and CVD, univariate analyses were performed using the Cox regression model and the Wald test, for assessing the significance of co-variables. p values < 0.05 were considered statistically significant. Data were analyzed with the computer program IBM SPSS v.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and STATA 14[®] (StataCorp, College Station, TX, USA).

Author Contributions

L.M.C., A.C.G., C.J.D. and M.L.V.A. carried out the experiments. L.M.C., A.N.M.-A., L.S.N. and L.d.N. provided advice on the experiment and supported the interpretation of results. M.O. and T.P.d.M. performed the statistical analysis. L.M.C., A.N.M.-A., A.E.M.S. and R.P.-F. drafted and edited the manuscript for publication. R.P.-F. was responsible for supervising the study and coordinating the research activities. All authors read and approved the content of the manuscript.

Funding

This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 483632/2011-12 and Fundação Araucária, grant number 202/2012-23715.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Go, A.S.; Chertow, G.M.; Fan, D.; McCulloch, C.E.; Hsu, C.Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1296–1305.
2. Lekawanvijit, S.; Krum, H. Cardiorenal syndrome: Acute kidney injury secondary to cardiovascular disease and role of protein-bound uraemic toxins. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 3969–3983.
3. Jourde-Chiche, N.; Dou, L.; Cerini, C.; Dignat-George, F.; Brunet, P. Vascular incompetence in dialysis patients--protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. *Semin. Dial.* **2011**, *24*, 327–337.
4. Stenvinkel, P.; Ketteler, M.; Johnson, R.J.; Lindholm, B.; Pecoits-Filho, R.; Riella, M.; Heimbürger, O.; Cederholm, T. Girndt, M. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: Central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* **2005**, *67*, 1216–1233.
5. Borges, N.A.; Barros, A.F.; Nakao, L.S.; Dolenga, C.J.; Fouque, D.; Mafra, D. Protein-Bound Uremic Toxins from Gut Microbiota and Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease. *J. Ren. Nutr.* **2016**, *26*, 396–400.
6. Ito S, Yoshida M. Protein-bound uremic toxins: New culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Toxins* **2014**, *6*, 665–678.
7. Moradi, H.; Sica, D.A.; Kalantar-Zadeh, K. Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Nephrol.* **2013**, *38*, 136–148.
8. Rossi, M.; Campbell, K.L.; Johnson, D.W.; Stanton, T.; Vesey, D.A.; Coombes, J.S.; Weston, K.S.; Hawley, C.M.; McWhinney, B.C.; Ungererf, J.P.J.; et al. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: A cross-sectional study in stage 3–4 chronic kidney disease. *Arch. Med. Res.* **2014**, *45*, 309–317.
9. Kaminski, T.W.; Pawlak, K.; Karbowska, M.; Mysliwiec, M.; Pawlak, D. Indoxyl sulfate - the uremic toxin linking hemostatic system disturbances with the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* **2017**, *18*, 35.
10. Manabe, I. Chronic inflammation links cardiovascular, metabolic and renal diseases. *Circ. J.* **2011**, *75*, 2739–2748.
11. Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy Z.A. and on behalf of the European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4*, 1551–1558.
12. Liabeuf, S.; Barreto, D.V.; Barreto, F.C.; Meert, N.; Glorieux, G.; Schepers, E.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy. Z.A. and on behalf of the European Uraemic Toxin Work Group (EUTox). Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2010**, *25*, 1183–1191.
13. Lin, C.J.; Liu, H.L.; Pan, C.F.; Chuang, C.K.; Jayakumar, T.; Wang, T.J.; Chen, H.H.; Wu, C.J. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease. *Arch. Med. Res.* **2012**, *43*, 451–456.
14. Pecoits-Filho, R.; Heimbürger, O.; Barany, P.; Suliman, M.; Fehrman-Ekholm, I.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am. J. Kidney Dis.* **2003**, *41*, 1212–1218.
15. Stinghen, A.E.; Goncalves, S.M.; Martines, E.G.; Nakao, L.S.; Riella, M.C.; Aita, C.A.; Pecoits-Filho, R. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and

