



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE BORSATO HAUSER

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO
CARBONATO DE SEVELAMER NOS
NÍVEIS CIRCULANTES DE ENDOTOXINAS
E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
ALFA EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE INSUFICIÊNCIA RENAL**

CURITIBA

2009

ALINE BORSATO HAUSER

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO
CARBONATO DE SEVELAMER NOS
NÍVEIS CIRCULANTES DE ENDOTOXINAS
E DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
ALFA EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE INSUFICIÊNCIA RENAL**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE DA PUCPR, COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO MEDICINA E ÁREAS AFINS.

ORIENTADOR: ROBERTO PECOITS-FILHO.

CURITIBA

2009

Dedico esta tese ao meu marido, Sandro, e
às minhas filhas Ana Giulia e Maria Fernanda,
motivos de inspiração e aconchego
em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Roberto, presente em todas as etapas deste trabalho, sempre dedicado, otimista e amigo.

Aos meus pais, Marcos e Elisabeth, e demais familiares, pelo apoio e incentivo.

À Genzyme, pelo financiamento deste trabalho e, Robert Guiberteau e Simone Lima pela revisão crítica do artigo referente à tese.

À CAPES, pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe de microcirurgia experimental da Prof^a Irene de Noronha, da Faculdade de Medicina de São Paulo, onde foram realizados os primeiros procedimentos de ablação renal.

À Iuly R. F. de Azevedo, aluna de Iniciação Científica do Curso de Farmácia da PUCPR, que se mostrou responsável e dedicada em todas as tarefas realizadas durante a execução das microcirurgias e monitoramento dos animais.

Ao zootecnista Rafael Zotz, responsável pelo Biotério da PUCPR, presente em todas as coletas de sangue dos animais, que foram realizadas com ética e responsabilidade.

À colega Andréa E. M. Stingen que nos orientou em relação às técnicas microbiológicas utilizadas para a pesquisa de translocação bacteriana.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas, mesmo não mencionadas, que acrescentaram seus conhecimentos para a realização desta conquista.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Doença Renal Crônica	3
1.2 Fatores de Risco associados às complicações na DRC	4
1.3 Inflamação Sistêmica na Doença Renal Crônica.....	5
1.4 Endotoxemia na Doença Renal Crônica.....	9
1.5 Carbonato de Sevelamer.....	13
1.5.1 Descrição.....	13
1.5.3 Potencial uso do Carbonato de Sevelamer como ligante de endotoxinas.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. DESENVOLVIMENTO	18
3.1 Estudo em Modelo Animal.....	18
4. ARTIGO	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
6. CONCLUSÕES.....	29
7. OUTROS ARTIGOS RELACIONADOS AO PROJETO	30
7.1 Artigo 1	30
7.2 Artigo 2	31
7.3 Artigo 3	32
8. REFERÊNCIAS	33

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) está associada à resposta inflamatória, apesar dos mecanismos envolvidos e das estratégias antiinflamatórias estarem ainda indefinidos. Este estudo teve como objetivo avaliar a translocação de endotoxinas (ET) do lúmen intestinal para a circulação como desencadeador do processo inflamatório e o uso do carbonato de sevelamer como ligante de ET em um modelo animal de insuficiência renal. **Material and Métodos:** Vinte e sete animais participaram do estudo, sendo 15 animais do grupo SHAM e 12 animais do grupo 5/6 nefrectomizado (DRC). Os grupos SHAM+Sev e DRC+Sev receberam carbonato de sevelamer adicionado 3% à ração. Os grupos SHAM-Sev e DRC-Sev receberam ração normal. Foram determinados Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e ET no soro nos dias 7, 30 e 60 em todos os animais. **Resultados:** A DRC induziu a resposta inflamatória, visto que os níveis TNF α foram indetectáveis nos animais do grupo SHAM em contraste aos níveis encontrados no grupo DRC (3.18 ± 0.62 , 2.58 ± 0.54 e 1.86 ± 0.47 pg/mL, respectivamente nos dias 7, 30 e 60; $p<0.05$ em todos os pontos). Similarmente, DRC promoveu um aumento nos níveis de ET (0.038 ± 0.007 EU/mL) quando comparados ao grupo SHAM (0.008 ± 0.006 EU/mL; $p<0.05$) no *baseline*. Foi encontrada uma correlação significativa entre os níveis de TNF α e ET no dia 30 ($r=0.65$; $p<0.001$). Os níveis de TNF α nos ratos DRC+Sev foram menores no dia 30 de forma significativa (0.03 ± 0.79 pg/mL) quando comparados aos ratos DRC-Sev (4.41 ± 0.67 pg/mL; $p<0.005$). Similarmente, os níveis de ET nos ratos DRC+Sev foram menores no dia 30 (0.004 ± 0.016 EU/mL) quando comparados aos ratos DRC-Sev (0.061 ± 0.015 EU/mL; $p<0.05$). **Conclusão:** A indução da disfunção renal desencadeou inflamação e endotoxemia neste modelo experimental de DRC, que foram aliviados pelo uso do carbonato de sevelamer. Estes dados sugerem que o sevelamer induz um efeito antiinflamatório em paralelo à redução de ET.

ABSTRACT

Background: Renal dysfunction is associated with activation of inflammatory response, but the mechanisms behind this observation and potential anti-inflammatory strategies are yet to be defined. Endotoxin (ET) translocation from the intestinal lumen can potentially trigger systemic inflammatory response, and ET binding represents a potential anti-inflammatory strategy in renal failure. The aim of this study was to evaluate the ET-binding capacity of sevelamer carbonate in an animal model of renal failure. **Material and Methods:** Twenty-seven 5/6 nephrectomized (CKD) and sham operated rats were allocated to receive normal chow (CKD-Sev) or a diet with 3% sevelamer carbonate added (CKD+Sev) for 60 days. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) and ET were measured in plasma at day 7, 30 and 60 in all animals. **Results:** Renal failure induced an inflammatory response, since TNF α levels were undetectable in all control animals in contrast to the CKD group (3.18 \pm 0.62, 2.58 \pm 0.54 and 1.86 \pm 0.47pg/mL, respectively in day 7, 30 and 60; p<0.05 in all time-points). Similarly, CKD promoted an increase in ET levels (0.038 \pm 0.007EU/mL) when compared to SHAM (0.008 \pm 0.006EU/mL; p<0.05) only at the baseline. Interestingly, there was a significant correlation between TNF α and ET levels at day 30 (r=0.65; p<0.001). TNF α levels in rats CKD+Sev were significantly lower at day 30 (0.03 \pm 0.79 pg/mL) when compared to the animals CKD-Sev (4.41 \pm 0.67pg/mL; p<0.005). Similarly, ET levels in CKD+Sev rats were lower at day 30 (0.004 \pm 0.016 EU/mL) when compared to CKD-Sev (0.061 \pm 0.015 EU/mL; p<0.05). **Conclusion:** In conclusion, induction of renal dysfunction triggered inflammation and induced endotoxemia in this experimental model of CKD, which were alleviated by sevelamer treatment. This data suggests that sevelamer carbonate induces an anti-inflammatory effect in parallel to a reduction in ET.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como a presença de dano renal mantido por 03 ou mais meses. É doença caracterizada por perda progressiva da função dos rins ocasionada por lesão irreversível da função dos néfrons. Pode ser classificada em estágios, de acordo com a medida da taxa de filtração glomerular (TFG), sendo que pacientes com TFG < 15 mL/min apresentam insuficiência renal terminal sendo necessária a terapia substitutiva da função renal (Tabela 1) (1).

Tabela 1. Estadiamento da Doença Renal Crônica

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73m ²)
1	Lesão renal com função renal normal	≥ 90
2	Insuficiência renal leve ou funcional	60-89
3	Insuficiência renal moderada ou laboratorial	30-59
4	Insuficiência renal grave ou clínica	15-29
5	Insuficiência renal terminal ou dialítica	< 15 ou em diálise

Fonte: Romão JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2004;26(3s1):26-31.

