



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

**Efeito da uremia na Eriptose, na Modulação de
Monócitos e no Processo de Eritrofagocitose**

NOME: NATALIA BORGES BONAN
ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANDRÉA NOVAIS MORENO AMARAL
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO PECOITS FILHO

CURITIBA
MARÇO/ 2013



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

**Efeito da uremia na Eriptose, na Modulação de
Monócitos e no Processo de Eritrofagocitose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Dra. Andréa Novais
Moreno Amaral
Co-orientadora: Dr. Roberto Pecoits
Filho

CURITIBA
MARÇO/ 2013

Dedicatória

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, Luiz Carlos e Marivone, e minha tia, Erony, por quem tenho muita admiração, e sem os quais não teria conhecido o prazer dessa conquista..

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Andréa Novais Moreno Amaral, que confiou no meu trabalho aceitando-me como orientada. Pela dedicação, atenção e incentivo sempre demonstrado, dispondo do seu tempo corrigindo, sugerindo, ensinando muito além do conhecimento científico. E pelo conhecimento técnico-científico repassado nesses anos de convívio, muito importantes para minha formação.

Ao Professor Doutor Roberto Pecoits-Filho, meu co-orientador, pelas sugestões sempre muito relevantes ao progresso do trabalho, e por dispor de sua equipe auxiliando na triagem e recrutamento dos pacientes para o estudo.

À Professora Doutora Selene Elifio Esposito, pela disponibilidade e atenção sempre demonstradas, além dos conhecimentos divididos sempre muito relevantes para conclusão do trabalho.

À Mestre Andréa Chaud Hallvass pelo comprometimento e auxílio no recrutamento dos pacientes do estudo e coleta do material, e pela disponibilidade sempre demonstrada principalmente nas fases finais do estudo.

À toda equipe do laboratório, que estiveram sempre ao meu lado torcendo por cada ensaio, e por toda amizade e companheirismo demonstrados verdadeiramente durante todo desenvolvimento do trabalho. Em especial meus colegas Thiago Maass Steiner, Marina Azevedo, Marcela Dias, Elis Demenech e Fernanda Brehm que além da amizade e companheirismo, sempre presentes no convívio do laboratório, foram cruciais no desenvolvimento dos ensaios através do auxílio técnico e científico.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, em especial a Alcione Slugovieski, pela atenção e apoio.

À equipe técnica do Núcleo de Investigação Molecular Avançada, em especial Irenice Cairo da Silva e Ligia Maria Claro, pelos conhecimentos técnicos compartilhados e disponibilidade e atenção sempre demonstradas.

Ao grupo do Renal Research Institute de Nova York, em especial Doutor Peter Kotanko e Doutora Viktoriya Kuntsevich, pelo auxílio na discussão dos resultados e pela colaboração.

À CAPES pela bolsa cedida no período de 2012-2013.

À toda minha família por não medirem esforços para que esse sonho se concretizasse, pela compreensão e paciência nos momentos de ausência e pelas palavras de conforto a cada dificuldade.

E em especial ao meu pai Luiz Carlos, minha tia Erony e meus avós José Antonio e Lydia, pelos ensinamentos de vida compartilhados, mostrando-me que nada é impossível quando se tem fé, amor e sonhos, e inestimável apoio tornando fácil o sucesso diante das dificuldades no decorrer do trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC).....	1
1.2 MEIO URÊMICO E AS TOXINAS URÊMICAS.....	3
1.3 ANEMIA E A DRC	4
1.4 A MODULAÇÃO DE MONÓCITOS ATÍPICOS NA DRC.....	11
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 PACIENTES E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	17
3.1.1 <i>Critérios de inclusão</i>	17
3.1.2 <i>Coleta de sangue periférico para obtenção do soro</i>	18
3.1.3 <i>Pools de soro urêmico</i>	18
3.1.4 <i>Concentrações de p-Cresol</i>	18
3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PARA ESTUDO.....	19
3.2.1 <i>Eritrócitos</i>	19
3.2.2 <i>Monócitos de Sangue Periférico</i>	19
3.3 EXPRESSÃO DE FOSFATIDILSERINA (FS) EM ERITRÓCITOS- ERIPTOSE.....	19
3.4 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DOS MONÓCITOS NO PERFIL CD14+/CD16+	20
3.5 ENSAIO DE ERITROFAGOCITOSE	20

3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5	CONCLUSÕES.....	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama da Regulação da Eritropoiese.....	6
Figura 2 – Resumo das diferenças funcionais entre as subpopulações de monócitos do sangue periférico.....	12
Figura 3 – Eriptose avaliada pela expressão de FS em eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis (CS) e pacientes renais crônicos (DRC)..	23
Figura 4 – Eriptose promovida pela uremia e pela toxina pC em eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis observada pela expressão de FS de superfície.....	25
Figura 5 – Avaliação de monócitos CD14+/CD16% presentes no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CS) e pacientes renais crônicos (DRC)....	26
Figura 6 – Modulação da subpopulação de monócitos CD14+/CD16+ induzida pela uremia e pela toxina urêmica pC em células obtidas de indivíduos saudáveis.	28
Figura 7 – A uremia e a toxina urêmica pC induzem aumento da fagocitose de eritrócitos em eriptose por monócitos controles.	30
Figura 8 – Monócitos estimulados previamente com <i>pool</i> de soro urêmico ou com a toxina pC são capazes de fagocitar eritrócitos controles.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos solutos de retenção urêmica.....	4
--	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFU-ES – Unidades formadoras de colônias eritróides
CS – Controle Saudável
DRC – Doença Renal Crônica
DRC – Doentes Renais Crônicos não dialíticos
EPO – Eritropoetina
FS – Fosfatidilserina
HD – Hemodiálise
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HUVEC – Células Endoteliais de veia umbilical Humana
Ig-G – Imunoglobulina G
INF- γ – Interferon Gamma
IL-2 (6,10,12) – Interleucina- 2 (6,10,12)
LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico
LPS – Lipopolissacarídeo
PAF – Fator Ativador de Plaquetas
PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada
p-C – p-Cresol
PTH – Hormônio paratireóide
SI – *Pool* de Soro Urêmico estadio 1 e 2
SII – *Pool* de Soro Urêmico estadio 3 e 4
SIII – *Pool* de Soro Urêmico estadio 5 e 6
TA – Temperatura Ambiente
TLR2 (4) – *Toll Like Receptor 2* (4)
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RESUMO

Anemia é uma complicação comum em pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) e tem como principais causas a deficiência de ferro e falha na produção de eritropoetina. Porém, a uremia interfere na estrutura de membrana celular dos eritrócitos o que resulta no aumento da exposição de fosfatidilserina (FS), diminuindo a sobrevivência destas células e aumentando a sua remoção por eritrofagocitose e digestão por monócitos/macrófagos. Além disso, foi descrito em pacientes com DRC aumento na subpopulação de monócitos atípicos CD14+/CD16+ e estes apresentam perfil pró-inflamatório e aumento da atividade fagocítica. O presente estudo teve como objetivo avaliar comparativamente o efeito da uremia e da toxina urêmica p-Cresol na indução de eritose, modulação de monócitos e relação dessas células com a eritrofagocitose. Neste estudo foram analisadas células sanguíneas de 5 pacientes com DRC em progressão (DRC) e de 5 indivíduos saudáveis (CS). Para ensaios realizados com células de CS, estas foram tratadas com RPMI para controle negativo, p-Cresol (pC) nas concentrações 10, 25 e 50 µg/ml ou pool de soros urêmicos por 48 h a 37°C. Para ensaios com células de pacientes, estas após obtenção foram imediatamente imunomarcadas. Assim, para avaliar a eritose, eritrócitos de ambos os grupos foram marcados com Anexina V. Para avaliar a modulação de monócitos, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD14-FITC e anti-CD16-PE. Para eritrofagocitose, eritrócitos e monócitos de CS previamente incubados com a toxina e pool de soro urêmico, foram imunomarcados com anti-Glicoforina-A-PE e anti-CD14-FITC, respectivamente e então incubados por 2 horas das seguintes maneiras: eritrócitos previamente tratados com monócitos controle, ou monócitos previamente tratados com eritrócitos controle. Todas as análises foram realizadas por citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que pacientes com DRC possuem 6% dos eritrócitos FS positivos, enquanto 1,9% de eritrócitos positivos foram observados em CS. Nos eritrócitos obtidos de CS foi observado 5,9% de células positivas para FS após incubação com S-III e 8,5% após incubação com pC 50 µg/ml. Na avaliação da modulação de monócitos foi observado em DRC 42% dos monócitos duplo positivos e somente 2,5% desta subpopulação em CS. Quando analisada a modulação promovida pela toxina foi observado aumento no número de monócitos atípicos em 15% após incubação das células com pC 25 µg/ml e 22% para pC 50 µg/ml, enquanto as células controle mostraram 2,5% do perfil duplo positivo. Ainda, após incubação com S-II 17% das células mostraram perfil duplo positivo e S-III 21%. Aumento na eritrofagocitose foi observado quando eritrócitos pré-tratados com pC 50 µg/ml (74%) e S-III (62%) foram incubados com monócitos por 2 h. Por outro lado, quando monócitos pré-tratados com pC 50 µg/ml ou S-III foram incubados com eritrócitos CS foi observado aumento na atividade fagocítica de 73% e 35%, respectivamente. A toxina urêmica pC foi capaz de induzir aumento na expressão da FS na superfície de eritrócitos normais, bem como modular o fenótipo de monócitos atípicos e promover aumento da eritrofagocitose. Estas atividades em conjunto sugerem envolvimento da toxina pC no aparecimento da anemia em pacientes renais crônicos. Todas as ações foram dose-dependente e similar às encontradas no DRC. Portanto, sugere-se ainda que a toxina pC pode ser utilizada como biomarcador no monitoramento desta comorbidade, uma vez que nossos resultados revelam aumento progressivo da atividade da toxina.

ABSTRACT

Anemia is a common complication in patients with Chronic Kidney Disease (CKD) and the main causes is iron deficiency and diminished erythropoietin production. However, uremia affect the erythrocytes cell membrane structure causing increased exposure of phosphatidylserine (PS), reducing the survival of these cells and increasing their removal by erythrophagocytosis and digestion by monocytes/macrophages. Furthermore, it was reported in CKD patients increase in the atypical monocytes subpopulation CD14+/CD16+ and these cells have a proinflammatory profile and increased phagocytic activity. The aim of the present study was evaluate comparatively the effect of uremia and uremic toxin p-Cresol in inducing eriptose, modulation of monocytes and compared these cells with erythrophagocytosis. We analyzed blood cells from 5 patients with CKD progression (CKD) and 5 healthy subjects (HS). For tests with HS cells, these were treated with RPMI for negative control, p-Cresol (pC) at concentrations 10, 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$ or pool of uremic sera for 48 h at 37°C. For assays with patients' cells, after obtaining they were immediately immunostained. Thus, to eriptose evaluation, erythrocytes from both groups were labeled Annexin V. To assess modulation of monocytes, cells were incubated with anti-CD14-FITC and anti-CD16-PE. For erythrophagocytosis, HS erythrocytes and monocytes previously incubated with the toxin and pool of uremic serum, were immunostained with anti-Glycophorin-A-PE and anti-CD14-FITC, respectively, and then incubated for 2 hours in the following ways: erythrocytes pretreated with control monocytes or monocytes pretreated with erythrocytes controls. All analyzes were performed by flow cytometry. Our results showed that patients with CKD have 6% of erythrocytes PS positive, while 1.9% of positive erythrocytes were observed in HS. In erythrocytes obtained from CS was observed 6% of PS positive cells after incubation with S-III and 8.5% after incubation with pC 50 $\mu\text{g/ml}$. To monocytes modulation evaluation, was observed in CKD cells 42% of double positive monocytes and only 2.5% of this subpopulation in HS cells. When modulation promoted by the toxin was analyzed, we observed increase in 15% of atypical monocytes after incubation with pC 25 $\mu\text{g/ml}$ and 22% with pC 50 $\mu\text{g/ml}$, while the control cells showed 2.5% of double positive profile. Even after incubation with S-II cells showed 17% of double positive profile and S-III 21%. Increased erythrophagocytosis was observed when erythrocytes pretreated with pC 50 $\mu\text{g/ml}$ (74%) or S-III (62%) were incubated with monocytes for 2 h. On the other hand, when monocytes pretreated (pC 50 $\mu\text{g/ml}$ or S-III) were incubated with control erythrocytes was observed increased in the phagocytic activity of 73% and 35%, respectively. The uremic toxin pC was able to induce increased expression of PS on the surface of normal erythrocytes and modulate the phenotype of monocytes to atypical profile and promote increased erythrophagocytosis. These activities together suggest that pC can be involvement in the progression of anemia in chronic renal failure patients. All pC results were dose-dependent and comparative to those found in CKD. Therefore, it is suggested that the toxin pC may be used as a biomarker to monitor anemia, since our results show a progressive increase in the toxin activity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