- adhesion molecules in chronic kidney disease. *Nephron Clin. Pract.* 2009, 111, c117–c126.
16. Dou, L.; Sallee, M.; Cerini, C.; Poitevin, S.; Gondouin, B.; Jourde-Chiche, N.; Fallague, K.; Brunet, P.; Calaf, R.; Dussol, B.; et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 876–887.
 17. Dalboni, M.A.; Sardenberg, C.; Andreoli, M.C.; Watanabe, R.; Canziani, M.E.; Santos, B.F.; Liangos, O.; Jaber, B.L.; Draibe, S.; Cendoroglo, M. Soluble Fas: A novel marker of inflammation in uremia. *Artif. Organs* **2003**, *27*, 687–691.
 18. El-Agroudy, A.E.; El-Baz, A. Soluble Fas: A useful marker of inflammation and cardiovascular diseases in uremic patients. *Clin. Exp. Nephrol.* **2010**, *14*, 152–157.
 19. Kim, H.Y.; Yoo, T.H.; Hwang, Y.; Lee, G.H.; Kim, B.; Jang, J.; Yu, H.T.; Kim, M.C.; Cho, J.Y.; Lee, C.J.; et al. Indoxyl sulfate (IS)-mediated immune dysfunction provokes endothelial damage in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3057.
 20. Chmielewski, M.; Bragfors-Helin, A.C.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B.; Anderstam, B. Serum soluble CD36, assessed by a novel monoclonal antibody-based sandwich ELISA, predicts cardiovascular mortality in dialysis patients. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411*, 2079–2082.
 21. Huh, H.Y.; Lo, S.K.; Yesner, L.M.; Silverstein, R.L. CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6267–6271.
 22. Lekawanvijit, S.; Kompa, A.R.; Krum, H. Protein-bound uremic toxins: A long overlooked culprit in cardiorenal syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2016**, *311*, F52–F62.
 23. Kashiwama, K.; Sonoda, S.; Muraoka, Y.; Suzuki, Y.; Kamezaki, F.; Tsuda, Y.; Araki, M.; Tamura, M.; Takeuchi, M.; Abe, H.; et al. Coronary plaque progression of non-culprit lesions after culprit percutaneous coronary intervention in patients with moderate to advanced chronic kidney disease: Intravascular ultrasound and integrated backscatter intravascular ultrasound study. *Int. J. Cardiovasc. Imaging* **2015**, *31*, 935–945.
 24. Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115–126.
 25. Jofre, R.; Rodriguez-Benitez, P.; Lopez-Gomez, J.M.; Perez-Garcia, R. Inflammatory syndrome in patients on hemodialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, S274–S280.
 26. Vanholder, R.; De Smet, R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1999**, *10*, 1815–1823.
 27. Yadav, A.K.; Lal, A.; Jha, V. Association of circulating fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 (+) CD4 (+) T cells with common carotid artery intima-media thickness in patients with chronic kidney disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **2011**, *18*, 958–965.
 28. Liu, H.; Jiang, D. Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 1180–1186.
 29. Lucas, A.D.; Bursill, C.; Guzik, T.J.; Sadowski, J.; Channon, K.M.; Greaves, D.R. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* **2003**, *108*, 2498–2504.
 30. Lin, C.J.; Wu, V.; Wu, P.C.; Wu, C.J. Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132589.
 31. Richter, B.; Koller, L.; Hohensinner, P.J.; Rychli, K.; Zorn, G.; Goliash, G.; Berger, R.; Mörtl, D.; Maurer, G.; Huber, K.; et al. Fractalkine is an independent predictor of

- mortality in patients with advanced heart failure. *Thromb. Haemost.* **2012**, *6*, 1220–1227.
32. Leurs, P.; Lindholm, B. The AGE-RAGE pathway and its relation to cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Arch. Med. Res.* **2013**, *44*, 601–610.
 33. Selvin, E.; Halushka, M.K.; Rawlings, A.M.; Hoogeveen, R.C.; Ballantyne, C.M.; Coresh, J.; Astor, B.C. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes* **2013**, *62*, 2116–2121.
 34. Rebholz, C.M.; Astor, B.C.; Grams, M.E.; Halushka, M.K.; Lazo, M.; Hoogeveen, R.C.; Ballantyne, C.M.; Coresh, J.; Selvin, E. Association of plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and risk of kidney disease: The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2015**, *30*, 77–83.
 35. Loomis, S.J.; Chen, Y.; Sacks, D.B.; Christenson, E.S.; Christenson, R.H.; Rebholz, C.M.; Selvin, E. Cross-sectional Analysis of AGE-CML, sRAGE, and esRAGE with Diabetes and Cardiometabolic Risk Factors in a Community-Based Cohort. *Clin. Chem.* **2017**, *63*, 980–989.
 36. Goncalves, S.; Pecoits-Filho, R.; Perreto, S.; Barberato, S.H.; Stinghen, A.E.; Lima, E.G.; Fuerbringer, S.; Sauthier, S.M.; Riella, M.C. Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2006**, *21*, 2788–2794.
 37. Guilgen, G.; Werneck, M.L.; de Noronha, L.; Martins, A.P.; Varela, A.M.; Nakao, L.S.; Pecoits-Filho, R. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. *Blood Purif.* **2011**, *32*, 296–302.
 38. Levey, A.S.; Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Zhang, Y.L.; Castro, A.F.; 3rd, Feldman, H.I.; Kusek, J.W.; Eggers, P.; Van Lente, F.; Greene, T.; Coresh, J.; et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann. Intern. Med.* **2009**, *150*, 604–612.
 39. Levin, A.; Stevens, P.E.; Bilous, R.W.; Coresh, J.; De Francisco, A.L.M.; De Jong, P.E.; Griffith, K.E.; Hemmelgarn, B.R.; Iseki, K.; Lamb, E.J.; et al. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.* **2013**, *3*, 1–150.