A DRC constitui importante problema de saúde pública em todo o mundo (2). Segundo Censo 2008 da Sociedade Brasileira de Nefrologia existe cerca de 10 milhões de brasileiros com DRC nos 05 estágios, 90 mil pacientes em estágio final recebendo terapia substitutiva de função renal e a taxa de mortalidade anual estimada é de 14 mil pacientes dialíticos (3). A DRC é multicausal, tratável de várias maneiras, controlável, mas incurável, progressiva e com elevada morbidade e letalidade. Assim, o reconhecimento e o manejo precoces de pacientes em

estágios iniciais da DRC poderiam reduzir o aumento no número dos pacientes urêmicos (4). O esclarecimento da população sobre o significado e a natureza assintomática e progressiva da doença, bem como o controle dos fatores de risco, são passos importantes para a prevenção primária. Os fatores de risco são: diabetes melito, hipertensão arterial sistêmica (HAS), sexo masculino, raça negra, idade, tabagismo, doenças renais proteinúricas, histórico familiar e fatores de risco cardiovasculares. Para os pacientes com TFG < 15 mL/min ou em diálise, os estudos que visem elucidar os mecanismos envolvidos na disfunção renal, são fundamentais para melhorar a qualidade de vida e reduzir a alta taxa de mortalidade destes pacientes.

1.2 Fatores de Risco associados às complicações na DRC

Apesar dos recentes avanços em terapias substitutivas da função renal e dos estudos atuais sobre a fisiopatologia da DRC, a taxa anual de mortalidade dos pacientes em diálise continua extremamente alta. E, mesmo após estratificação por co-morbidades, representam 10 a 20 vezes o risco descrito na população geral (2). Os fatores de risco tradicionais para mortalidade cardiovascular descritos no estudo de Framingham não conseguem explicar a alta taxa de óbitos nos pacientes com DRC. Recentes evidências mostram fatores de risco não tradicionais também associados com mortalidade cardiovascular aumentada tanto em pacientes com função renal normal (5), quanto em pacientes portadores de DRC (6).

Apesar da associação entre DRC e risco cardiovascular ter sido descrita inicialmente nos pacientes em estágio 5, provavelmente o desenvolvimento da DCV começa nas fases iniciais da doença renal. A disfunção renal leve (estágios 2 e 3) é relatada como risco independente para o desenvolvimento de DCV em vários estudos (7). Assim, a detecção precoce da lesão renal e condutas terapêuticas apropriadas podem reduzir riscos, custos relacionados com a DRC e as complicações como: aterosclerose acelerada, calcificação vascular, resistência à insulina, aumento do catabolismo muscular, perda de apetite, remodelação

óssea e aumento da permeabilidade da membrana peritoneal, que representam importantes indicadores de mortalidade por DCV e doenças infecciosas neste grupo de pacientes (8).

Dentre estes fatores de risco não tradicionais, a inflamação parece desempenhar o papel principal no desenvolvimento da DCV aterosclerótica tanto na população geral quanto em renais crônicos (9). Em pacientes em estágio avançado de DRC, o número de fatores relacionados à diálise como bio-incompatibilidade ao dialisador e qualidade da água do dialisado, e de fatores não relacionados, tais como infecções, toxicidade urêmica e co-morbidades, podem contribuir para um estado de inflamação crônica (10). A identificação de fatores associados à inflamação e seus mecanismos de ativação representam um desafio importante na área de doenças renais.

1.3 Inflamação Sistêmica na Doença Renal Crônica

1.3.1 Causas e Mecanismos de Inflamação na Doença Renal Crônica

A redução da função renal pode estar associada com uma resposta inflamatória, com o aumento da concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias e outros biomarcadores de inflamação, observados tanto em estágios precoces (11) quanto em estágios avançados de disfunção renal (12). Uma contribuição independente de uremia na ativação da resposta inflamatória, obviamente requer mais investigações.

A resposta inflamatória é uma complexa reação do organismo que ocorre em resposta à lesão celular sofrida, assim o sistema imune é ativado. Primeiramente ativa-se o sistema inato e, posteriormente, o sistema adaptativo. No local da agressão ocorrem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração de células inflamatórias e ativação de células do sistema imune. Concomitantemente, ocorre produção de proteínas de fase aguda, componentes do complemento, febre e ativação da imunidade sistêmica. No início

do processo inflamatório, as citocinas interagem com receptores específicos na membrana celular, regulando a transcrição de alguns genes através de sinais celulares localmente ou à distância, que resultam em modificações no comportamento celular (13).

Os pacientes com DRC que manifestam persistentes níveis de marcadores inflamatórios encontram risco ainda mais elevado de desenvolver DCV com taxas de morbidade e mortalidade inaceitavelmente altas (14), mas os mecanismos que contribuem para os riscos aumentados não estão bem definidos (15). Sinais de atividade inflamatória podem ser observados nas fases iniciais da DRC e níveis elevados dos mediadores inflamatórios estão associados com baixa sobrevida destes pacientes (10).

As causas da resposta inflamatória relacionadas à uremia e diálise são múltiplas. O acúmulo de toxinas urêmicas presentes na DRC corrigido apenas parcialmente pela diálise, associado a fatores relacionados à diálise como a interação com o dialisador, a presença de endotoxinas na água do dialisador e a diálise peritoneal, representam um modelo de estímulo crônico para a disfunção imune na DRC (16).

Atualmente muitos trabalhos investigam os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do estado inflamatório urêmico, focando na ativação de monócitos e macrófagos, sendo que evidências recentes indicam que o endotélio vascular representa papel importante no processo regulatório da inflamação (17). Durante o processo inflamatório, as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) são produzidos por leucócitos, células mononucleares e células de K pffer no fígado (13). Os pacientes com DRC apresentam liberação celular destes biomarcadores como resposta do sistema imune cronicamente ativado. Assim, inicialmente, a resposta inflamatória é mediada pelas citocinas IL-6, IL-1, TNF α , interferon gama e o fator de crescimento-beta que levam as alterações dos níveis séricos das proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) e o fibrin g nio e, a redução da síntese e da liberação de outras proteínas como albumina (18).

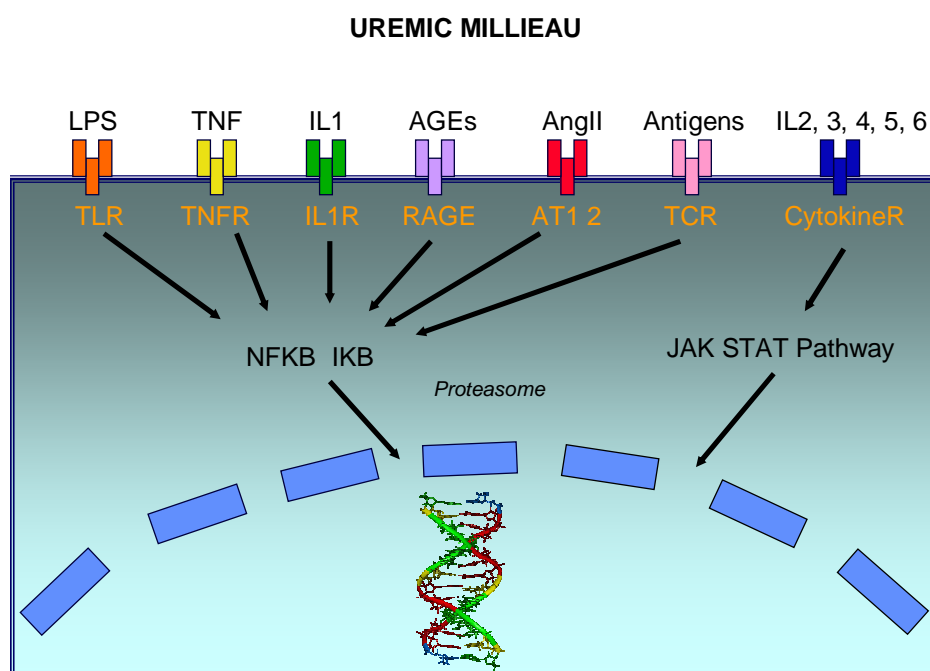
A PCR é proteína de fase aguda produzida pelo fígado e se encontra sob o controle das citocinas pró-inflamatórias, sendo um marcador sensível da inflamação sistêmica que aumenta rapidamente o seu nível sérico frente a esses estímulos (19). O fibrinogênio é também produzido pelo fígado através do estímulo da IL-6 e encontra-se relacionado com o desenvolvimento da aterosclerose e da trombose, através da infiltração da parede arterial onde se liga ao LDL-colesterol e outros fatores formadores do trombo. Seus produtos de degradação estimulam a proliferação de células musculares e levam ao acúmulo de colesterol pelos macrófagos. Devido ao seu alto peso molecular é o principal determinante da viscosidade plasmática, a qual é fator independente de risco para DCV, cuja incidência aumenta com a elevação dos níveis de fibrinogênio, ou seja, o risco de eventos cardíacos é maior nos pacientes com maiores concentrações de fibrinogênio plasmático independente do nível sérico do colesterol (20). Na DRC, a mesma relação é observada entre fibrinogênio e DCV, níveis elevados de fibrinogênio estão associados com DCV independente da função renal ou de fatores de risco (15).