A DRC consiste em lesão renal e perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). É uma síndrome complexa, com etiologia heterogênea e expressão clínica muito variável, o que resulta em taxas muito imprevisíveis de progressão (Alebiosou, 2003; Romão, 2004). Pode ser causada por doença primária nos rins, por doenças sistêmicas que também acometem os rins e por doenças do trato urinário (Marques *et al*, 2005). Um alto índice de morte nestes pacientes está associado à doenças cardiovasculares e infecções (Kato *et al*, 2008). Portanto, pode-se dizer que a DRC é uma doença silenciosa, caracterizada por piora gradual até o estadio terminal da doença, onde métodos de depuração artificial do sangue (diálise peritoneal ou hemodiálise) um ainda, um transplante renal são as opções terapêuticas (Bernasconi *et al*, 2006). Atualmente é considerada um problema de saúde pública, por sua prevalência e incidência elevadas, especialmente pelo seu impacto na morbi-mortalidade da população, além dos enormes custos econômicos e sociais da doença. Alguns desses pacientes tem conhecimento da doença durante tratamentos de doenças cardiovasculares ou diabetes. Outros apenas quando a doença já se encontra em estadio crônico (Shena, 2011). Na década de 80, foram estudados intensivamente os fatores de risco responsáveis pela progressão da doença renal. A compreensão de como estes fatores atuam durante a progressão da doença renal tem permitido o desenvolvimento de intervenções de saúde pública apropriadas visando a lentificação da progressão da doença. Apesar de melhorias nas técnicas de diálise peritoneal e hemodiálise os índices de morte entre essa população ainda é considerado alto, cerca de 20% ao ano (Klahr, 2001; Alebiosou, 2003; Klahr & Morrissey, 2003; Kato *et al*, 2008).

A DRC é dividida em seis estadios funcionais, com base no grau da função renal, independentemente do diagnóstico. Estadio 1 – inclui pessoas que possuem função renal normal e que não apresentam lesão nos rins, porém que estão no grupo de risco para desenvolvimento da DRC, como hipertensos e diabéticos. Estadio 2 – compreende aparecimento de lesão renal sem

comprometimento da função dos rins. Estadio 3 – fase de insuficiência renal funcional leve. Estadio 4 – fase de insuficiência renal laboratorial ou moderada. Estadio 5 – fase de insuficiência renal clínica ou severa e Estadio 6 ou fase terminal que corresponde à faixa de função renal na qual os rins perderam o controle do meio interno (Romão, 2004). Nessa fase, o paciente encontra-se intensamente sintomático. Estes pacientes necessitam de tratamento dialítico (diálise peritoneal ou hemodiálise) ou um transplante renal para manter o controle interno do organismo. A redução da função renal é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e morte por DRC (Kato et al, 2008).

Os fatores de risco tradicionais para a doença cardiovascular e infecciosa, principais causas de mortalidade destes pacientes, são frequentemente encontrados nesta população, mas são claramente insuficientes para justificar o efeito multiplicador do risco destas complicações. A história natural da insuficiência renal crônica mostra que ela é um processo extremamente silencioso, podendo evoluir com poucos sinais e sintomas durante anos, o que dificulta o diagnóstico da DRC até estadios avançados (Zatz, 1996; Lipsic et al 2011). Esta observação justifica o grande número de pacientes que são diagnosticados tardiamente, quando estes pacientes são expostos ao ambiente biológico consequente da perda de filtração glomerular. Este ambiente propicia a geração de uma toxicidade celular e tecidual como consequência da retenção de solutos, potencialmente causadores de processos degenerativos. Este processo caracteriza-se por um complexo de alterações celulares e moleculares, intimamente ligados à resposta imune inadequada (Vaziri et al, 2012). Esta disfunção imune da DRC se caracteriza por um lado por inflamação sistêmica (altos e constantes níveis de marcadores de inflamação como a proteína C-reativa e citocinas pró-inflamatórias) e resposta pobre aos desafios imunológicos (baixa conversão de sorologia pós vacinação e alta mortalidade nas bacteremias). Essa alteração do sistema imunológico em pacientes com DRC em estadio terminal é induzida, principalmente, pelo meio urêmico (Kato et al, 2008).

1.2 MEIO URÊMICO E AS TOXINAS URÊMICAS

Compreende-se por meio urêmico a retenção de solutos, que são compostos que se acumulam progressivamente no sangue e nos tecidos de pacientes com DRC, direta ou indiretamente, devido a uma depuração renal deficiente. Esses solutos quando modificam funções no organismo acabam contribuindo para a síndrome urêmica, que pode ser definida como uma deterioração das funções bioquímicas e fisiológicas, em paralelo com a progressão da insuficiência renal, resultando em uma sintomatologia complexa e variável. Esses solutos biologicamente ativos são chamados de toxinas urêmicas (Vanholder & De Smet, 1999).

Pelo menos 90 compostos são descritos por estarem relacionados a retenção na uremia (Vanholder *et al*, 2003). É muito provável que está seja apenas a ponta do iceberg, considerando que um estudo utilizando sofisticada análise proteômica revelou a presença de pelo menos 1000 destes compostos em ultrafiltrado de doentes em diálise (Weissinger *et al*, 2004). Os produtos de retenção urêmica foram arbitrariamente subdivididas de acordo com sua massa molecular (Vanholder & De Smet., 1999) e atualmente é aplicado na maioria das vezes, classificação com base nas características físico-químicas das moléculas que influenciam a remoção de solutos por diálise ou estratégias relacionadas (Vanholder *et al*, 2003) (Tabela 1). Resumidamente, três grandes grupos podem ser identificados: (i) Pequenos compostos solúveis em água, cujo peso molecular é arbitrariamente definida como 500 Da no máximo. Os protótipos são uréia e creatinina, que são facilmente removidos por qualquer estratégia de diálise. Compostos deste grupo não têm necessariamente uma atividade tóxica marcante. (ii) As moléculas medianas possuem peso molecular fixado em mais de 500 Da (chegando a 15000 Da), sendo o protótipo a b2-microglobulina. Estas moléculas só podem ser removidas por estratégias de diálise que empregam dialisador com membranas contendo poros grandes o suficiente para permitir que as mesmas atravessem ou por diálise peritoneal (Ledebó, 1998). Muitos dos compostos deste grupo são peptídeos que afetam um grande número de sistemas e órgãos. (iii) Os compostos que se ligam às proteínas, sendo que a maioria dos solutos neste grupo possuem baixo peso molecular e algumas com característica de mediana (por exemplo a leptina e

as citocinas) e seus protótipos são os fenóis e indóis. Muitos dos compostos deste grupo possuem atividade tóxica e são difíceis de eliminar pela maioria das estratégias de diálise disponíveis atualmente, incluindo diálise de alto fluxo (Lesaffer *et al*, 2000). A principal estratégia utilizada até agora para diminuir essa concentração de solutos urêmicos é a diálise, porém esse processo é inespecífico e, além de não retirar todos os compostos necessários, remove compostos essenciais (Vanholder & De Smet, 1999).

Tabela 1: Classificação dos solutos de retenção urêmica.

Classificação	Características	Protótipos	Toxicidade
Moléculas pequenas solúveis em água	MW < 500 Da, facilmente removido por estratégias de diálise.	Uréia e creatinina	Não necessariamente tóxicas.
Moléculas medianas	MW > 500 Da, removidas somente com membranas de grandes poros.	B2-microglobulina	Amplos efeitos biológicos
Moléculas ligantes à proteínas	Qualquer MW, difíceis de remover com qualquer estratégia de diálise.	Fenois e Indois	Amplos efeitos biológicos

MW = peso molecular. Adaptado de Vanholder et al, 2008.

1.3 ANEMIA E A DRC

Na doença renal crônica, como os néfrons são progressivamente perdidos, o corpo tenta manter a homeostase através de múltiplos processos adaptativos incluindo uma gama complexa de alterações bioquímicas e fisiológicas. Quase todos os órgãos e sistemas parecem ser afetados, mas as principais complicações são cardiovasculares, neurológicas, hematológicas e imunológicas o que determina uma piora com o declínio da função renal.

A anemia é uma complicação comum em pacientes com dano renal, especialmente quando encontram-se com insuficiência renal em estágio

terminal, porém, também é observada no estadio inicial da doença (KDOQI, 2007). Causada principalmente pela deficiência de eritropoietina (EPO) e ferro, está associada a maior taxa de complicações na DRC como, aumento no número de internações, hipertrofia vascular esquerda e morte (Foley et al, 1996). Estudos indicam que o índice de anemia em pacientes com DRC é menor de 10% no estadio 2, 20% a 40% em estadio 3, 50% a 60% em estadio 4 e mais de 70% em pacientes em estadio avançado e terminal da doença (Estadios 5 e 6). Esses dados mostram que o desenvolvimento de anemia é precoce na DRC, mas essa frequência é aumentada em relação ao declínio da taxa de filtração glomerular (Yilmaz et al, 2011). Além disso, a anemia é significativamente associada com a mortalidade e morbidade em pacientes nos estadios finais da doença e tem sido ligado a doenças cardiovasculares (Levin et al, 2006). Assim, considera-se a patofisiologia da anemia na DRC multifatorial ao apresentar progressiva deficiência de eritropoietina e ferro, diminuída proliferação de células progenitoras eritróides, sendo este fenômeno atribuído ao acúmulo de toxinas urêmicas, como também crônica perda de vitaminas durante a hemodiálise (Macdougall, 2001).

EPO é uma glicoproteína ácida de cerca de 30 kDa e compreende 165 aminoácidos e quatro glicanas. Na forma circulante, EPO exibe isoformas de glicosilação variada que diferem em carga elétrica e atividade biológica. Sua síntese é regulada no nível transcricional, de forma que RNAm para EPO é detectável no cérebro, fígado, baço, pulmão e testículo, mas esses órgãos não são capazes de substituir a EPO renal em pacientes com DRC, devido à lesão e perda funcional de fibroblastos do córtex renal produtores deste hormônio. EPO derivada do cérebro atua localmente como um fator neuroprotetor (Noguchi et al 2007). Um papel como agente citoprotetor tem sido proposto para EPO em tecidos não-hematopoiéticos, incluindo o cérebro, o coração, os vasos sanguíneos e os rins (Brines & Cerami, 2006). Para a eritropoiese, EPO é essencial, pois quando sistêmico, o hormônio é considerado um agente antiapoptótico de progenitores eritrocitários, predominantemente as unidades formadoras de colônia eritróides (CFU-Es). Em resposta a EPO as CFU-Es proliferam e se diferenciam para produzir as coortes de proeritroblastos e normoblastos (Figura 1).