5. CONCLUSÕES

- ▶ Os níveis plasmáticos de toxinas urêmicas, bem como os níveis de MCP-1, sVCAM-1, sFas e UTRB foram correlacionados negativamente com TFG em pacientes com DRC;
- ▶ Os níveis circulantes de toxinas urêmicas (IS, pCs, IAA) foram associados aos níveis de MCP-1 e VCAM-1. O sFas correlacionou-se somente com IS e p-CS;
- ▶ Os níveis circulantes de toxinas urêmicas foram associados com os níveis de UTRB (sCD36, sRAGE e fractalcina), indicando uma ativação do sistema imunológico especificamente induzido por toxinas urêmicas;
- ▶ A expressão tecidual de CX3CR1 em artérias renais foi maior em pacientes com DRC (receptores) que nos controles (doadores);
- ▶ Ao comparar casos com e sem placa aterogênica, em relação a toxinas urêmicas e biomarcadores inflamatórios e UTRB, observou-se diferença estatisticamente significativa com sCD36. Isto evidencia o impacto da inflamação iniciada pela toxicidade urêmica em artérias;
- ▶ A menor TFG foi associada a uma redução na sobrevivência enquanto que, os níveis plasmáticos mais elevados de IS, pCS, IL-6, sFas, sCD36, fractalcina e foram associados a um risco aumentado de mortalidade;
- ▶ IAA, hsCRP, moléculas de adesão e sRAGE não foram preditores independentes ou significativos de eventos fatais na população estudada;
- ▶ Finalmente, demonstramos que ambas as toxinas urêmicas (IS, pCS), IL-6, sFas, sCD36 e fractalcina foram preditores independentes do risco de mortalidade total em pacientes com DRC moderada a grave.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde o desenho do projeto, havia uma intenção de buscar novos biomarcadores para o melhor entendimento da toxicidade urêmica e suas consequências sobre órgãos e tecidos na DRC. A importância dos biomarcadores se dá principalmente, por serem indicadores de processos biológicos e ajudarem na estratificação de grupos de alto risco para início e avaliação de repostas nas intervenções terapêuticas. Dentre as características ideais para um biomarcador estão a capacidade de ser preciso e ter reprodutibilidade. O processo de validação de um biomarcador envolve várias etapas. Primeiramente, a escolha de um biomarcador a partir de plausibilidade biológica. Após, a análise da viabilidade de determiná-lo na rotina laboratorial. Em uma fase mais avançada, a caracterização da validade clínica (associação com desfechos clinicamente relevantes) em estudos observacionais retrospectivos e prospectivos. Baseado no conhecimento da fisiopatologia de complicações da DRC, particularmente cardiovasculares, escolheu-se biomarcadores ainda não muito explorados quanto a sua relação com a toxicidade urêmica e o impacto na mortalidade em pacientes com DRC. Apesar dos nossos resultados serem promissores em relação à mortalidade, ainda se faz necessário maiores estudos, como a avaliação em coortes maiores, para validação desses marcadores, principalmente, na confirmação do uso clínico do biomarcador no monitoramento de doenças e quando o uso gera informação importante o suficiente para direcionar alterações de conduta clínica. Além disso, antes de sua incorporação na prática clínica, a mensuração do biomarcador deve ser custo efetiva, resultando em medidas terapêuticas ou preventivas que possibilitem a redução da incidência de eventos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El Nahas M. Cardio-Kidney-Damage: a unifying concept. *Kidney Int.* 2010;78(1):14-8.
2. Moradi H, Sica DA, Kalantar-Zadeh K. Cardiovascular burden associated with uremic toxins in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2013;38(2):136-48.
3. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(5):863-70.
4. Ito S, Yoshida M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Toxins (Basel).* 2014;6(2):665-78.
5. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-52.
6. KDIGO. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1–150.
7. Alebiosu CO. An update on 'progression promoters' in renal diseases. *J Natl Med Assoc.* 2003;95(1):30-42.
8. Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med.* 2010;268(5):456-67.
9. Lekawanvijit S, Kompa AR, Wang BH, Kelly DJ, Krum H. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. *Circ Res.* 2012;111(11):1470-83.
10. Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, et al. Uremic toxicity: present state of the art. *Int J Artif Organs.* 2001;24(10):695-725.
11. Vanholder R, De Smet R. Pathophysiological effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(8):1815-23.
12. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol.* 2008;23(8):1211-21.
13. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, et al. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 2003;63(5):1934-43.
14. de Loor H, Bammens B, Evenepoel P, De Preter V, Verbeke K. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. *Clin Chem.* 2005;51(8):1535-8.
15. Dou L, Cerini C, Brunet P, Guilianelli C, Moal V, Grau G, et al. P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. *Kidney Int.* 2002;62(6):1999-2009.
16. Lekawanvijit S, Kompa AR, Krum H. Protein-bound uremic toxins: a long overlooked culprit in cardiorenal syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;311(1):F52-62.
17. Vanholder R, Schepers E, Pletinck A, Nagler EV, Glorieux G. The uremic toxicity of indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(9):1897-907.
18. Liabeuf S, Barreto DV, Barreto FC, Meert N, Glorieux G, Schepers E, et al. Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(4):1183-91.
19. Lin CJ, Liu HL, Pan CF, Chuang CK, Jayakumar T, Wang TJ, et al. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease. *Arch Med Res.* 2012;43(6):451-6.