Os altos níveis plasmáticos das citocinas inflamatórias e das proteínas de fase aguda, podem ser observados nos estágios iniciais da DRC (14) e aumentam durante a progressão da doença (21). Os mecanismos envolvidos na ativação crônica do sistema imune estão intimamente ligados a várias complicações da DRC já descritas anteriormente (16).

Atualmente, estuda-se a resposta celular ao estado urêmico na DRC. A uremia é situação ocorrida devido ao acúmulo de substâncias tóxicas no organismo do paciente com DRC devido sua baixa TFG. Estas substâncias acumuladas como uréia, creatinina, produtos finais de glicação avançada (AGE) e outras apresentam potencial pró-inflamatório. As moléculas desta resposta interagem com receptores de superfície celular, como os *toll like receptors* (TLR), receptores de TNF (TNFR), AGE (RAGE), receptores de IL-1 (IL1R), receptores de célula T (TCR), receptores de Angiotensina II (AT1 e 2), além de receptores de outras citocinas, estimulando as vias citoplasmáticas de transcrição como a via fator nuclear *Kappa B* (NFkB) e a via JAK STAT, resultando em expressão de

genes inflamatórios no núcleo de várias linhagens celulares. Assim, estas proteínas mediarão o processo de lesão celular associado à resposta inflamatória (16) (Fig. 1)

Figura 1. Fatores pró-inflamatórios relacionados ao estado urêmico na DRC



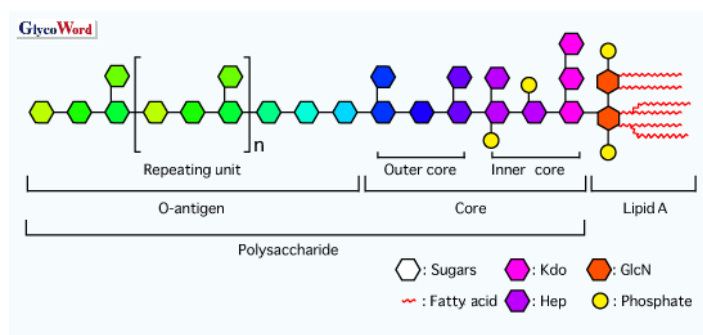
Fonte: Barros E, Manfro, RC, Thomé, FS, Gonçalves, LF, editor. Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento. Porto Alegre: Artmed; 2006. p. 418.

1.4 Endotoxemia na Doença Renal Crônica

1.4.1 LPS e Endotoxinas

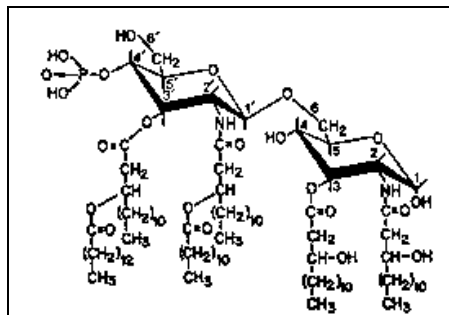
O lipopolissacarídeo (LPS) é uma macromolécula (peso molecular > 200.000 D) (22) considerada o principal componente externo da parede celular das bactérias Gram negativas. Quando se tem bacteremia e as bactérias morrem ou crescem, liberam estes fragmentos na circulação. A estrutura química do LPS (Fig. 2) mostra uma molécula anfipática que consiste de uma porção polissacarídica hidrofílica nas regiões core e antígeno-O, e uma porção ancorada hidrofóbica conhecida como Lipídeo A. O antígeno-O é composto de uma seqüência de unidades repetidas de oligossacarídeos específicos para cada cepa ou espécie de bactéria, responsável pela classificação sorológica da bactéria Gram negativa. A região central é um oligossacarídeo contendo resíduos de açúcares característicos, Kdo e heptose, sendo sua variação química mais limitada. Esta região é conhecida por suas propriedades imunogênicas. O Lipídeo A (Fig. 3), composto de uma diglicosamina fosforilada com resíduos acil, é conhecido como endotoxina (ET), sendo o centro primário imunoestimulatório do LPS, ou seja, é um forte estimulador da imunidade inata no hospedeiro e responsável pela toxicidade da ET (23).

Figura 2. Estrutura química do LPS



Fonte: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*

Figure 3. Estrutura do Lipídeo A



Fonte: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*

1.4.2 Translocação de Endotoxinas na DRC

A HAS é uma das principais manifestações dos pacientes com DRC, caracterizada pelo volume circulante excessivo. O excesso de volume circulante quase sempre está relacionado ao aparecimento de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e edema agudo de pulmão. Os pacientes com ICC desenvolvem sobrecarga de volume com edema generalizado e apresentam sinais de inflamação sistêmica que parecem ser reduzidos pela compensação da doença (24).

A determinação da sobrecarga de volume pode ser avaliada por vários métodos, como pela análise ecográfica do diâmetro da veia cava inferior (DVCI), método não invasivo, amplamente disponível, de fácil realização técnica e que se correlaciona com a pressão atrial direita (PAD) e com o volume de sangue circulante nos pacientes em diálise (25, 26). Sugeriu-se que a sobrecarga de volume estaria associada com sinais de inflamação sistêmica e endotoxemia, o que seria agravado na progressão da DRC, ou seja, à medida que a disfunção renal compromete a capacidade renal de excreção de sal e água (27). O estado inflamatório parece estar associado com uma alteração na permeabilidade da barreira intestinal, como consequência do edema, permitindo a translocação de macromoléculas para a circulação, incluindo LPS (27). Há evidência de injúria na barreira intestinal em uremia, tanto experimental quanto humana (28-30).

Sugere-se que pacientes com DRC desenvolvem resposta inflamatória que pode estar associada com uma permeabilidade alterada da parede intestinal, permitindo a translocação de macromoléculas e o desenvolvimento de endotoxemia. Assim, a ET presente na circulação atua como fator pró-inflamatório a partir do lipídeo A ativando macrófagos, neutrófilos e células endoteliais, assim gerando mediadores inflamatórios.