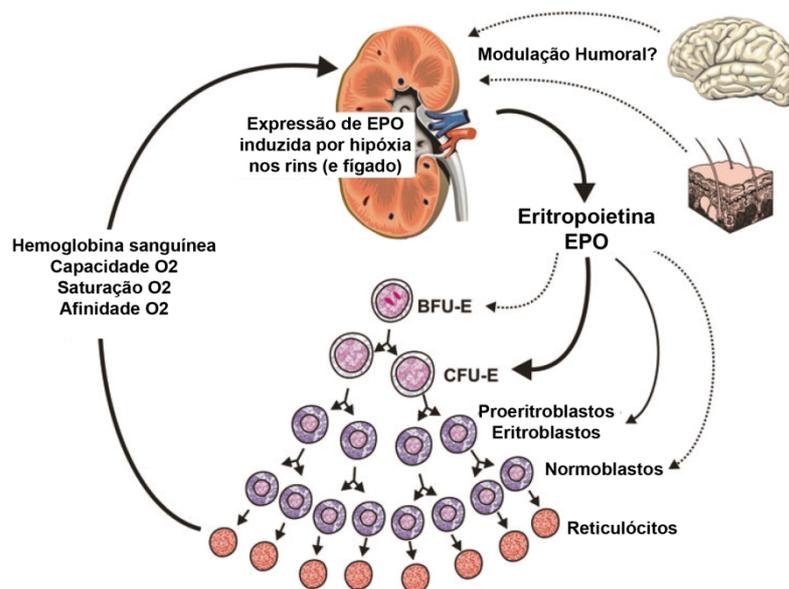


Figura 1 – Diagrama da Regulação da Eritropoiese. Falta de O₂ (hipóxia) é um estímulo para a síntese de eritropoietina (EPO), principalmente nos rins. EPO é um fator de proliferação, sobrevivência e diferenciação dos progenitores eritrocitários, particularmente as unidades formadoras de colônia eritróide (CFU-ES). A capacidade de O₂ do sangue aumenta com a liberação de reticulócitos. O papel dos sítios extra-renais (pele, cérebro) no controle da síntese renal de EPO não é ainda completamente compreendida. Adaptado de Jelkmann, 2011.

Portanto, a anemia na DRC pode ser resultado da produção insuficiente de eritropoietina pelo rim danificado e conseqüentemente, redução da capacidade de resposta da medula óssea a eritropoietina, culminando na redução da capacidade de produzir eritrócitos. Essa queda nos níveis de eritropoietina é considerada a principal causa da anemia na progressão da doença (Hutchinson & Jones, 1997; Ly et al, 2004, Voormolen et al, 2010). Além disso, foi observada também a diminuição da sobrevivência dos eritrócitos em circulação, sendo a toxicidade urêmica um dos principais indutores desta redução no tempo de vida dos eritrócitos (Nosratola *et al*, 2012). Desta forma, a acelerada destruição dos eritrócitos na uremia pode estar relacionada com a retenção de um ou mais compostos urêmicos (Eschbach, 1967; Massry, 1983), uma vez que o sangue de paciente urêmico transfundido em indivíduo saudável resulta no aparecimento de uma população saudável de eritrócitos, enquanto o contrário (sangue de indivíduo normal transfundido em paciente urêmico) leva a uma diminuição do tempo de vida destas células mostrando assim a relação com a uremia (Joske et al, 1956; Loge et al, 1958).

Além da deficiência da eritropoietina, outras situações podem contribuir para o advento de anemia em pacientes portadores de DRC, como: deficiência de ferro, deficiência de ácido fólico e vitamina B12; perdas sanguíneas, hemólise e inflamação (Korell et al, 2011; Yilmaz et al, 2011; Tsaglis, 2011). O metabolismo do ferro em humanos é único porque não há via excretora própria, sendo principalmente regulado através de captação. A homeostase do ferro depende da absorção deste mineral no duodeno e reciclagem a partir de eritrócitos do sangue senescentes. A maioria do ferro está ligado à hemoglobina e é armazenado nos hepatócitos e macrófagos do sistema reticuloendotelial (revisto por Nurko, 2006). O ferro chega à medula óssea para ser utilizado na maturação dos eritrócitos por uma proteína denominada transferrina, que transporta tanto o ferro absorvido e o ferro libertado a partir de macrófagos (principalmente após reciclagem dos eritrócitos senescentes fagocitados). Esta homeostase do ferro parece ser alterada na doença renal crônica. Por razões ainda não conhecidas, sendo a desnutrição um fator importante, os níveis de transferrina no doente renal crônico são a metade ou um terço dos níveis normais, diminuindo a capacidade do sistema de transporte do ferro (Besarab *et al*, 1999). Esta situação é então agravado pela incapacidade da liberação do ferro armazenado em macrófagos e hepatócitos na DRC. Clinicamente, o transporte de ferro e a diminuição das reservas de ferro acumuladas se manifestam como baixa saturação da transferrina sérica e elevado níveis de ferritina (revisto por Nurko, 2006). Estas características sugerem que o transporte de ferro interórgãos possa ser determinante na eritropoiese nestes pacientes, que pode ser corrigida somente por um ativo tratamento de substituição de ferro (Goodnough et al, 2000).

Um aspecto comum desta acelerada destruição de eritrócitos na DRC, é o aparecimento de fosfatidilserina (FS) na superfície destas células, um fosfolípido aniônico encontrado principalmente na face interna das membranas plasmáticas de células eucarióticas. Ainda é obscuro o real motivo pelo qual as hemácias tem sua sobrevivência diminuída, apenas sabe-se que este fato influencia o desenvolvimento da anemia na DRC (Bonomini et al, 1999). Eritrócitos maduros sofrem uma remoção da circulação quando estão senescentes, o que leva a uma vida média de aproximadamente 100-120 dias na circulação. Anterior a senescência, esses eritrócitos podem ainda

apresentar danos irreversíveis, o que compromete sua integridade desencadeando a morte celular programada ou no caso dos eritrócitos processo denominado eriptose.

Os eritrócitos possuem bicamada lipídica típica de células vivas. Intercaladas entre a bicamada lipídica estão as 1. Proteínas integrais de membrana com diversas funções como transporte e receptores; 2. Proteínas periféricas de membrana envolvidas na formação do citoesqueleto das células vermelhas. Esse citoesqueleto controla tamanho, forma, integridade, flexibilidade e durabilidade da membrana das células vermelhas, bem como interações célula-célula e fusão de membrana. Qualquer alteração neste complexo modifica profundamente a morfologia das células e causa a fragmentação da membrana em pequenas vesículas (Bratosin et al, 1998; Bonomini et al, 1999; Bonomini et al, 2002). A eriptose é semelhante a apoptose que ocorre em células nucleadas. Assim, por não apresentarem núcleo e mitocôndrias, organelas importantes na execução da maquinaria da apoptose, os eritrócitos não apresentam características de apoptose como a despolarização de mitocôndria e fragmentação nuclear. Contudo, a eriptose e apoptose compartilham características como formação de ondas (*blebbing*) na membrana plasmática, a partir do aumento na atividade do cálcio citoplasmático que estimula a desorganização da membrana e ativa proteínas que degradam o citoesqueleto, provocando o encolhimento da célula e modificação das estruturas de membrana, seguidos da expressão de FS na superfície celular (Lang et al, 2010; Lang & Quadri, 2012). Duas vias de sinalização foram identificados até agora, que convergem para desencadear a eriptose. Por um lado, a formação de prostaglandina E2 através da ativação da ciclooxigenase leva à ativação de um canal de cátion permeável ao Ca^{2+} (Lang et al, 2005; Lang & Qadri, 2012). Por outro lado, a ativação de uma fosfolipase A2 conduz à liberação de fator ativador de plaquetas (PAF), a qual por sua vez ativa uma esfingomielinase, conduzindo à ativação da ceramida, um conhecido esfingolípido proapoptótico (Lang et al, 2010). O aumento de Ca^{2+} citosólico e a concentração elevada de ceramida promovem alterações na membrana celular com deslocamento da fosfatidilserina a partir do interior da membrana para o folheto externo da mesma na superfície de eritrócitos (Shumilina et al, 2006, Lang & Qadri; 2012). Além disso, canais de K^+ ativados pelo aumento de

Ca^{2+} intracelular conduzem à perda de KCl celular e encolhimento da célula (Lang et al, 2003) e o Ca^{2+} estimula a protease calpaína resultando na degradação do citoesqueleto. A eriptose pode ser inibida pela eritropoietina, que, assim, prolonga a vida útil dos eritrócitos circulantes (Shumilina et al, 2006; Lang & Qadri, 2012).

A eriptose também pode ser desencadeada por estresse oxidativo decorrente do ambiente. Como resultado, eriptose excessiva pode levar a anemia, a menos que esta perda seja compensada pela formação de novos eritrócitos. O que gera uma situação contraditória na DRC, uma vez que não há evidências deste balanço durante a progressão da doença (Bonomini et al, 1999; Lang & Quadri, 2012). Ao contrário, citocinas pró-inflamatórias afetam a eritropoiese em vários níveis, como suprimir a célula precursora eritróide, uma vez que soro de pacientes com DRC avançada e doença inflamatória associada inibe a formação de colônias eritróides. Este processo pode ser inibido pela adição de anticorpos anti TNF- α e INF-gama (Goicoechea et al, 1998). Além disso, no doente renal crônico há uma reduzida produção de eritropoietina (EPO) nos rins (reflexo da diminuição da massa renal), processo que combinado ao fato da menor taxa de sobrevivência dos eritrócitos, podem determinar a anemia crônica nestes pacientes (Tsagalis, 2011). Em humanos a EPO é produzida por células renais em adultos e nos hepatócitos no feto. Estas células são sensíveis a hipóxia, que uma vez promovida, induz um aumento na produção de EPO. Embora outros tecidos possam produzir EPO, a maior fonte de EPO são os rins devido sua habilidade de regular o hematócrito, através da medição do volume do plasma e a quantidade de eritrócitos. EPO circula no plasma e induz a produção de novas células vermelhas na medula óssea (Erslev & Gabuzda, 1985).

Essas células possuem uma distribuição assimétrica de fosfolipídeos na bicamada lipídica e a manutenção dessa distribuição é um dos processos fisiológicos mais importantes desse tipo celular. A FS é um fosfolipídeo que compõe 13% da membrana da hemácia e está localizada na parte interna da membrana celular. Esse fosfolipídeo interage com a espectrina, o maior componente do citoesqueleto, e quando algum dano é causado à espectrina, a FS é exposta na membrana causando desequilíbrio na homeostase da célula. Na progressão da DRC, a exposição de FS na superfície de eritrócitos

representa um sinal bem definido da eriptose (Bonomini et al, 2004), uma vez observado um aumento significativo da exposição de FS em eritrócitos de pacientes comparados com indivíduos saudáveis (Bonomini et al, 1999).

A perda de assimetria nos fosfolipídeos de membrana e o aparecimento de FS na face externa dos eritrócitos é um dos mecanismos de reconhecimento dos macrófagos para hemácias envelhecidas ou com danos, acelerando a remoção destas células, o que pode sugerir um envolvimento dos macrófagos no aparecimento de anemia em pacientes com DRC (Bonomini et al, 1999; Bonomini et al, 2001; Bonomini et al, 2002; Pandolfi et al, 2007).