20. Deltombe O, Van Biesen W, Glorieux G, Massy Z, Dhondt A, Eloot S. Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis. *Toxins (Basel)*. 2015;7(10):3933-46.
21. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(2):592-6.
22. Meijers BK, Van Kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, et al. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(5):891-901.
23. Meijers BK, Evenepoel P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(3):759-61.
24. Zhu JZ, Zhang J, Yang K, Du R, Jing YJ, Lu L, et al. P-cresol, but not p-cresylsulphate, disrupts endothelial progenitor cell function in vitro. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(12):4323-30.
25. Gross P, Massy ZA, Henaut L, Boudot C, Cagnard J, March C, et al. Para-cresyl sulfate acutely impairs vascular reactivity and induces vascular remodeling. *J Cell Physiol*. 2015;230(12):2927-35.
26. Han H, Zhu J, Zhu Z, Ni J, Du R, Dai Y, et al. p-Cresyl sulfate aggravates cardiac dysfunction associated with chronic kidney disease by enhancing apoptosis of cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2015;4(6):e001852.
27. Yu M, Kim YJ, Kang DH. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):30-9.
28. Shimizu H, Bolati D, Adijiang A, Muteliefu G, Enomoto A, Nishijima F, et al. NF-kappaB plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(5):C1201-12.
29. Shimazu S, Hirashiki A, Okumura T, Yamada T, Okamoto R, Shinoda N, et al. Association between indoxyl sulfate and cardiac dysfunction and prognosis in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J*. 2013;77(2):390-6.
30. Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, Dignat-George F, Brunet P. Vascular incompetence in dialysis patients--protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. *Semin Dial*. 2011;24(3):327-37.
31. Niwa T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. *J Ren Nutr*. 2010;20(5 Suppl):S2-6.
32. Dou L, Sallee M, Cerini C, Poitevin S, Gondouin B, Jourde-Chiche N, et al. The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(4):876-87.
33. Gondouin B, Cerini C, Dou L, Sallee M, Duval-Sabatier A, Pletinck A, et al. Indolic uremic solutes increase tissue factor production in endothelial cells by the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Kidney Int*. 2013;84(4):733-44.
34. Sallee M, Dou L, Cerini C, Poitevin S, Brunet P, Burtsey S. The aryl hydrocarbon receptor-activating effect of uremic toxins from tryptophan metabolism: a new concept to understand cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Toxins (Basel)*. 2014;6(3):934-49.
35. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, et al. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int*. 2013;83(4):582-92.
36. Rossi M, Campbell KL, Johnson DW, Stanton T, Vesey DA, Coombes JS, et al. Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease. *Arch Med Res*. 2014;45(4):309-17.
37. Benigni A, Remuzzi G. How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression. *Am J Kidney Dis*. 2001;37(1 Suppl 2):S21-4.