1.4.3 Endotoxinas como um fator desencadeador da Inflamação na DRC

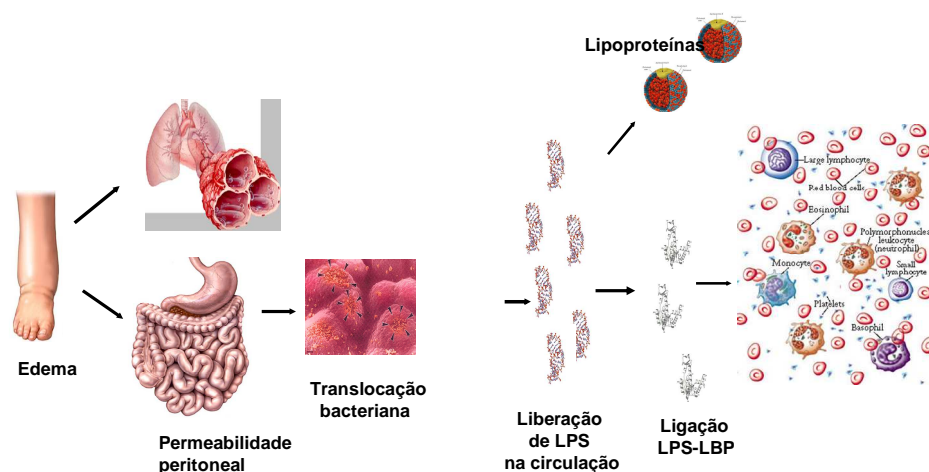
Como consequência da presença de ET circulantes, o sistema imune pode ser ativado, gerando um estado inflamatório crônico. Esta alteração na volemia dos pacientes com DRC tem sido proposta como um estímulo para ativação da resposta inflamatória devido à translocação de macromoléculas a partir do intestino edematoso (27). Estudo experimental utilizando modelo com ratos urêmicos, situação comprovada por níveis elevados de uréia, creatinina e potássio em comparação aos ratos controles, mostrou translocação bacteriana e sinais de inflamação mais freqüentes nos animais urêmicos do que nos controles. Concluiu-se que a mucosa intestinal foi danificada ocorrendo translocação bacteriana em uremia experimental (31). Assim, se a sobrecarga de volume está associada com ativação imune (32), esta ativação ocorre devido à translocação de bactérias ou ET em pacientes com edema intestinal severo resultante da sobrecarga de volume (33). A ET circulante permite um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias (34). Os pacientes com ICC apresentam concentração aumentada de ET e citocinas durante a exacerbação aguda edematosa caracterizada por edema generalizado (32). Após o tratamento com diuréticos e a compensação clínica, observou-se uma redução significativa na concentração de mediadores inflamatórios.

Como a ET é um fragmento bacteriano, apresenta uma importante característica antigênica, visto que é reconhecida por inúmeros componentes do sistema imune inato e adaptativo. Sendo assim, a ET sozinha é responsável pelo início da resposta imune (35), (36), (37). Inicialmente, demonstrou-se uma via de

sinalização evolucionariamente conservada que apresenta receptores celulares de reconhecimento de padrão, como a família dos receptores semelhantes a Toll ou *Toll-like receptors* (TLR) que são ativados por LPS. Na circulação, a ET se liga a lipoproteínas ou a uma proteína ligante de LPS (LBP), formando o complexo LPS–LBP. O complexo formado ativa os TLR, mais especificamente o TLR4, nas células do sistema imune, cardiomiócitos e células endoteliais. O TLR4 em associação com o seu co-receptor, MD-2, é responsável pelas respostas a LPS. Esta resposta celular é mediada pelo CD14, um co-receptor transmembrana ancorado nos monócitos, macrófagos e neutrófilos. O LBP conduz as endotoxinas ao CD14 ancorado na superfície de células mononucleares que entram em contato com o TLR4 e a proteína MD-2, permitindo a ativação do NFκB que apresenta importante função na ativação das vias citoplasmáticas de transcrição, ocorrendo a transcrição de genes inflamatórios no núcleo de várias linhagens celulares, a partir de uma resposta imune inata. Em recente estudo, um grupo associou níveis de CD14 solúvel (sCD14) e mortalidade nos pacientes submetidos à diálise, mostrando níveis elevados de sCD14 positivamente relacionados com marcadores de inflamação e negativamente relacionados ao estado nutricional, considerando o sCD14 como um preditor independente de mortalidade (38). O mesmo grupo, em estudo adicional, associou sCD14 como marcador de ativação do sistema ET/TLR4 e mortalidade neste grupo de pacientes (39).

Apesar da associação entre sinais de sobrecarga de volume e marcadores de inflamação sistêmica não ter sido observada no estudo de Gonçalves *et al.*, correlacionou-se sinais de sobrecarga de volume com a presença de ET na circulação dos pacientes com DRC (27). Apesar de serem dados indiretos, é possível relacionar endotoxemia com uma possível permeabilidade aumentada do lúmen intestinal. Assim, a associação entre endotoxemia e inflamação sistêmica pode estar relacionada ao fato dos níveis de PCR, fibrinogênio e albumina representarem causas multifatoriais nos pacientes com DRC (6) (40) o que possivelmente explica as complicações nos pacientes com DRC (Fig. 4).

Figura 4. Conseqüências da hipervolemia e translocação bacteriana nos pacientes com DRC



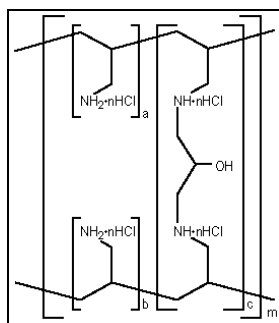
Fonte: slide apresentado por Pecoits-Filho, 2006.

1.5 Carbonato de Sevelamer

1.5.1 Descrição

O carbonato de sevelamer é um polímero catiônico não absorvível, cuja estrutura química é representada por uma polialilamina-carbonada livre de alumínio e cálcio que se liga ao fosfato (Fig.5). É ligado por múltiplas aminas espaçadas por moléculas de carbono que se tornam parcialmente carregadas de prótons no intestino e interagem com moléculas de ânion fosfato através da carga e da ligação com hidrogênio.

Figura 5. Estrutura química do sevelamer



Fonte: Disponível em <http://www.genzyme.com>

1.5.2 Uso clínico do Carbonato de Sevelamer na Doença Renal Crônica

Este grupo de pacientes apresenta anormalidades do metabolismo mineral que incluem alterações nos níveis de cálcio (Ca), de fósforo (P) e do hormônio paratireóide (PTH), pois os pacientes mantidos em constante hemodiálise apresentam envolvimento ósseo severo que se manifesta como uma osteodistrofia renal (41). A hiperfosfatemia nos pacientes com DRC, se não tratada, resulta em hiperparatireoidismo, osteodistrofia renal e calcificação metastática de vasos sanguíneos e tecidos adjacentes. O tratamento da hiperfosfatemia inclui diálise, restrição dietética de fósforo, uso de quelantes de fósforo e análogos da vitamina D. O uso de quelantes de fósforo baseia-se nas características dos pacientes, incluindo a tolerância individual e as dosagens séricas de P, Ca e PTH (42). O carbonato de sevelamer (Renagel[®]) é um quelante de fósforo efetivo, utilizado na dose média de 3,5g/dia dividido em 3 doses às refeições e com efeito similar ao obtido com sais de cálcio, além de não apresentar os efeitos colaterais destes últimos como elevação do produto cálcio x fósforo, hipercalcemia, calcificação vascular, músculo-esquelética e cardíaca.

Os quelantes à base de hidróxido de alumínio tendem a acumular-se nos tecidos de pacientes com insuficiência renal e está associado com significativa toxicidade. O uso crônico pode resultar em anemia, osteomalácia, miopatia e demência (43-45). Os quelantes à base de carbonato de cálcio podem levar a um maior risco de calcificação metastática e hipercalcemia, além de depender do pH

gástrico para dissolução e reduzir a absorção do ferro (46-48). Com o uso do sevelamer reduziu-se o uso de quelantes de fósforo à base de sais de cálcio e de alumínio, permitindo uma diminuição dos seus efeitos colaterais (49). O sevelamer apresenta importante valor terapêutico para controlar a hiperfosfatemia, mantendo um equilíbrio no metabolismo do Ca e P (50), reduzindo de maneira significativa os níveis de LDL colesterol em aproximadamente 30% dos pacientes e prevenindo um aumento excessivo na concentração do PTH nos pacientes com DRC (51).