Através do reconhecimento da FS na membrana do eritrócito os macrófagos promovem a remoção das células senescentes, mantendo assim a homeostase do local e apenas células viáveis em circulação. A esse processo é dado o nome de eritrofagocitose. Os fagócitos necessitam englobar 2 milhões de eritrócitos por segundo (Bratosin et al, 1998). A remoção das hemácias envelhecidas e danificadas é mediada pelo reconhecimento de fosfatidilserina (FS) na superfície celular (McEvoy et al, 1986; Connor et al, 1994). Células de Kupffer do fígado são conhecidas por serem responsáveis pela fagocitose de eritrócitos danificados de maneira dependente da exposição de FS (Terpstra et al, 2000). O número de hemácias com FS expostas a serem removidas é notavelmente maior em pacientes com anemia hemolítica, malária e doença renal crônica (Wood et al, 1996; Eda & Sherman, 2002). Esta remoção de células envelhecidas e danificadas no fígado e no baço está bem estabelecida. No entanto, ainda há muito a ser determinado em relação ao mecanismo molecular, incluindo os receptores e ligantes específicos. Apesar de vários estudos demonstrarem que o reconhecimento de FS na superfície de células é importante para a remoção de eritrócitos (McEvoy et al, 1986; Connor et al, 1994), um estudo de inibição *in vivo* sugere que a depuração de hemácias danificadas pelos macrófagos é provavelmente dependente de receptor scavenger e não por um receptor específico para FS. No entanto, vários estudos têm mostrado que a fagocitose de hemácias danificadas e neutrófilos é dependente FS no fígado, mas não no baço o que implica um mecanismo auxiliar está envolvido neste reconhecimento (Terpstra et al, 2000).

A eritrofagocitose por macrófagos derivados de monócitos que se ligam aos eritrócitos mostrou-se aumentada em mais de três vezes para eritrócitos de

paciente renal crônico comparado à ingestão de células obtidas de indivíduo saudável. Interessantemente, eritrócitos normais pré-incubados com plasma urêmico aumentam a porcentagem de eritrofagocitose, bem como aumenta a expressão de FS comparável aos níveis de expressão dos eritrócitos urêmicos (Bonomini et al, 1999). Macrófagos teciduais do sistema reticuloendotelial do baço e fígado são responsáveis pelo reconhecimento de hemácias anormais através de vários mecanismos. Os eritrócitos com deformidades ou envelhecidos podem ser facilmente engolfados por macrófagos (Fens et al, 2010). O principal interesse neste processo é desvendar o papel da FS em eritrócitos no processo da eritrofagocitose (Kobayashi et al, 2007, Noh et al, 2010). FS, normalmente retida no folheto interno da membrana, volta-se para o exterior quando expostos a vários estímulos, possivelmente no caso da DRC, pelo ambiente urêmico formado durante a progressão da doença, porém, pouco se sabe sobre este processo (Bonomini et al, 1999).

1.4A MODULAÇÃO DE MONÓCITOS ATÍPICOS NA DRC

Distintas subpopulações de monócitos podem ser observadas no sangue periférico de acordo com a expressão das moléculas CD14 e CD16. O CD14, co-receptor do TLR4 (*Toll-like* receptor 4), é o receptor do lipopolissacarídeo (LPS) de certas bactérias Gram negativas e o CD16 corresponde ao receptor de baixa afinidade para a imunoglobulina G (FcγRIII). Dados da literatura revelam que as subpopulações de monócitos podem produzir diferentes citocinas, mostrando um perfil mais ou menos inflamatório (ZieglerHeitbrock, 1996; Skrzeczynska-Moncznik et al, 2008). Como nos processos inflamatórios pode haver alteração nestas subpopulações dos monócitos, foi proposto que as mesmas fossem nominadas de acordo com os marcadores de membrana e não somente pelas suas atividades pró ou antiinflamatórias. Sendo assim, em condições fisiológicas normais podem ser detectadas três subpopulações de monócitos no sangue periférico humano: os clássicos (CD14^{hi}CD16⁻), os intermediários (CD14^{hi}CD16⁺) e os não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) (Ziegler-Heitbrock et al, 2010). Os dois últimos são denominados como atípicos ou simplesmente CD14⁺/CD16⁺ e correspondem 10% dos monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis e esse número aumenta quando os

indivíduos apresentam quadro inflamatório agudo ou crônico. Os 90% restantes correspondem aos monócitos clássicos, isto é, que apresentam positividade para CD14 e são negativos para CD16, sendo este o tipo celular comumente chamado de monócito (Ziegler-Heitbrock et al, 2010). O CD16 é expresso fortemente na superfície de células *natural killer*, linfócitos e neutrófilos e agora descritos para monócitos. Os monócitos CD14+/CD16+ apresentam uma alta capacidade de produzir citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6), promover a inflamação e apresentam um aumento na capacidade de fagocitose. Todos os monócitos expressando CD16 (CD16+) são considerados proinflamatórios, por serem capazes de produzir citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL) -6 e IL-10 em resposta a estímulos microbianos (Ziegler-Heitbrock et al, 2010; Tacke; Randolph, 2006). Além disso, as células CD14+/CD16+ são mais eficientes em processos de fagocitose e produção de reativos de oxigênio e nitrogênio, portanto possuem um perfil microbicida acentuado (Figura 2).

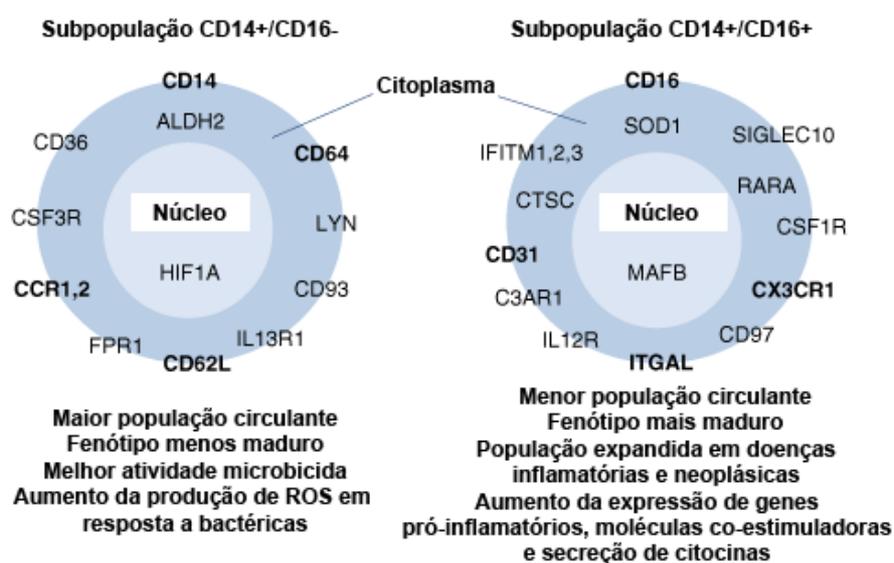


Figura 2 – Resumo das diferenças funcionais entre as subpopulações de monócitos do sangue periférico. Genes expressos a um nível elevado em uma subpopulação e não na outra são indicados. A posição gênica estão indicados de acordo com a localização da proteína na células – membrana plasmática, citoplasma ou núcleo. Marcadores para cada subpopulação são identificados em negrito. Adaptado de Martinez, 2009.

A proporção de células CD14+/CD16+ aumenta progressivamente em relação a doenças agudas ou crônicas. Resultados acumulados ao longo da década passada sugerem que a subpopulação CD14+/CD16+ é expandida em

um grande número de doenças inflamatórias, independentemente da sua etiologia. Uma maior razão de CD14+/CD16+ (em comparação com a subpopulação típica de uma pessoa saudável) foi encontrado na doença de Crohn (Hanai et al, 2008), artrite reumatóide, asma, e sepse, entre outras doenças (Tacke; Randolph, 2006). Por outro lado, em episódios de hipóxia, tais como as causadas por infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, maiores níveis de CD14+/CD16- (mas não os atípicos CD14+/CD16+) se correlacionam com a gravidade da doença. O aumento do número de monócitos atípicos CD14+/CD16+ são uma característica da doença que, em geral, embora possa indicar a gravidade do quadro, não pode sugerir um diagnóstico específico (revisto por Martinez, 2009). Várias explicações têm sido propostas para o aumento da circulação de monócitos CD14+/CD16+ em doenças inflamatórias, como a maturação e/ou modulação promovida pelo ambiente inflamatório das células clássicas CD14+/CD16- em células atípicas CD14+/CD16+, o aumento da diapedese dos monócitos clássicos para os tecidos inflamados, e até mesmo a estimulação de uma via específica de desenvolvimento das células CD14+/CD16+ (revisto por Martinez, 2009).

Já foi descrito que pacientes com DRC em estadio terminal exibem um aumento na porcentagem de monócitos atípicos (Nockher et al, 1998; Takeyama et al, 2007). Isto é associado com o aumento na expressão principalmente de TLR- 2 e TLR-4 e aumentada regulação da expressão de integrinas na superfície celular, bem como, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas. Essas alterações levam a uma ativação espontânea de monócitos, que passam a contribuir na formação do estresse oxidativo e inflamação na DRC (Ziegler-Heitbrock, 1996; Gollapudi et al, 2010; Vaziri et al, 2012). Um exemplo do papel que esta subpopulação de monócitos atípicos têm na progressão da DRC têm sido investigada sobre o aspecto da produção de dano endotelial. Em um modelo experimental de co-cultivo, células CD14+/CD16+ ou com monócitos CD14+/CD16- foram incubadas com células endoteliais desenvolvidas a partir de células do cordão umbilical (HUVEC) e foram avaliados a lesão endotelial determinado pela atividade dos ROS e da apoptose por citometria de fluxo nas HUVEC (Merino et al, 2008). Apenas as células HUVEC co-cultivadas com o subgrupo de monócitos atípicos, mostraram atividade dos ROS aumentada. Da mesma forma análise

da apoptose revelou um aumento deste processo nas culturas de HUVEC com monócitos CD14+/CD16-, o que apoia a ideia de que o stress oxidativo induzido pela microinflamação nas células endoteliais, desempenha um papel muito importante na produção de lesão endotelial em pacientes com DRC (Merino et al, 2008). Este trabalho apoia a hipótese de que, independentemente da uremia mediada por monócitos CD14+/CD16+, em doentes com DRC, a indução de lesão endotelial pode contribuir significativamente para o desenvolvimento da aterosclerose, e, assim, na ocorrência de eventos cardiovasculares, uma das causas de morbidade e mortalidade em pacientes renais crônicos (Carbó et al, 2008).

Monócitos atípicos também foram avaliados quando sua atividade pró-inflamatória. Células de 32 pacientes em HD, 9 de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), nove indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e 15 controles saudáveis foram estudados por meio de citometria de fluxo para a expressão de CD14/CD16 e quanto a função imune como dosagem de citocinas e fagocitose. Maior porcentagem de monócitos CD14+/CD16+ foi observada em pacientes em HD. Comparado com monócitos típicos (CD14+/CD16-), os monócitos CD14+/CD16+ exibiram expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de células diferenciadas. Além disso, esses monócitos mostraram um aumento da atividade fagocítica. Da mesma forma, monócitos CD14+/CD16+ de pacientes com LES e de HIV mostraram aumento da atividade inflamatória em comparação com monócitos típicos (Ziegler-Heitbrock et al, 1993).