38. Park SH, Stenvinkel P, Lindholm B. Cardiovascular biomarkers in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2012;22(1):120-7.
39. Meuwese CL, Snaedal S, Halbesma N, Stenvinkel P, Dekker FW, Qureshi AR, et al. Trimestral variations of C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha are similarly associated with survival in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(4):1313-8.
40. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005;67(4):1216-33.
41. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(6):1212-8.
42. Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Temmar M, Lemke HD, Tribouilloy C, et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(6):550-6.
43. Segal MS, Baylis C, Johnson RJ. Endothelial health and diversity in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(2):323-4.
44. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(5):842-51.
45. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 2004;95(9):858-66.
46. Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *J Cardiol.* 2009;53(3):317-33.
47. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, et al. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke.* 2004;35(2):458-63.
48. Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, et al. Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk: Atorvastatin on Inflammatory Markers (AIM) study, a substudy of ACTFAST. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(1):168-74.
49. Bartnicki P, Rysz J, Franczyk B, Baj Z, Majewska E. Impact of Continuous Erythropoietin Receptor Activator on Selected Biomarkers of Cardiovascular Disease and Left Ventricle Structure and Function in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9879615.
50. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001;108(6):785-91.
51. Fernandez-Real JM, Handberg A, Ortega F, Hojlund K, Vendrell J, Ricart W. Circulating soluble CD36 is a novel marker of liver injury in subjects with altered glucose tolerance. *J Nutr Biochem.* 2009;20(6):477-84.
52. Kugelmas M, Hill DB, Vivian B, Marsano L, McClain CJ. Cytokines and NASH: a pilot study of the effects of lifestyle modification and vitamin E. *Hepatology.* 2003;38(2):413-9.
53. Esteve E, Ricart W, Fernandez-Real JM. Dyslipidemia and inflammation: an evolutionary conserved mechanism. *Clin Nutr.* 2005;24(1):16-31.
54. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab.* 2006;4(3):211-21.
55. Himmelfarb J. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg? *Semin Dial.* 2004;17(6):449-54.
56. Himmelfarb J. Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin.* 2005;23(3):319-30.

57. Okamura DM, Pennathur S, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, Collins S, Febbraio M, et al. CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):495-505.
58. Chmielewski M, Bragfors-Helin AC, Stenvinkel P, Lindholm B, Anderstam B. Serum soluble CD36, assessed by a novel monoclonal antibody-based sandwich ELISA, predicts cardiovascular mortality in dialysis patients. *Clin Chim Acta.* 2010;411(23-24):2079-82.
59. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):1-15.
60. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-25.
61. Monnier VM, Sell DR, Genuth S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:567-81.
62. Figarola JL, Shanmugam N, Natarajan R, Rahbar S. Anti-inflammatory effects of the advanced glycation end product inhibitor LR-90 in human monocytes. *Diabetes.* 2007;56(3):647-55.
63. Neepser M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, et al. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem.* 1992;267(21):14998-5004.
64. Leurs P, Lindholm B. The AGE-RAGE pathway and its relation to cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Arch Med Res.* 2013;44(8):601-10.
65. Busch M, Franke S, Ruster C, Wolf G. Advanced glycation end-products and the kidney. *Eur J Clin Invest.* 2010;40(8):742-55.
66. Selvin E, Halushka MK, Rawlings AM, Hoogeveen RC, Ballantyne CM, Coresh J, et al. sRAGE and risk of diabetes, cardiovascular disease, and death. *Diabetes.* 2013;62(6):2116-21.
67. Basta G, Leonardis D, Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Gaetano L, et al. Circulating soluble receptor of advanced glycation end product inversely correlates with atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2010;77(3):225-31.
68. Semba RD, Ferrucci L, Fink JC, Sun K, Beck J, Dalal M, et al. Advanced glycation end products and their circulating receptors and level of kidney function in older community-dwelling women. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(1):51-8.
69. Rebholz CM, Astor BC, Grams ME, Halushka MK, Lazo M, Hoogeveen RC, et al. Association of plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and risk of kidney disease: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Nephrol Dial Transplant.* 2014.
70. Lindsey JB, de Lemos JA, Cipollone F, Ayers CR, Rohatgi A, Morrow DA, et al. Association between circulating soluble receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes Care.* 2009;32(7):1218-20.
71. Hudson BI, Moon YP, Kalea AZ, Khatri M, Marquez C, Schmidt AM, et al. Association of serum soluble receptor for advanced glycation end-products with subclinical cerebrovascular disease: the Northern Manhattan Study (NOMAS). *Atherosclerosis.* 2011;216(1):192-8.
72. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(4):1143-52.
73. Linden E, Cai W, He JC, Xue C, Li Z, Winston J, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease results from advanced glycation end products (AGE)-mediated inhibition of endothelial nitric oxide synthase through RAGE activation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):691-8.