Apesar de ser utilizado originalmente como quelante de fósforo, o carbonato de sevelamer possui capacidade de ligação inespecífica. Liga-se preferencialmente a ânions trivalentes, como fosfato e citrato; e a ácidos biliares e aminoácidos conjugados carregados negativamente que estão abundantes no intestino durante as refeições. A ligação do sevelamer com ácidos biliares leva ao aumento da excreção fecal destes ácidos e reduz a concentração sérica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL colesterol). Liga-se também a outros ânions inorgânicos tais como o ácido úrico (52). Quando administrado concomitantemente com ciprofloxacina e tiroxina, pode reduzir a biodisponibilidade destas drogas (53) (54). Verificou-se a associação entre sevelamer e outros quelantes à base de cálcio com determinação de perfil lipídico e proteína C reativa (PCR) como marcador inflamatório em um grupo de pacientes dialíticos. Observou-se uma menor concentração sérica de LDL colesterol e de PCR nos pacientes que utilizaram sevelamer em comparação aos que utilizaram quelantes à base de cálcio (55).

1.5.3 Potencial uso do Carbonato de Sevelamer como ligante de endotoxinas

A hipótese de que o sevelamer se liga a ânions inespecíficos foi investigada em um estudo *in vitro* que utilizou soluções padrões de *E. coli* purificada e soluções de sevelamer em concentrações conhecidas. Determinaram-se os níveis de ET livre nos sobrenadantes e os resultados mostraram a redução destes níveis por

ensaio direto. Este estudo sugere que o sevelamer liga-se a ET e conseqüentemente, suporta a hipótese de redução de inflamação sistêmica (56).

Encontrou-se também relação entre endotoxemia e pacientes em pré-diálise, sendo que o grau de ET circulante foi relacionado à severidade de inflamação sistêmica e sinais de aterosclerose (57). Da mesma forma, em uma avaliação transversal de pacientes em hemodiálise aqueles indivíduos recebendo sevelamer apresentaram níveis circulantes de ET significativamente mais baixos em relação aos níveis encontrados em pacientes utilizando outros quelantes de fósforo (58). Como resultado do seu conteúdo fosfolipídico, a ET apresenta baixo ponto isoelétrico, sendo, portanto carregada negativamente em pH fisiológico (56). Sendo o sevelamer um polímero catiônico inespecífico, poderia formar um complexo não absorvível de sevelamer-endotoxina por meio de interação iônica entre o sevelamer e o grupo fosfato do lipídeo A e, assim, eliminado via intestinal.

O presente estudo pretendeu avaliar as associações entre disfunção renal e endotoxemia, e especificamente verificar a capacidade de ligação do sevelamer a ET em modelo experimental de DRC para verificar o efeito do sevelamer na redução da translocação bacteriana, endotoxemia e inflamação. Para tanto, ratos machos Wistar foram submetidos à técnica de ablação renal para o desenvolvimento de uremia e pesquisa de translocação bacteriana, com determinação de endotoxemia após a administração de sevelamer em comparação ao grupo controle. O TNF α , considerado um produto de expressão da inflamação, é considerado um bom marcador inflamatório em ratos, o que justificou sua dosagem como mediador neste trabalho.

A partir desta hipótese, o uso do sevelamer poderia ser uma alternativa terapêutica para reduzir a endotoxemia e a inflamação, reduzindo os níveis de mortalidade por DCV. Assim, pretendeu-se propor mecanismos para a redução da endotoxemia e da tendência em desenvolver resposta inflamatória e suas complicações já citadas anteriormente, abrindo oportunidades para a investigação de novas estratégias terapêuticas com a utilização do sevelamer em pacientes com DRC e endotoxemia relacionada.

2. OBJETIVOS

- Utilizar um modelo experimental de insuficiência renal em ratos Wistar para o estudo da inflamação na DRC por meio da técnica de nefrectomia subtotal;
- Demonstrar *in vivo* que a DRC induz translocação de endotoxinas e inflamação sistêmica;
- Testar se o uso de carbonato de sevelamer reduz os níveis de endotoxemia e de TNF α circulantes nos animais com DRC.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 Estudo em Modelo Animal

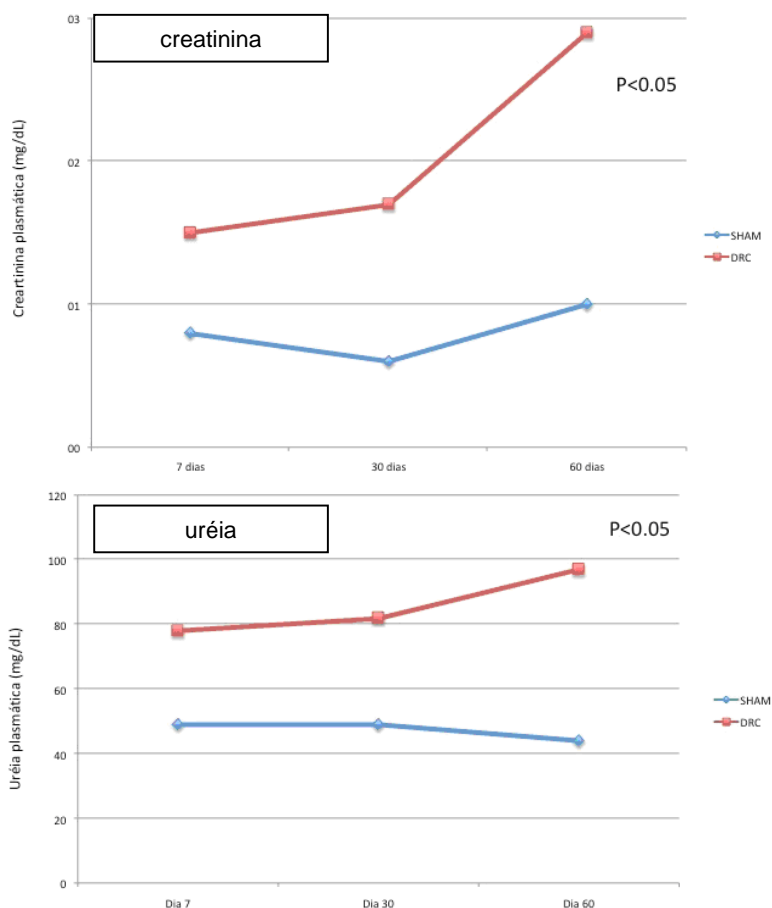
3.1.1 Submissão ao Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa para Animais (CEUA) da PUCPR, e se encontra aprovado sob parecer nº202/7 CEUA PUCPR e registro nº 220 de acordo com os procedimentos padrão para manipulação e cuidado de animais de laboratório.

3.1.2 Desenvolvimento do Projeto Piloto

O projeto piloto utilizou um modelo animal de DRC com 10 ratos machos Wistar pesando em torno de 260 gramas (g). Os animais foram submetidos à ablação renal (conforme descrito no item 3.1.3). As amostras foram coletadas após 7, 30 e 60 dias (conforme descrito no item 3.1.3) e as dosagens de uréia e creatinina foram realizadas para comprovar a eficácia da ablação renal em submeter os animais a um estado urêmico. Os resultados mostraram a indução de insuficiência renal pelos níveis aumentados de uréia e creatinina nos animais submetidos à cirurgia de ablação em comparação ao controle (Fig. 6).

Figura 6. Concentração plasmática de creatinina e uréia nos grupos estudados de acordo com os tempos de seguimento 7,30 e 60 dias (n=13).



Nota: Valores de $p < 0,05$ (5%) indicaram significância estatística.