A anemia associada a DRC pode estar relacionada a muitos fatores. A anemia na DRC desenvolve-se gradualmente durante o declínio progressivo da função renal e é caracterizada por uma deficiência relativa da secreção de eritropoietina a partir do rim doente em relação ao grau de anemia. Além disso, a uremia interfere na estrutura de membrana celular dos eritrócitos que resulta no aumento da exposição de FS observado em pacientes em tratamento de hemodiálise, diminuindo a sobrevivência destas células e aumentando possivelmente o processo de fagocitose e digestão intracelular por monócitos/macrófagos. Os mecanismos responsáveis por esta fagocitose de eritrócitos de pacientes urêmicos em hemodiálise por macrófagos são apenas parcialmente conhecidos e têm sido atribuído às toxinas urêmicas (Bonomini et

al, 1999), à desnutrição, ao estresse oxidativo, ao aumento de cálcio intracelular ionizado e às terapias de diálise (Guidi & Lechi Santonastaso, 2010). Além disso, estudos mostraram aumento no número de monócitos CD14+/CD16+ nesses pacientes comparado a indivíduos saudáveis (Merino et al, 2008). Portanto, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a função de uma toxina urêmica bem estudada, p-cresol, no desenvolvimento da anemia com foco na eritose e alteração na população de monócitos de sangue periférico. Este estudo ainda teve como intuito análise comparativa com os mesmos marcadores em doentes renais crônicos em monitoramento ambulatorial e portanto, não dialíticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da uremia e da toxina urêmica p-Cresol no desenvolvimento progressivo da anemia através de indicadores como a indução de eriptose e modulação de monócitos, bem como, através da relação entre estes dois tipos celulares e a eritrofagocitose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar a eriptose em doentes renais crônicos e comparar a ação da toxina urêmica p-Cresol na indução de eriptose em eritrócitos de indivíduos saudáveis.

2. Verificar o papel da toxina urêmica p-Cresol na modulação de subpopulações de monócitos em indivíduos saudáveis.

3. Caracterizar a subpopulação de monócitos atípicos em doentes renais crônicos na fase não dialítica.

4. Induzir o fenômeno de eritrofagocitose pela uremia e pela toxina urêmica p-Cresol em células provenientes de indivíduos saudáveis.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

Neste estudo células sanguíneas foram obtidas de 5 pacientes com DRC em fase não dialítica (DRC) e de 5 indivíduos saudáveis (CS) para controle. Os indivíduos foram recrutados no ambulatório do Hospital Nossa Senhora da Luz. Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes e dos indivíduos saudáveis foram obtidos pela equipe do Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho. A seleção dos mesmos obedeceu critérios de inclusão e exclusão abaixo relacionados, previamente aprovados pelo comitê de ética (CEP- PUCPR aprovado n^o: 509). Os pacientes e indivíduos saudáveis incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, prontificando-se a participar do estudo.

3.1.1 Critérios de inclusão

Para inclusão neste estudo os pacientes foram selecionados a partir dos seguintes critérios: ser do sexo masculino ou feminino, ter idade entre 18 e 80 anos, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e ter diagnóstico de DRC. Os indivíduos não deviam apresentar quadro de infecção aguda, transfusão de sangue realizada com 1 mês de antecedência, infecções crônicas (hepatite B, hepatite C, vírus da imunodeficiência humana, osteomielite), doença imunológica ativa (lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide), terapia imunossupressora ou com antiinflamatório no prazo de 3 meses antes da data de inclusão no estudo, histórico de abuso de álcool ou drogas ilícitas, pacientes que apresentaram eventos cardiovasculares tais como infarto do miocárdio, angina instável, revascularização do miocárdio, acidente vascular cerebral ou ataque isquêmico transitório, dentro de 3 meses antes da data da inclusão no estudo, insuficiência cardíaca congestiva moderada a grave, PTH acima de 1000 ng/L, perspectivas de transplante nos últimos 6 meses, participação em outro estudo com medicamento sob investigação inferior a 4 semanas antes da data de inclusão no estudo, histórico de malignidade e diabetes. Os indivíduos saudáveis também foram selecionados a partir dos seguintes critérios: ser do sexo masculino ou

feminino, ter idade entre 18 e 80 anos, sem histórico familiar de DRC, diabetes ou hipertensão arterial e assinatura do termo do consentimento livre e esclarecido.

3.1.2 Coleta de sangue periférico para obtenção do soro

Para indivíduos saudáveis e pacientes com diagnóstico de DRC, as coletas foram feitas na parte de manhã, não necessariamente em jejum. Foram coletados para cada grupo do estudo 20 ml de sangue em tubo contendo citrato de sódio e imediatamente após as coletas os tubos foram encaminhados para o Laboratório Experimental Multiusuário 3 da Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR. Parte do sangue coletado (2 ml) foi utilizado para obtenção do soro e o mesmo foi armazenado em freezer -80oC. O restante foi processado para obtenção dos eritrócitos e monócitos.

3.1.3 Pools de soro urêmico

O *pool* de soro urêmico utilizado nos ensaios descritos a seguir foi gentilmente cedido pelo grupo do Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho. Compreendem Soro I (S-I) – *pool* de soro de indivíduos em estadio 1/2 da DRC; Soro II (S-II) – *pool* de soro de indivíduos em estadios 3/4 e Soro III (S-III) – *pool* de soro de indivíduos em estadios 5/6 da doença.

3.1.4 Concentrações de p-Cresol

As concentração de p-Cresol (pC) utilizadas no estudo foram escolhidas a partir da descrição de Faure e colaboradores (2006). O grupo descreve as concentrações máxima (50µg/ml), média (25µg/ml) e mínima (10µg/ml) de p-Cresol encontradas no soro de pacientes com DRC durante a progressão da doença. p-Cresol foi obtido pela Sigma-Aldrich e foi diluído conforme instruções do fabricante em solução mãe de 1 mg/ml.

3.2 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS PARA ESTUDO

3.2.1 Eritrócitos

A coleta do sangue foi feita em tubos contendo citrato de sódio como descrito anteriormente. Para solução de eritrócitos são retirados do sangue total cerca de 500 µl e reservados para diluição usada nos ensaios posteriormente. Para os ensaios foram usados 1µl de sangue total em 100µl de tampão de marcação (PBS + 1% Soro Fetal Bovino) para cada condição do ensaio, ou por poço, nos ensaios de incubação de eritrócitos controles com a toxina e pool de soros urêmicos.

3.2.2 Monócitos de Sangue Periférico

O sangue, tanto dos grupos de pacientes quanto dos doadores controles, foi centrifugado por 20 minutos a 150xg para que o plasma fosse separado. Após separação do plasma, este foi retirado e submetido a nova centrifugação (10 minutos a 200xg) para retirada das plaquetas. Após esse procedimento o plasma foi devolvido ao sangue, homogeneizado e então submetido a separação com o meio Histopaque 1119-1077 (Sigma Aldrich) por centrifugação de 30 minutos a 700xg. Com a separação concluída foi retirado então o halo de células mononucleares e estas lavadas com PBS por 10 minutos a 200xg. Para avaliação da quantidade e viabilidade dos monócitos isolados, a contagem dessas células foi feita em câmara de Neubauer com azul de Tripán. As células mononucleares separadas foram lavadas duas vezes com meio RPMI por centrifugação 10 minutos a 200xg e ressuspensas em RPMI completo (suplementado com 2% de soro fetal bovino e 100 U/ml de penicilina/estreptomicina). Após lavagem foram utilizadas nos ensaios.

3.3 EXPRESSÃO DE FOSFATIDILSERINA (FS) EM ERITRÓCITOS-ERIPTOSE

Para avaliar a eriptose, eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis (1µl de sangue total + 100µl tampão de marcação) foram incubados com *pool* de soro urêmico na diluição de 1:100 em RPMI 2%. A toxina isolada p-cresol (pC)

(Sigma) foi diluída nas concentrações 10, 25 e 50 µg/ml e como controle negativo as células foram incubadas apenas com o RPMI 2%. Para todas as condições descritas, as células foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após a incubação foram lavadas com PBS contendo 0,1% de BSA por centrifugação por 10 minutos, 400 g a temperatura ambiente (TA). As células foram então incubadas com Anexina V-PE (BD Bioscience, USA) por 30 minutos. Após essa incubação foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em solução de FACS (FixFACS – 1% Formaldeído em PBS). A leitura foi realizada imediatamente em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD, Bioscience USA). Eritrócitos obtidos dos pacientes renais crônicos foram incubados imediatamente com Anexina-V-PE e análise realizada por citometria.

3.4 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DOS MONÓCITOS NO PERFIL CD14+/CD16+

Os monócitos obtidos de doentes renais crônicos ou de indivíduos saudáveis foram isolados usando a metodologia já descrita anteriormente. As células de doadores saudáveis, 5×10^5 células/ml plaqueadas em placas de 24 poços, foram incubadas por 48 horas na presença ou ausência (controle negativo) da toxina urêmica pC (50, 25 e 10 µg/ml) ou com os diferentes *pools* de soro urêmico (S-I, S-II, S-III), ambos diluídos em RPMI 2%. Após a incubação as células foram marcadas com os anticorpos anti-CD14-FITC (BD Bioscience) e anti-CD16-PE (BD Bioscience) por 45 minutos no escuro. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em FixFACs. A leitura foi realizado por citometria de fluxo. As células obtidas dos pacientes foram diretamente marcadas com os anticorpos descritos acima após a separação e então analisadas também em citômetro de fluxo.

3.5 ENSAIO DE ERITROFAGOCITOSE

Os monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis (incubados ou não com as diferentes concentrações de p-C ou *pool* de soro urêmico por 48 horas a 37°C) foram marcados com anticorpo monoclonal anti-CD14-FITC (BD Bioscience) no escuro. Os eritrócitos obtidos dos mesmos indivíduos saudáveis (pré-incubados ou não com pC ou *pool* de soro urêmico por 48 horas a 37°C)

foram incubados com anticorpo monoclonal anti-glicoforina A-PE (BD Bioscience). Após incubação com os anticorpos acima descritos, os dois tipos celulares foram adicionados em tubos de citometria, na proporção 1 monócito:50 eritrócitos, e então incubados por 2 horas em estufa a 37°C, contendo 5% CO₂ da seguinte maneira: monócitos tratados com pC ou pool de soro urêmico seguindo de eritrócitos controle (RPMI) e eritrócitos tratados com pC ou pool de soro urêmico seguidos de monócitos controle (RPMI). Após essa incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS para remover os eritrócitos não fagocitados e foram ressuspensos em FixFACS. Como controle negativo um tubo contendo monócitos/eritrócitos foram incubadas a 4°C, para desconto de células aderidas na superfície e não fagocitadas. A leitura foi feita por citometria de fluxo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças foram analisadas pelo método paramétrico t-Student test de acordo com a distribuição normal dos dados. As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 13.0 para Windows. Foram considerados como significativos resultados com valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A anemia na DRC é habitualmente normocítica normocrômica e tem uma etiologia multifatorial: embora a causa principal seja uma diminuição da produção endógena de eritropoetina (por diminuição da massa renal), a restrição de ferro e a resistência à administração exógena de eritropoetina são fatores relevantes na manutenção da anemia. Outro fator importante que contribui para a anemia na DRC é a diminuição da sobrevivência dos eritrócitos no ambiente urêmico (Eschbach et al, 1987), que pode estar relacionado com os mecanismos de eriptose e de remoção fagocitária. Nossos resultados evidenciam que o ambiente urêmico é capaz de induzir eriptose em doentes renais crônicos em progressão da doença (Figura 3 – DRC) quando comparado aos controles saudáveis (Figura 3 – CS). A análise dos nossos resultados foi baseada na expressão de FS na superfície destas células. A eriptose é um processo de morte celular de eritrócitos, em decorrência de fatores como estresse oxidativo, choque osmótico, remoção de cloro ou depleção de energia. Assim, ocorre abertura de canais de cátions não seletivos, aumentando a concentração de cálcio citosólico e conseqüentemente, exposição de FS na face externa da membrana, fato que permite a ligação de receptores presentes em macrófagos, responsáveis por retirar essas células de circulação (Foller et al, 2008).