74. Hartog JW, de Vries AP, Lutgers HL, Meerwaldt R, Huisman RM, van Son WJ, et al. Accumulation of advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence, in renal disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1043:299-307.
75. Renard C, Chappey O, Wautier MP, Nagashima M, Lundh E, Morser J, et al. Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Mol Pharmacol.* 1997;52(1):54-62.
76. Kshirsagar AV, Bomback AS, Bang H, Gerber LM, Vupputuri S, Shoham DA, et al. Association of C-reactive protein and microalbuminuria (from the National Health and Nutrition Examination Surveys, 1999 to 2004). *Am J Cardiol.* 2008;101(3):401-6.
77. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008;4(5):285-93.
78. Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol.* 2001;22(11):602-7.
79. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv.* 2010;10(5):263-70.
80. Liu H, Jiang D. Fractalkine/CX3CR1 and atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2011;412(13-14):1180-6.
81. McDermott DH HJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrel NM, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res.* 2001;89:401-7.
82. Yadav AK, Sharma V, Jha V. Association between serum neopterin and inflammatory activation in chronic kidney disease. *Mediators Inflamm.* 2011;2012:476979.
83. Faure V, Cerini C, Paul P, Berland Y, Dignat-George F, Brunet P. The uremic solute p-cresol decreases leukocyte transendothelial migration in vitro. *Int Immunol.* 2006;18(10):1453-9.
84. Goncalves S, Pecoits-Filho R, Perreto S, Barberato SH, Stinghen AE, Lima EG, et al. Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(10):2788-94.
85. Guilgen G, Werneck ML, de Noronha L, Martins AP, Varela AM, Nakao LS, et al. Increased calcification and protein nitration in arteries of chronic kidney disease patients. *Blood Purif.* 2011;32(4):296-302.
86. Stinghen AE, Goncalves SM, Martines EG, Nakao LS, Riella MC, Aita CA, et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract.* 2009;111(2):c117-26.
87. Adler S. Novel kidney injury biomarkers. *J Ren Nutr.* 2010;20(5 Suppl):S15-8.
88. Calaf R, Cerini C, Genovesio C, Verhaeghe P, Jourde-Chiche N, Berge-LeFranc D, et al. Determination of uremic solutes in biological fluids of chronic kidney disease patients by HPLC assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011;879(23):2281-6.
89. Kikuchi K, Itoh Y, Tateoka R, Ezawa A, Murakami K, Niwa T. Metabolomic analysis of uremic toxins by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;878(20):1662-8.
90. Meert N, Schepers E, Glorieux G, Van Landschoot M, Goeman JL, Waterloos MA, et al. Novel method for simultaneous determination of p-cresylsulphate and p-cresylglucuronide: clinical data and pathophysiological implications. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(6):2388-96.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COORTE 1)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 07 de abril de 2005


Of. 87/05/CEP-PUCPR

Ref. "Influência da Doença Renal Crônica no Processo Aterogênico"

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 06 de abril do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado "Influência da Doença Renal Crônica no Processo Aterogênico", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 509, e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilmo Sr.

Roberto F.S. Pecoits Filho

8.2 ANEXO II - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COORTE 2)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação


Curitiba, 26 de junho de 2005
Of. 226/05/CEP-PUCPR

Ref. "Modulação fenotípica induzida por soro urêmico em células vasculares".

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 01 de junho do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado "Modulação fenotípica induzida por soro urêmico em células vasculares", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 577 e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc. Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Lia Sumie Nakao