3.1.3 Realização da Ablação Renal e Indução da Uremia

Foram utilizados 46 ratos machos Wistar com peso entre 218 a 312 g para o desenvolvimento da DRC e formação dos grupos de estudo. Foi realizada a indução de insuficiência renal crônica da seguinte maneira: o animal foi anestesiado com cloridrato de ketamina (Vetanarcol^R 50 mL König 50 mg/Kg) e

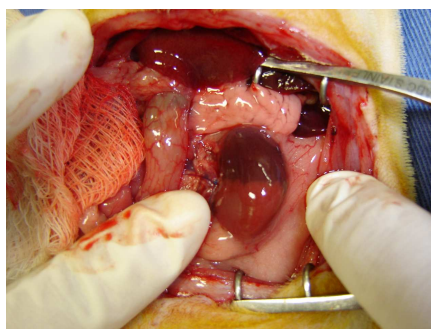
cloridrato de xilasina (Anasedan^R 10 mL Vetbands 10 mg/Kg) e procedimento cirúrgico de ablação renal foi realizado com nefrectomia subtotal, ou seja, foram ligadas as artérias renais mediana e posterior do rim esquerdo, assegurando um infarto de pelo menos 2/3 do rim (Fig. 7), e foi removido o rim direito em nefrectomia total (Fig. 8), para induzir DRC que começa a se estabelecer com 8 dias após a cirurgia (59-61). Foi administrado paracetamol (Tylenol bebê gotas^R) via oral após a cirurgia. Foi submetido o grupo SHAM à anestesia e à manipulação dos pedículos renais, sem remoção de massa renal. Após o procedimento, os animais retornaram às suas gaiolas originais com livre acesso à água e à ração. Mantiveram-se os animais a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ sob ciclo noite-dia (12:12 h) por um período de 60 dias. Após as coletas de sangue, realizaram-se dosagens de uréia (Kit Uréia CE por Reação Colorimétrica – Labtest), fósforo (Kit Fósforo por Reação Colorimétrica – Labtest) e cálcio (kit Biotecnica^R Mindray BS-300 Chemistry Analyser). Animais do grupo SHAM com dosagem média ≥ 60 mg/dL e os animais do grupo CKD com dosagem média ≤ 80 mg/dL foram excluídos do estudo (Tabela 2).

Tabela 2 . Dosagens de uréia (mg/dL) realizadas nos dias 7, 30 e 60.

CKD (n=22)	Uréia			Média	SHAM (n=21)	Uréia			Média
	7	30	60			7	30	60	
6*	131	116	115	120	2	50	49	59	53
7*	249	239	312	266	3*	58	60	56	58
8	56	69	71	65	4*	50	49	51	50
11	85	89	63	79	9	52	67	69	63
12	72	82	93	83	10*	51	52	54	52
13*	147	142	123	137	14*	42	51	32	42
16	75	78	99	84	15*	43	48	38	43
17	213	óbito	óbito	213	19*	36	50	58	48
18*	132	98	144	125	20	48	47	64	53
21	116	óbito	óbito	116	23*	48	49	62	53
22*	115	108	101	108	24*	36	41	88	55
25	78	69	98	82	27*	43	61	70	58
26	104	65	78	82	28	39	47	59	48
31*	107	129	181	139	29*	41	41	51	44
32*	82	124	93	100	30	41	44	69	51
33*	127	120	273	173	34*	52	33	63	49
37	68	61	72	67	35*	61	32	55	49
38*	121	130	72	107	36*	44	36	53	44
39*	151	174	93	139	41*	41	39	35	39
42*	77	77	108	87	45	30	38	63	43
43	58	74	86	73	46*	45	43	50	46
44*	98	73	90	87					

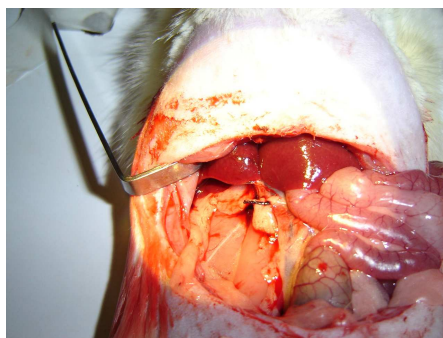
Nota: * Animais selecionados para análise estatística pelos valores de uréia (mg/dL). Os ratos 1, 5 e 40 foram a óbito após a cirurgia.

Figura 7. Infarto renal subtotal de rim esquerdo



Fonte: Cirurgia de ablação renal realizada na Técnica Operatória da PUCPR.

Figura 8. Nefrectomia total de rim direito



Fonte: Cirurgia de ablação renal realizada na Técnica Operatória da PUCPR.

3.1.4 Caracterização da Endotoxemia e da Resposta Inflamatória

Foram realizadas coletas por punção intracardíaca após anestesia dos animais com cloridrato de ketamina (Vetanarcol^R 50 mL König 50 mg/Kg) e cloridrato de xilasina (Anasedan^R 10 mL Vetbands 10 mg/Kg). As coletas foram realizadas nos dias 7, 30 e 60 após cirurgia. Foram coletadas amostras sem anticoagulante e estocadas após centrifugação para obtenção de soro em frascos livres de endotoxinas a -80°C para a realização das análises. As dosagens de ET foram realizadas utilizando o método LAL (Kit *Limulus Amebocyte Lysate* – LAL – Ensaio cromogênico de ponto final, *Hycult Biotechnology* – Caltag). O princípio do teste está baseado na capacidade da ET causar opacidade e geleificação em LAL revelado e quantificado por reação enzimática. A técnica utiliza 50 uL de soro adicionado em cada poço da placa e adicionado de 50 uL de reagente LAL reconstituído. Na presença de um substrato incolor, a reação enzimática desenvolve cor amarela proporcional a quantidade de ET. A reação é interrompida pela adição de ácido acético e as leituras são realizadas em 405 nm. A concentração de ET é determinada por meio de curva de calibração a partir dos valores dos padrões. O método apresenta linearidade entre 0,01 a 10 UE/mL e sensibilidade $\geq 0,01$ UE/mL, apresentando-se satisfatório para as análises realizadas, apesar de não apresentar amostra-controle.

Para as dosagens de TNF α foi utilizada microplaca pelo método *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), por meio da técnica imunoenzimática de sanduíche com anticorpo policlonal específico para a citocina TNF α em ratos (Kit TNF-alpha / TNFSF1A Quantikine Elisa). A placa é sensibilizada com anticorpo monoclonal específico para TNF α de rato. Os padrões, o controle e as amostras são pipetados nos poços e qualquer TNF α presente é ligado pelo anticorpo imobilizado. Após sucessivas lavagens, as substâncias não ligadas são retiradas. Uma enzima ligada a um anticorpo policlonal específico para TNF α ratos é adicionada aos poços e após lavagem para a retirada do reagente enzima-anticorpo policlonal não ligado, o substrato é adicionado formando um produto colorido azul. A reação é interrompida pela adição de ácido acético e ocorre formação de cor amarela proporcional à concentração do TNF α . As leituras espectrofotométricas são realizadas em 450 nm e os resultados são determinados por meio de curva padrão em pg/mL. O método apresenta linearidade entre 12,5 a 800 pg/mL e sensibilidade ≥ 5 pg/mL. O método mostrou-se satisfatório e as amostras-controle apresentaram-se dentro da faixa de referência. Os animais submetidos à nefrectomia subtotal, apresentaram níveis mais elevados de TNF α em relação ao grupo controle.

3.1.5 Pesquisa da Translocação Bacteriana

Após o período de 60 dias, foi realizada a pesquisa de translocação bacteriana nos grupos 01, 02, 03 e 04. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (Vetanarcol^R 50 mL König 50 mg/Kg) e cloridrato de xilasina (Anasedan^R 10 mL Vetbands 10 mg/Kg). Foi realizada a assepsia na região torácica e abdominal do animal usando polivinilpirrolidona-iodo (PVPI). As amostras de sangue foram coletadas por punção intracardíaca, sendo que, para realizar a eutanásia foi retirado o máximo de sangue do animal (cerca de 08 a 10 mL). Imediatamente, foi semeado em duplicata 1ml de sangue no meio de cultura *Brain Hearth Infusion* (BHI) e mantido a 37°C por 7 dias para realizar a hemocultura. A região torácica e abdominal do animal foi tricotomizada e descontaminada com

PVPI. O diafragma do animal foi aberto para a coleta do coração estocado em formol e devidamente identificado para futuros trabalhos. Foi aberta com auxílio de pinça e tesoura esterilizadas toda a musculatura abdominal. Com outros jogos de pinças e tesouras esterilizadas, foram coletadas as vísceras de interesse seguindo a ordem: fígado, baço, rins, linfonodos mesentéricos e por último o segmento intestinal. As amostras coletadas foram acondicionadas individualmente em meios de transporte estéreis (Caldo simples tubo – Newprov).