Bonomini e colaboradores (1999) mostrou que pacientes não dialíticos expressam 2,32% de FS na superfície dos eritrócitos circulantes, enquanto pacientes em diálise expressam 3,06% e pacientes em diálise peritoneal 2,14%, comparado aos indivíduos saudáveis que possuem em média 0,68% de FS na superfície de eritrócitos circulantes. Por outro lado, em ensaios de reconstituição, eritrócitos normais obtidos de indivíduos saudáveis mostraram um aumento na expressão de FS quando com soro urêmico (3,2% após 2 h comparado a 1,1%, no início da incubação), ao passo que a porcentagem de eritrócitos FS positivos de pacientes urêmicos diminuiu quando incubados com soro normal (2,03% depois de 2 h e 1,65% após 8 h comparado a 2,9% no início da incubação). Nossos resultados revelam que a porcentagem de exposição de FS na população estudada foi cerca de 6 % em pacientes renais

crônicos (DRC) e os controles saudáveis (CS) (1,9%), considerado alto em relação ao descrito na literatura Figura 3.

Independente do número de indivíduos analisados, quando comparamos CS com DRC fica evidente o aumento significativo na eriptose. Como já é sabido pacientes em hemodiálise apresentam melhoras no quadro clínico, uma vez que ambiente urêmico é filtrado (Ledebó, 1998; Vanholder e De Smet 1999) e é sabido ainda que eritrócitos urêmicos conseguem reverter a exposição da FS e voltar a se comportar como saudáveis quando retirados do ambiente urêmico (Bonomini et al, 1999). Já foi descrito por outros grupos que indivíduos que passam por esse tipo de terapia apresentam melhoras também no quadro anêmico pela remoção de moléculas de alto peso molecular (revisto por Bowry & Gatti, 2011). Porém, por outro lado estudos têm mostrado que esse tratamento promove pode alterar a morfologia da célula (levando ao aumento da fagocitose por macrófagos, por exemplo) e reter alguns solutos importantes para eritropoiese, dificultando assim a reposição de células novas (Mcdougall et al, 2001; Bonomini & Sirolli, 2003; Bowry & Gatti, 2011).

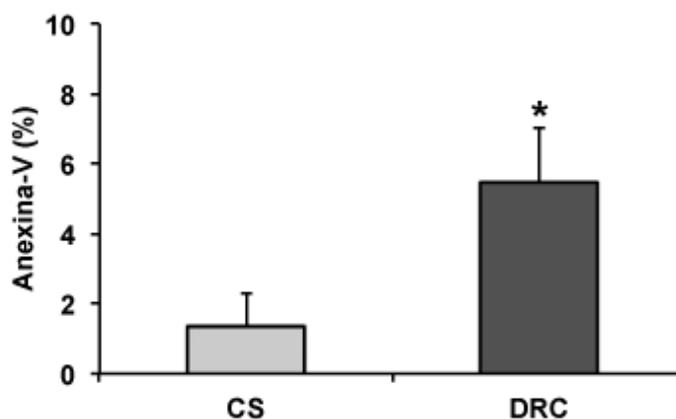


Figura 3 – Eriptose avaliada pela expressão de FS em eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis (CS) e pacientes renais crônicos (DRC). Eritrócitos foram marcados com Anexina-V-PE e analisado por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como % da positividade para Anexina-V-PE \pm DP de cinco CS e DRC (* $p < 0,05$ versus controle negativo – CS).

Segundo Vanholder & De Smet (1999) as toxinas urêmicas são compostos biologicamente ativos que se acumulam na circulação de indivíduos com DRC por estes terem sua filtração comprometida pelo dano renal. Quando esses compostos geram impactos negativos nesses indivíduos são então chamados de toxinas urêmicas (Vanholder et al, 2001). Dentre as principais

causas de mortalidade em indivíduos urêmicos está a anemia. A anemia na DRC ainda é pouco compreendida, porém Bonomini e colaboradores (1999) mostraram que ao incubar eritrócitos normais com soro urêmico, a eriptose era aumentada, e isso poderia ser revertido uma vez que células de pacientes eram incubadas com soro saudável, sugerindo assim o envolvimento das toxinas no desenvolvimento da anemia.

Ao testar concentrações diferentes de p-cresol e pool de soro urêmico correspondentes a diferentes estádios da DRC em eritrócitos de doadores saudáveis, observamos um aumento na exposição da FS na superfície dessas células quando comparado às células controle (Figura 4). Os eritrócitos saudáveis após 48 horas de incubação apenas com RPMI (T48) mantiveram baixa expressão de FS, comparável aos eritrócitos recém obtidos do sangue (T0). Como esperado, quando eritrócitos de indivíduos saudáveis foram incubados com o pool de soro urêmico, observamos um aumento gradativo na expressão de FS na superfície celular. S-III que corresponde aos estádios terminais na progressão da doença promoveu um aumento em cerca de 5,9% da eriptose em comparação com os controles T0 ou T48 (Figura 4). Por outro lado, S-I que corresponde ao pool de soro urêmico de indivíduos sem comprometimento na filtração glomerular e portanto, não havendo acúmulo de toxinas urêmicas, promoveu uma diferença não significativa de 2,2% de eriptose em relação aos controles T0 ou T48. Com estes dados podemos sugerir, que a presença das toxinas urêmicas, é o fato principal para o desencadeamento do processo de eriptose, que por sua vez, pode estar associada à anemia na progressão da DRC.

Com o intuito de avaliar a relação de toxinas urêmicas e o fenômeno de eriptose, utilizamos a toxina p-Cresol (pC) como indutora de exposição de FS na superfície de eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis. Conforme demonstrado na Figura 4, podemos observar um aumento significativo, dose-resposta, da expressão de FS após 48 h de incubação com as diferentes concentrações de pC, comparado com os controles negativos. Mesmo a concentração dita mínima na progressão da doença foi capaz de induzir um aumento significativo de aproximadamente 3,7% na expressão de FS em comparação aos eritrócitos T0 ou T48. Este aumento passa para 8,5% quando observamos a expressão de FS após 48 h de incubação com pC na

concentração máxima urêmica encontrada (50 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 4). Ressalta-se que tanto com o pool de soros urêmicos II e III, quanto a toxina isolada em todas as concentrações estudadas, promoveram ação de maneira dose dependente, sugerindo que o aumento da expressão é progressivo de acordo com a evolução da doença. Sabe-se que eritrócitos de pacientes tem uma maior marcação de FS na superfície quando comparado com indivíduos saudáveis e a exposição é ainda maior em pacientes em estadios terminal (Pandolfi et al, 2007).

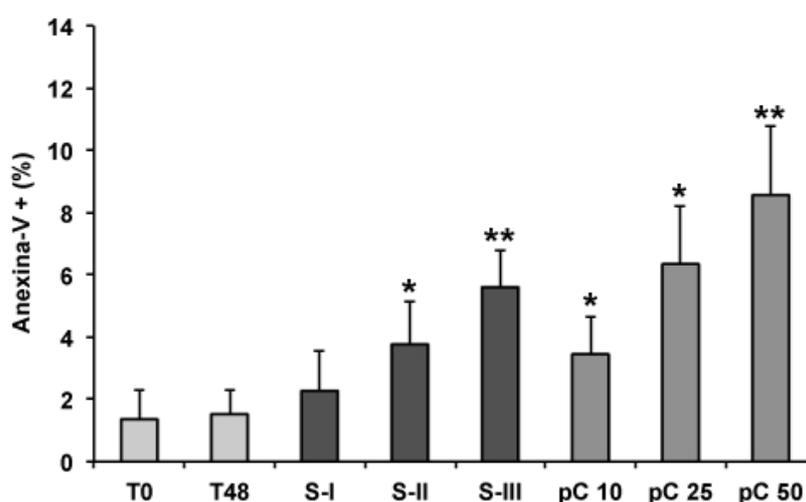


Figura 4 – Eriptose promovida pela uremia e pela toxina pC em eritrócitos obtidos de indivíduos saudáveis observada pela expressão de FS de superfície. Eritrócitos foram marcados com Anexina-V-PE imediatamente após obtenção (T0) ou após incubação por 48 h somente com RPMI 2% (T48) e na presença de *pool* de soro urêmico estadiamento 1 e 2 (S-I); estadiamento 3 e 4 (S-II) e estadiamento 5 e 6 (S-III). Ainda as células foram pré-incubadas com p-cresol nas concentrações urêmicas encontradas 10 $\mu\text{g/ml}$ (pC 10); 25 $\mu\text{g/ml}$ (pC 25) e 50 $\mu\text{g/ml}$ (pC 50) e todos foram analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como % da positividade para Anexina-V-PE \pm DP de cinco ensaios independentes (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle negativo – T0/T48).

As células que apresentam alterações morfológicas e funcionais são normalmente retiradas da circulação em processos que ocorrem naturalmente no organismo e são importantes na manutenção de apenas células viáveis, garantindo a homeostase. Esse processo é realizado pelos macrófagos teciduais, uma vez que os mesmos estão equipados com receptores específicos para FS (Fadok et al, 2000; Henson et al, 2001). Desta forma, eritrócitos em eriptose, com exposição de FS, podem ser fagocitados e digeridos por macrófagos. Monócitos formam um grupo heterogêneo de células que constituem 5-10% do total de leucócitos do sangue em humanos. São

células originadas da medula óssea, circulam na corrente sanguínea e entram nos tecidos, onde se diferenciam em macrófagos para manter o número normal de macrófagos teciduais ou ainda, para contribuir na resposta inflamatória contra infecções. Monócitos podem circular no sangue por cerca de 72 h, após este período, se eles não forem ativados, eles morrem e são removidos. Em 1989, Ziegler-Heitbrock e colaboradores noticiaram a existência de subpopulações de monócitos, de acordo com a expressão de seus receptores de membrana CD14 (um receptor que reconhece LPS bacteriano) e CD16 (receptor $Fc\gamma$). Os receptores $Fc\gamma$ CD16 possuem relativamente baixa afinidade para a porção Fc de IgG em complexos com antígenos específicos. Monócitos circulantes ativados expressam CD16 e podem fagocitar esses complexos antígenos/imunoglobulina e removê-los da circulação (Passlick et al, 1989).

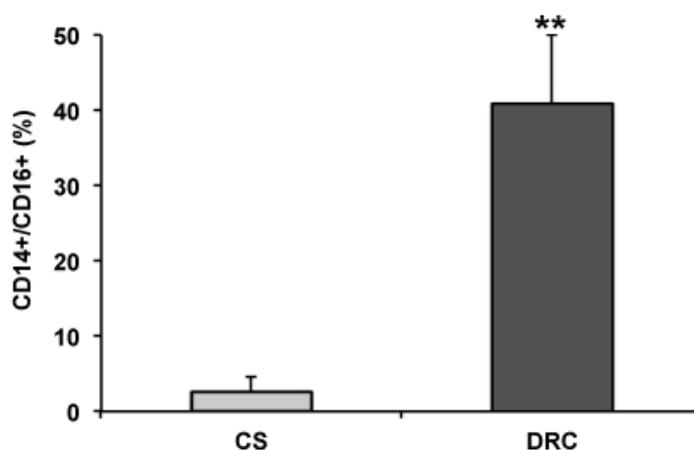


Figura 5 – Avaliação de monócitos CD14+/CD16% presentes no sangue periférico de indivíduos saudáveis (CS) e pacientes renais crônicos (DRC). Monócitos foram isolados, incubados com anticorpos anti-CD14+-FITC e anti-CD16+-PE e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como % da dupla positividade \pm DP para ambos os marcadores em cinco CS e DRC (* $p < 0,05$ versus controle negativo – CS).