A avaliação da translocação bacteriana teve como princípio o isolamento das bactérias entéricas *Escherichia coli* e *Enterococcus sp* em amostras de sangue e macerados de vísceras abdominais. As amostras foram preparadas sob estritas condições de assepsia em câmara de fluxo laminar. Cada órgão foi triturado separadamente em gral com pistilos estéreis. O macerado foi diluído em 5ml de água peptonada a 10% e semeado nos meios de cultura específicos para o cultivo e identificação bacteriana.

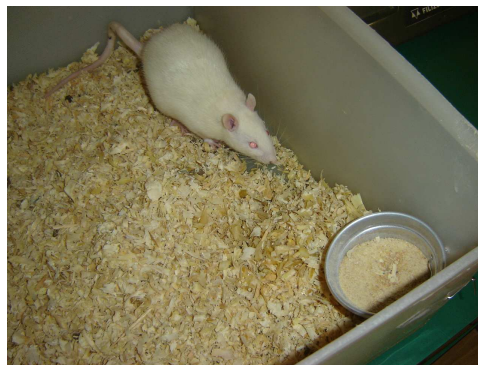
Para a pesquisa de *Escherichia coli*, foi empregado o meio de MacConkey (Newprov^R), após incubação por 24 horas à 37°C e foi verificada a presença de colônia lactose positiva característica de *E. coli*. Assim, as colônias típicas foram submetidas à identificação bioquímica após incubação por 24 horas à 37°C, utilizando-se um esquema de identificação para Bactérias Gram Negativas fermentadoras de glicose (Newprov^R). Para a pesquisa de *Enterococcus sp*, utilizou-se placa de Bile Esculina (Newprov^R). Ao término da incubação por 24 horas à 37°C as colônias típicas de *Enterococcus sp* escurecem o meio. Para comprovar a prova da catalase foi realizada em lâmina.

As hemoculturas apresentaram resultados negativos para todos os animais sugerindo a ausência de bacteremia. Os resultados dos intestinos foram considerados controle positivo, sendo que houve crescimento bacteriano em todas as amostras. Os demais resultados não apresentaram correlação estatística.

3.1.6 Desenho do estudo da Intervenção com Carbonato de Sevelamer

Conforme descrito acima, os animais foram divididos em 04 grupos com cerca de 10 animais cada. Nos grupos DRC+Sev e SHAM+Sev, os animais utilizaram carbonato de sevelamer adicionado 3% à ração. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais e o modelo de *pair feeding* foi utilizado para controlar a ração, ou seja, os animais foram pesados a cada dois dias e a ração pesada e repostada para cada animal separadamente (Fig. 9).

Figura 9. Animal mantido isolado para controle da dieta



Fonte: foto tirada do Biotério da PUCPR

4. ARTIGO

Hauser AB, Azevedo I, Gonçalves S, Stinghen A, Aita C, Pecoits-Filho, R. **Sevelamer carbonate alleviates inflammation and endotoxemia induced by renal dysfunction.** Submitted to Nephrology Dialysis Transplantation, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DRC é uma doença com múltiplas causas, progressiva e irreversível com o envolvimento de resposta inflamatória, cujos mecanismos desencadeantes ainda não se encontram bem elucidados. A ativação crônica do sistema imune está intimamente ligada às complicações da DRC que representam importantes indicadores de mortalidade por DCV e doenças infecciosas nestes pacientes (16).

Atualmente, a resposta celular ao estado urêmico na DRC tem sido motivo de estudo, sendo que foi sugerido que a sobrecarga de volume estaria associada com sinais de inflamação sistêmica e endotoxemia, o que seria agravado na progressão da DRC, ou seja, à medida que a disfunção renal compromete a capacidade renal de excreção de solutos e água (27). O estado inflamatório parece estar associado com uma alteração na permeabilidade da barreira intestinal, como consequência da DRC, permitindo a translocação de macromoléculas para a circulação, incluindo LPS (27).

O resultado negativo das hemoculturas mostrou ausência de bactérias na circulação, entretanto a presença de fragmentos bacterianos ou ET no sangue é possível devido à translocação de macromoléculas a partir do intestino edematoso, com consequência de processos isquêmicos ou por meio da recirculação hepática, outras hipóteses comentadas no artigo.

Os níveis de TNF α elevados no grupo DRC em comparação ao grupo SHAM, sugerem resposta inflamatória, que teoricamente estaria acompanhada de elevação de níveis circulantes de PCR. Apesar dos níveis de PCR serem maiores no grupo DRC nos dias 30 e 60 em relação ao SHAM, não houve diferença estatisticamente significativa. Tal fato pode ter ocorrido devido a limitações técnicas, haja vista a determinação de PCRas não ser utilizada largamente como marcador inflamatório em modelo experimental, talvez devido sua inespecificidade em ratos, podendo apresentar resultados mais elevados em animais SHAM.

Os níveis elevados de TNF α no grupo DRC foram acompanhados pelos níveis elevados de ET, sendo que no dia 30 apresentou correlação estaticamente

significativa, o que não ocorre no dia 60 sugerindo talvez um mecanismo de adaptação a resposta inflamatória.

A indução de insuficiência renal desencadeou inflamação e induziu a endotoxemia neste modelo de uremia experimental, que foram reduzidos parcialmente por tratamento com sevelamer. Tais dados sugerem que o carbonato de sevelamer poderia induzir efeitos anti-inflamatórios por meio da redução de translocação de ET a partir do intestino.

Este trabalho indica a necessidade de futuras investigações em estudos experimentais e clínicos para elucidar os mecanismos ativadores da resposta inflamatória nos pacientes com DRC, assim como o potencial uso de carbonato de sevelamer como agente anti-inflamatório.

6. CONCLUSÕES

- O modelo *in vivo* desenvolvido mostrou que a DRC induz translocação de endotoxinas e resposta inflamatória, comprovados pelas dosagens de ET e TNF α ;
- O uso de carbonato de sevelamer reduziu parcialmente os níveis de endotoxemia e de TNF α circulantes nos animais com insuficiência renal.

7. OUTROS ARTIGOS RELACIONADOS AO PROJETO

7.1 Artigo 1

Hauser AB, Stingham AE, Kato S, Bucharles S, Aita C, Yuzawa Y, et al.

Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. Perit Dial Int. 2008 Jun;28 Suppl 3:S183-7.

7.2 Artigo 2

Sevelamer decreases systemic inflammation through its endotoxin binding affects

Stinghen, A.; Gonçalves, S. M.; Bucharles, S.; Branco, F. S.; Gruber, B.; Hauser, A.B. and Pecoits-Filho, R. (Submitted to Blood Purification)

7.3 Artigo 3

A Gut Feeling on Endotoxemia: Causes and Consequences in Chronic Kidney Disease

Hauser, A.B.; Stinghen, A.; Gonçalves, S.M.and Pecoits-Filho, R.

8. REFERÊNCIAS

1. Romão JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2004;26(3s1):26-31.
2. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1998;32(5 Suppl 3):S112-9.
3. Censo 2008 [database on the Internet]. 2008 [cited 14/10/2009]. Available from: www.sbn.org.br.
4. Barros E, Manfro, RC., Thomé, FS, Gonçalves, LF. , editor. *Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento*. Porto Alegre: Artmed; 2006.
5. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
6. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 11:28-31.
7. Pinkau T, Hilgers KF, Veelken R, Mann JF. How does minor renal dysfunction influence cardiovascular risk and the management of cardiovascular disease? *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):517-23.
8. Stenvinkel P., Ketteler M., Johnson R., Lindholm B., Pecoits-Filho P., Riella M., et al. IL-10, IL-6 and TNF- α as central factors in the altered cytokine network of ESRD - the good, the bad and the ugly. *Kidney Int*. 2005.
9. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1999;55:648-58.
10. Stenvinkel P. Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr*. 2003 Apr;13(2):144-8.
11. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation*. 2003 Jan 7;107(1):87-92.
12. 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 Jun;41(6):1212-8.
13. Abbas A.K. LAH, Pillai S., editor. *Imunologia Celular e Molecular*. 6. ed. ed; 2008.
14. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003 Oct 28;108(17):2154-69.
15. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: no longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jul;14(7):1927-39.

16. Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Bucharles S, Aita C, Yuzawa Y, et al. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit Dial Int.* 2008 Jun;28 Suppl 3:S183-7.
17. Gonzalez MA, Selwyn AP. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am J Med.* 2003 Dec 8;115 Suppl 8A:99S-106S.
18. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Oct;84(20):7251-5.
19. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1351-7.
20. Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med.* 1995 Mar 9;332(10):635-41.
21. Pereira BJ, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, Dinarello CA. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1994;45(3):890-6.
22. Hurley JC. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Apr;8(2):268-92.
23. Tortora G.J. FBR, Case C.L., editor. *Microbiologia.* 8 ed. ed; 2005.
24. Sato Y, Takatsu Y, Kataoka K, Yamada T, Taniguchi R, Sasayama S, et al. Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol.* 1999;22:811-3.
25. Mandelbaum A, Ritz E. Vena cava diameter measurement for estimation of dry weight in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11 Suppl 2:24-7.
26. Cheriex EC, Leunissen KM, Janssen JH, Mooy JM, van Hooff JP. Echography of the inferior vena cava is a simple and reliable tool for estimation of 'dry weight' in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1989;4(6):563-8.
27. 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 Oct;21(10):2788-94.
28. Magnusson M, Magnusson KE, Sundqvist T, Denneberg T. Increased intestinal permeability to differently sized polyethylene glycols in uremic rats: effects of low- and high-protein diets. *Nephron.* 1990;56(3):306-11.
29. Magnusson M, Magnusson KE, Sundqvist T, Denneberg T. Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut.* 1991 Jul;32(7):754-9.
30. Kotanko P, Carter M, Levin NW. Intestinal bacterial microflora--a potential source of chronic inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Aug;21(8):2057-60.

31. de Almeida Duarte JB, de Aguiar-Nascimento JE, Nascimento M, Nochi RJ, Jr. Bacterial translocation in experimental uremia. *Urol Res*. 2004 Aug;32(4):266-70.
32. Niebauer J, Volk H-d, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999;353:1838-42.
33. Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Poole-Wilson PA, Yusuf S. Weight loss in chronic heart failure (CHF) and the impact of treatment with ACE inhibitors. Results from the SOLVD treatment trial. *Circulation*. 1999;100:1781.
34. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. 1990;323:236-41.
35. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998 Oct;10(5):351-3.
36. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. 2000 Oct;8(10):452-6.
37. Jin MS, Lee JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 2008 Aug 15;29(2):182-91.
38. Raj DS, Carrero JJ, Shah VO, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, et al. Soluble CD14 Levels, Interleukin 6, and Mortality Among Prevalent Hemodialysis Patients. *Am J Kidney Dis*. 2009 Sep 4.
39. Raj DS, Shah VO, Rambod M, Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Association of Soluble Endotoxin Receptor CD14 and Mortality Among Patients Undergoing Hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2009 Aug 19.
40. Rauchhaus M, Coats AJ, Anker SD. The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet*. 2000 Sep 9;356(9233):930-3.
41. Ishida M, Yao N, Yachiku S, Anzai T, Kobayashi T, Ishida H. Management of calcium, phosphorus and bone metabolism in dialysis patients using sevelamer hydrochloride and vitamin D therapy. *Ther Apher Dial*. 2005 Aug;9 Suppl 1:S16-21.
42. Schucker JJ, Ward KE. Hyperphosphatemia and phosphate binders. *Am J Health Syst Pharm*. 2005 Nov 15;62(22):2355-61.
43. Alfrey AC. Aluminum toxicity in patients with chronic renal failure. *Ther Drug Monit*. 1993 Dec;15(6):593-7.
44. Druke TB, Lacour B, Touam M, Jucquel JP, Plachot JJ, Cournot-Witmer G, et al. Effect of aluminum on hematopoiesis. *Kidney Int Suppl*. 1986 Feb;18:S45-8.
45. Arieff AI. Aluminum and the pathogenesis of dialysis encephalopathy. *Am J Kidney Dis*. 1985 Nov;6(5):317-21.
46. Ramirez JA, Emmett M, White MG, Fathi N, Santa Ana CA, Morawski SG, et al. The absorption of dietary phosphorus and calcium in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 1986 Nov;30(5):753-9.
47. Sperschneider H, Gunther K, Marzoll I, Kirchner E, Stein G. Calcium carbonate (CaCO₃): an efficient and safe phosphate binder in haemodialysis patients? A 3-year study. *Nephrol Dial Transplant*. 1993;8(6):530-4.
48. Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P. Calcium supplementation: effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr*. 1991 Jan;53(1):106-11.
49. Eriguchi R, Takei S, Satou Y. [Control of calcium and phosphate in hemodialysis patients]. *Clin Calcium*. 2005 Sep;15 Suppl 1:132-7; discussion 7.

50. Sesso R, Ferraz MB. [Critical appraisal of sevelamer for the treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic renal failure]. *Rev Assoc Med Bras.* 2003 Jan-Mar;49(1):103-8.
51. Tahara H, Tsujimoto Y, Shoji T, Inaba M, Tabata T, Nishizawa Y. Introduction to sevelamer hydrochloride and its clinical effects. *Ther Apher Dial.* 2005 Aug;9 Suppl 1:S2-6.
52. Garg JP, Chasan-Taber S, Blair A, Plone M, Bommer J, Raggi P, et al. Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on uric acid concentrations in patients undergoing hemodialysis: a randomized clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2005 Jan;52(1):290-5.
53. Kays MB, Overholser BR, Mueller BA, Moe SM, Sowinski KM. Effects of sevelamer hydrochloride and calcium acetate on the oral bioavailability of ciprofloxacin. *Am J Kidney Dis.* 2003 Dec;42(6):1253-9.
54. Diskin CJ, Stokes TJ, Dansby LM, Radcliff L, Carter TB. Effect of phosphate binders upon TSH and L-thyroxine dose in patients on thyroid replacement. *Int Urol Nephrol.* 2007;39(2):599-602.
55. Shantouf R, Budoff MJ, Ahmadi N, Tiano J, Flores F, Kalantar-Zadeh K. Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on lipid and inflammatory markers in hemodialysis patients. *Am J Nephrol.* 2008;28(2):275-9.
56. Perianayagam MC, Jaber BL. Endotoxin-binding affinity of sevelamer hydrochloride. *Am J Nephrol.* 2008;28(5):802-7.
57. Szeto CC, Kwan BC, Chow KM, Lai KB, Chung KY, Leung CB, et al. Endotoxemia is related to systemic inflammation and atherosclerosis in peritoneal dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Mar;3(2):431-6.
58. Sun PP, Perianayagam MC, Jaber BL. Sevelamer Hydrochloride Use and Circulating Endotoxin in Hemodialysis Patients: A Pilot Cross-Sectional Study. *J Ren Nutr.* 2009 May 21.
59. Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, Malheiros DM, Noronha Ide L, de Nucci G, et al. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 May;286(5):F945-54.
60. Fujihara CK, Avancini Costa Malheiros DM, de Lourdes Noronha II, De Nucci G, Zatz R. Mycophenolate Mofetil Reduces Renal Injury in the Chronic Nitric Oxide Synthase Inhibition Model. *Hypertension.* 2001 Jan;37(1):170-5.
61. Fujihara CK, Mattar AL, Vieira JM, Jr., Malheiros DM, Noronha Ide L, Goncalves AR, et al. Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Sep;13(9):2278-87.