Pacientes renais crônicos em hemodiálise possuem aumento desta subpopulação de monócitos atípicos em 24,4% comparado aos valores encontrados em indivíduos saudáveis (8,3%) (Nockher & Scherberich, 1998). Nossos resultados corroboram com esses achados, sendo na população estudada encontrado 42% de monócitos atípicos em pacientes DRC, enquanto indivíduos saudáveis possuem a média de 2,5% (Figura 5). Sabe-se que o tratamento de hemodiálise promove uma remoção temporária dos monócitos na corrente sanguínea, mas com retorno da população ativada, refletindo o

percentual aumento do subtipo atípico (Sester et al, 2001). Este resultado claramente indica que a subpopulação de monócitos CD14+/CD16+ perfazem um número expressivo no total de monócitos sanguíneos e este aumento está em clara associação com a presença do acúmulo de estímulos presentes no ambiente urêmico.

Durante episódios de infecção aguda, a subpopulação de monócitos CD14+/CD16+ em pacientes com DRC foi marcadamente expandido (14.6% contra 32%, $P < 0.001$) (Nockher & Scherberich, 1998). Para avaliar a influência do ambiente urêmico nesta modulação nos subtipos de monócitos encontrados em pacientes renais crônicos, passamos a avaliar monócitos obtidos de indivíduos saudáveis incubados ou não com estímulos urêmicos. Podemos observar que indivíduos saudáveis apresentaram 2,8% deste subtipo de monócito atípico, mesmo após 48 h de incubação em RPMI 2% (Figura 6). Após incubação destas células com o *pool* de soro urêmico I, II ou III podemos observar um aumento gradativo no número desta subpopulação, sendo o S-I incapaz de promover qualquer modulação no perfil inicial dos monócitos (3% de monócitos atípicos) enquanto o S-II e S-III promoveram um aumento no perfil atípico dos monócitos em 17% e 21%, respectivamente após 48 h de incubação. Mesmo com um aumento significativo em relação ao controle negativo T0 ou T48, o número de monócitos atípicos na população de pacientes com DRC foi muito maior do que o encontrado *in vitro* após incubação com o *pool* de soro urêmico. O mesmo resultado foi encontrado quando analisamos o número de monócitos atípicos após incubação com pC em diferentes concentrações. A concentração mínima encontrada no soro de pacientes (10 $\mu\text{g/ml}$) promoveu uma modulação em aproximadamente 9% dos monócitos saudáveis, enquanto as demais concentrações, mediana (25 $\mu\text{g/ml}$) e máxima (50 $\mu\text{g/ml}$) promoveram aumento em 15% e 22%, respectivamente (Figura 6).

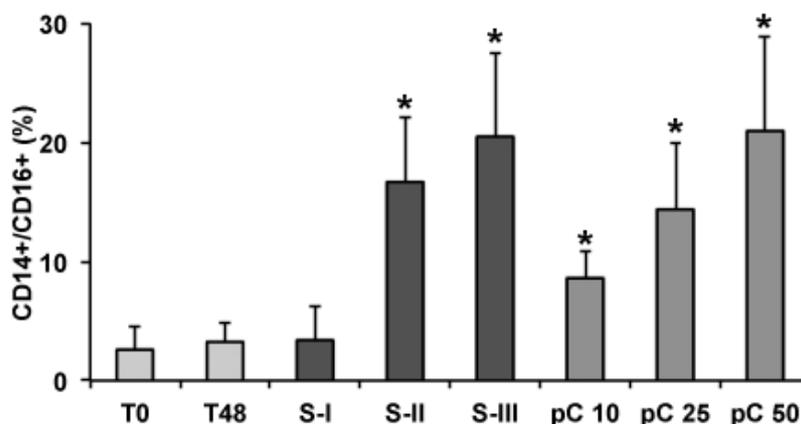


Figura 6 – Modulação da subpopulação de monócitos CD14+/CD16+ induzida pela uremia e pela toxina urêmica pC em células obtidas de indivíduos saudáveis. Monócitos isolados foram marcados com anti-CD14+-FITC/CD16+-PE imediatamente após obtenção (T0) ou após incubação por 48 h somente com RPMI 2% (T48) e na presença de pool de soro urêmico estadiamento 1 e 2 (S-I); estadiamento 3 e 4 (S-II) e estadiamento 5 e 6 (S-III). Ainda as células foram pré-incubadas com p-cresol nas concentrações urêmicas encontradas 10 (pC 10); 25

Os dados são apresentados como % da positividade para dupla marcação \pm DP de cinco ensaios independentes (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus controle negativo – T0/T48).

Em nefrologia, o papel de monócitos CD14+/CD16+ em indivíduos em tratamento de hemodiálise permanece apenas como uma subpopulação de leucócitos, que mostra relevantes alterações celulares transitórias induzidas pelo procedimento de hemodiálise, com membranas biocompatíveis (Nockher et al, 2001; Sester et al, 2001), enquanto historicamente o uso de membranas não biocompatíveis levam a uma profunda neutropenia e monocitopenia (Kaplow; Goffinet 1968). Pouco depois do início de uma sessão de hemodiálise, as contagens de monócitos CD14+/CD16+ diminuem acentuadamente para retornar aproximadamente aos níveis de base ao fim de hemodiálise (Sester et al, 2001). Como consequência, monócitos CD14+/CD16+ têm sido apontados como marcadores de biocompatibilidade (Griveas et al, 2006) e por outro lado, na hemodiafiltração, a combinação entre hemodiálise e hemofiltração foi capaz de reduzir monócitos CD14+/CD16+ circulantes (Carracedo et al, 2006).

Estudos sugerem o envolvimento de macrófagos na remoção de eritrócitos alterados pelo meio urêmico (Bonomini et al, 1999; Bonomini et al, 2001, 2002; Pandolfi et al, 2007). A fagocitose de hemácias provenientes de pacientes urêmicos crônicos em hemodiálise ($51,4\% \pm 1,6\%$ macrófagos positivos, $n=16$) foi significativamente ($P < 0,001$) maior do que a fagocitose de hemácias normais ($13,5\% \pm 0,8\%$ macrófagos positivos, $n=16$). Uma correlação

direta significativa ($r = 0,655$, $P = 0,005$) foi encontrada. Sugerindo o envolvimento desse processo no desenvolvimento da anemia nesses pacientes (Bonomini et al, 1999; Lang & Quadri, 2012). Os monócitos CD14+/CD16+ são maiores que os monócitos clássicos CD14+/CD16-, são mais granulares, mostram características de macrófagos alveolares, o que levou à interpretação de que monócitos CD14+/CD16+ podem ser monócitos mais maduros (Ziegler-Heitbrock et al, 1993), interessante, pesquisas experimentais posteriores utilizando camundongos foram consistentes com esta afirmação (Sunderkotter et al, 2004). Em estudos epidemiológicos a subpopulação de monócitos CD14+/CD16+ foi mostrada estar aumentada em numerosas condições agudas e crônicas inflamatórias. Um estado inflamatório agudo como sepse, por exemplo, leva a uma mudança acentuada para o fenótipo CD14+/CD16+ (Fingerle et al, 1993). Estudos *in vitro* têm mostrado que monócitos CD14+/CD16+, em contraste com monócitos clássicos CD14+/CD16- são secretores de citocinas inflamatórias TNF-alfa (Belge et al, 2002) e IL-12 (Szaflarska et al, 2004), e por outro lado, produzem menos citocina anti-inflamatória, como a IL-10 (Frankenberger et al, 1996).

No presente trabalho, utilizamos duas abordagens experimentais para avaliar a atividade fagocítica dos monócitos atípicos modulados pela uremia. A Figura 7 mostra monócitos de indivíduos saudáveis previamente marcados com anti-CD14-FITC e incubados por 2h à 37°C com eritrócitos do mesmo indivíduo pré-incubados por 48hs com *pool* de soro urêmico, pC em diferentes concentrações ou somente com RPMI 2%. Não houve diferença significativa entre a fagocitose estimulada pelos *pools* de soros urêmicos II e III e as diferentes concentrações de p-Cresol. Porém ambos os estímulos foram capazes de aumentar essa fagocitose se comparado ao controle. Tanto S-III como pC50 foram capazes de induzir aproximadamente 62% e 74% de fagocitose de eritrócitos em eriptose por monócitos clássicos (Figura 7), enquanto 20% dos eritrócitos saudáveis foram fagocitados pelos monócitos. Vale ressaltar que o *pool* de soro urêmico I demonstrou atividade semelhante (26%) ao controle negativo, novamente sugerindo que a progressão da doença e o conseqüente acúmulo de toxinas urêmica podem ser responsáveis por esta atividade. Em um estudo utilizando 32 células de pacientes em tratamento dialítico (HD), 9 de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), 9

indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e 15 controles saudáveis, maior porcentagem de monócitos CD14+/CD16+ foi observada em pacientes em HD. Comparado com monócitos CD14+/CD16-, os monócitos atípicos exibiram expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de células diferenciadas. Além disso, esses monócitos mostraram um aumento da atividade fagocítica. Da mesma forma, monócitos CD14+/CD16+ de pacientes com LES e de HIV mostraram aumento da atividade inflamatória em comparação com monócitos clássicos. Estes resultados confirmam que monócitos CD14+/CD16+ de pacientes em tratamento de hemodiálise são pré-estimulados como células proinflamatórias, semelhantes aos observados no LES e HIV (Ramirez et al, 2006).

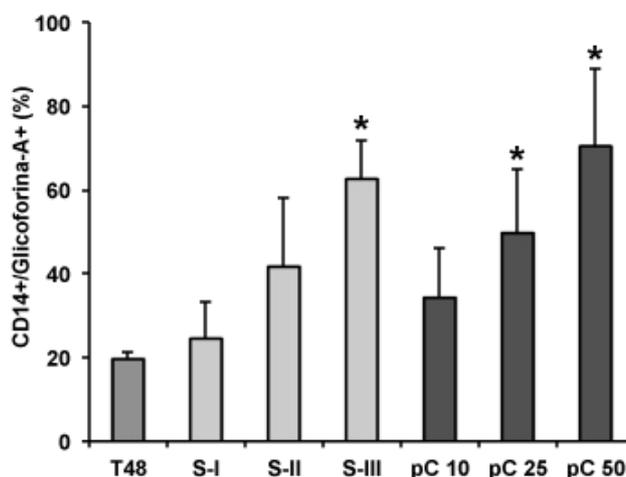


Figura 7 – A uremia e a toxina urêmica pC induzem aumento da fagocitose de eritrócitos em eriptose por monócitos controles. Eritrócitos do sangue total (1:100) foram marcados com anti-Glicoforina-PE após incubação por 48 h somente com RPMI 2% (T48) e na presença de pool de soro urêmico estadiamento 1 e 2 (S-I); estadiamento 3 e 4 (S-II) e estadiamento 5 e 6 (S-III). Ainda as células foram pré-incubadas com p-cresol nas concentrações urêmicas encontradas 10 µg/ml (pC 10); 25 µg/ml (pC 25) e 50 µg/ml (pC 50). Após 48 h, monócitos previamente incubados com anti-CD14+-FITC foram incubados com os eritrócitos por 2 h a 37°C. Análise da fagocitose foi realizada por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como % da positividade para dupla marcação ± DP de cinco ensaios independentes (* p <0,05 versus controle negativo – T48).

A segunda análise de eritrofagocitose realizada está representada na Figura 8. Neste ensaios experimental monócitos de indivíduos saudáveis foram incubados por 48 h com os estímulos urêmicos já descritos, anteriormente à incubação com eritrócitos saudáveis. A modulação dos monócitos atípicos pelo *pool* de soro urêmico não representou aumento na eritrofagocitose de forma acentuada como observamos na Figura 7. S-II e S-III promoveram 33% e 35%

de atividade fagocítica, sendo que somente a fagocitose induzida por S-III estatisticamente significativo em relação aos controles negativos T48 e S-I. Por outro lado, quando observamos o efeito da toxina isolada pC, verificamos um aumento dose-resposta importante na atividade fagocítica de monócitos atípicos. pC 25 e pC 50 induziram cerca de 50% e 73% de eritrofagocitose, respectivamente, enquanto pC 10 induziu 27%, todos estatisticamente relevante quando comparado ao controle negativo T48 (Figura 8).

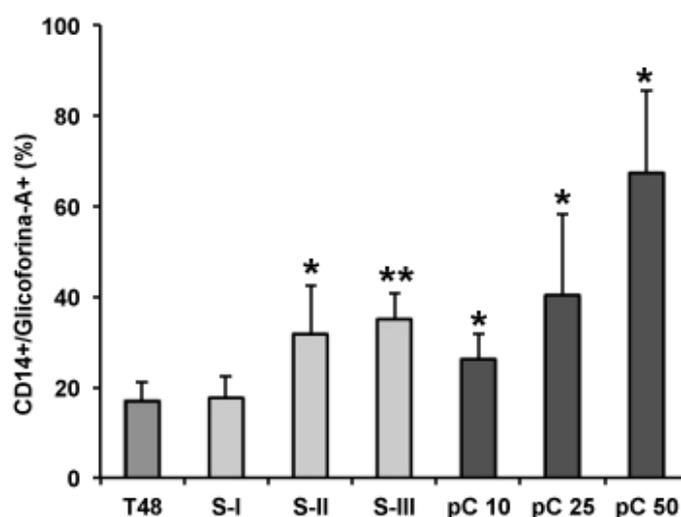


Figura 8 – Monócitos estimulados previamente com *pool* de soro urêmico ou com a toxina pC são capazes de fagocitar eritrócitos controles. Monócitos isolados foram marcados com anti-CD14+-FITC após incubação por 48 h somente com RPMI 2% (T48) e na presença de *pool* de soro urêmico estadiamento 1 e 2 (S-I); estadiamento 3 e 4 (S-II) e estadiamento 5 e 6 (S-III). Ainda as células foram pré-incubadas com p-cresol nas concentrações urêmicas encontradas 10 µg/ml (pC 10); 25 µg/ml (pC 25) e 50 µg/ml (pC 50). Após 48 h, eritrócitos previamente incubados com Glicoforina-A-PE foram adicionados aos poços contendo monócitos para incubação de 2 h a 37°C. Análise da fagocitose foi realizada por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como % da positividade para dupla marcação ± DP de cinco ensaios independentes (* p < 0,05 versus controle negativo – T48).

Atualmente, as diferenças funcionais entre as duas subpopulações de monócitos CD14+/CD16- e CD14+/CD16+ continuam a ser elucidados. Curiosamente, dados *in vitro* sugerem que a produção excessiva de citocinas inflamatórias pode ser limitada ao subtipo CD14+/CD16+ (Skrzeczynska-Moncznik et al, 2008). Evidências experimentais sugerem que os monócitos CD14+/CD16+ exibem potente capacidade de célula apresentadora de antígeno ao contrário de monócitos CD14+/CD16-, com uma possível relação próxima com as células dendríticas. Portanto monócitos CD14+/CD16+ provavelmente desempenham um papel crucial na função imune inata (Ancuta

et al, 2000; Grage-Griebenow et al, 2001; Randolph et al, 2006; Siedlar et al, 2000). Além de ensaios clínicos, há uma necessidade urgente de estudos experimentais sobre a heterogeneidade de monócitos humanos, a fim de lançar luz sobre os mecanismos potenciais para as associações até então observadas na prática clínica. Coletivamente, monócitos CD14+/CD16+ são jogadores importantes em doenças como DRC e aterosclerose, e representam potenciais alvos terapêuticos nestas patologias (Auffray et al, 2007).

Em resumo, nossos resultados corroboram com os achados em pacientes em hemodiálise, uma vez que encontramos em doentes renais crônicos em monitoramento ambulatorial, e portanto em estádios mais precoces da doença, aumento da expressão de FS em eritrócitos e aumento na subpopulação de monócitos atípicos. Ainda, nossos resultados sugerem um papel importante da toxina p-Cresol no desenvolvimento da anemia durante a progressão da doença renal crônica, ao promover a modulação do perfil atípico de monócitos e concomitantemente aumento da exposição de FS na superfície de eritrócitos, culminando com aumento na eritrofagocitose.

5 CONCLUSÕES

Concluimos com esse estudo que:

1. A toxina urêmica p-Cresol foi capaz de modular a exposição de FS em eritrócitos saudáveis, induzindo a eriptose, com comportamento similar ao observado na ação dos pools de soro urêmico.

2. Pacientes em progressão da DRC possuem maior número de eritrócitos em eriptose e monócitos atípicos quando comparados aos indivíduos saudáveis.

3. Tanto a uremia como a toxina p-Cresol foram capazes de modular o fenótipo de monócitos saudáveis CD14+/CD16- para o fenótipo atípico CD14+/CD16+.

4. Ambos os estímulos, soros urêmicos e p-Cresol foram capazes de promover aumento da eriptose e consequente aumento da fagocitose por monócitos controle.

5. Por outro lado, monócitos estimulados com os soros urêmicos ou com a toxina p-Cresol foram capazes de fagocitar eritrócitos controle, porém em menor intensidade quando comparados aos eritrócitos em eriptose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alebiosou, C.O. An update on “progression promoters” in renal diseases. **J Natl Med Assoc**; 95(1): 30-42; 2003.

Ancuta, P.; Weiss, L.; Haeffner-Cavaillon, N.. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. **Eur J Immunol.**; 30(7): 1872-1883; 2000.

Auffray, C.; Fogg, D.; Garfa, M.; Elain, G.; Join-Lambert, O.; Kayal, S.; Sarnacki, S.; Cumano, A.; Lauvau, G.; Geissmann, F. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. **Science.**; 317: 666-670; 2007.

Belge, K.U.; Dayyani, F.; Horelt, A.; Siedlar, M.; Frankenberger, M.; Frankenberger, B.; Espevik, T.; and Ziegler-Heitbrock, L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. **J. Immunol.**; 168: 3536-3542; 2002.

Bernasconi, A.R.; Liste, A.; Del Pino, N.; Rosa-Diez, G.J.; Heguilen, R.M. Folic acid 5 or 15 mg/d similarly reduces plasma homo- cysteine in patients with moderate-advanced chronic renal failure. **Nephrology.**; 11:137-144, 2006.

Besarab, A.; Frinak, S.; Yee, J. An indistinct balance. The safety and efficacy of parenteral iron therapy. **J Am Soc Nephrol.**; 10: 2029–2043, 1999.

Bonomini, M.; Sirolli, V.; Settefrati, N.; Dottori, S.; Liberato, L.; Arduini, A. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol**, 10: 1982-1990, 1999.

Bonomini, M.; Sirolli, V.; Reale, M.; Arduini, A. Involvement of phosphatidylserine exposure in the recognition and phagocytosis of uremic erythrocytes. **Am. J. Kidney Dis.**, 37: 807-814, 2001.

Bonomini, M.; Sirolli, V.; Gizzi, F.; Di Stante, S.; Grilli, A.; Felaco, M. Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure. **Kid Inter.**, 62: 1358-1363, 2002.

Bonomini, M.; Sirolli, V. Uremic toxicity and anemia. **J Nephrol.**, 16(1): 21-28, 2003.

Bonomini, M.; Dottori, S.; Amoroso, L.; Arduini, A.; Sirolli, V. Increased platelet phosphatidylserine exposure and caspase activation in chronic uremia. **J ThrombHaemost.**, 2: 1275-1281, 2004.

Bowry, S.K.; Gatti, E. Impact of hemodialysis therapy on anemia of chronic kidney disease: the potential mechanisms. **BloodPurif.**, 32(3): 210-219, 2011.

Bratosin, D.; Mazurier, J.; Tissier, J.P.; Estaquier, J.; Huart, J.J.; Ameisen, J.C.; Aminoff, D.; Montreuil, J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages: A review. **Biochimic**, 80: 173-195, 1998.

Brines, M.; Cerami, A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions:biology and clinical promise. **KidneyInt.**, 70(2): 246-250, 2006.

Carracedo, J.; Merino, A.; Nogueras, S.; Carretero, D.; Berdud, I.; Ramírez, R.; Tetta, C.; Rodríguez, M.; Martín-Malo, A.; Aljama, P. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: A prospective, crossover study. **J Am SocNephrol.**; 17(8): 2315-2321, 2006.

Carbo, C.; Arderiu, G.; Escolar, G.; Fuste, B.; Cases, A.; Carrascal, M.; Abian, J.; Diaz-Ricart, M. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum. **Am J Kidney Dis.**, 51: 603-612, 2008.

Connor, J.; Pak, C.C.; Schroit, A.J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells: Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. **J Biol Chem.**, 269(4):2399-404, 1994.

Eda, S.; Sherman, I.W. Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. **Cell Physiol Biochem.**, 12(5-6):373-84, 2002.

Erslev, A.J.; Gabuzda, T.G. Pathophysiology of Blood, third edition.Philadelphia: **WB Saunders.**, 28: 134, 1985.

Eschbach, J.W.JR.; Funk, D.; Adamson, J.; Kuhn, I.; Scribner, B.H.; Finch, C.A. Erythropoiesis in patients with renal failure undergoing chronic dialysis. **N Engl J Med.**, 276:653-658, 1967.

Eschbach, J.W.; Egrie, J.C.; Downing, M.R.; Browne, J.K.; Adamson, J.W. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. **N Engl J Med.**, 316(2): 73-78, 1987.

Fadok, V.A.; Bratton, D.L.; Rose, D.M.; Pearson, A.; Ezekewitz, R.A.; Henson, P.M. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. **Nature.**, 405(6782): 85-90, 2000.

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.**, 18(10):1453-9, 2006

Fens, M.H.; Storm, G.; Pelgrim, R.C.; Ultee, A.; Byrne, A.T.; Gaillard, C.A.; Van Solinge, W.W.; Schiffelers, R.M. Erythrophagocytosis by angiogenic endothelial cells is enhanced by loss of erythrocyte deformability. **Exp. Hematol.**, 38:282-291, 2010.

Fingerle, G.; Pforte, A.; Passlick, B.; Blumenstein, M.; Strobel, M.; Ziegler-Heitbrock, H.W. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. **Blood.**, 82: 3170-3176, 1993.

Foley, R.N; Parfrey, P.S; Harnett, J.D.; Kent, G.M.; Murray, D.C.; Barre, P.E. The impact of anemia on cardiomyopathy, morbidity, and mortality in end-stage renal disease. **Am J Kidney Dis.**, 28(1):53-61, 1996.

Föller, M.; Huber, S.M.; Lang, F. Erythrocyte programmed cell death. **IUBMB Life.**, 60(10): 661-668, 2008.

Frankenberger, M.; Sternsdorf, T.; Pechumer, H.; Pforte, A.; and Ziegler-Heitbrock, H.W. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. **Blood.**, 87: 373-377, 1996.

Goicoechea, M.; Martin, J.; DE Sequera, P.; Quiroga, J.A.; Ortiz, A.; Carreño, V.; Caramelo, C. Role of cytokines in the response to erythropoietin in hemodialysis patients. **Kidney Int.**, 54(4):1337-1343, 1998.

Gollapudi, P.; Yoon, J.W.; Gollapudi, S.; Pahl, M.V.; Vaziri, N.B. Leukocyte toll-like receptor expression in end-stage Kidney disease. **Am J Nephrol.**, 31: 247-254, 2010.

Goodnough, L.T.; Skikne, B.; Brugnara, C. Erythropoietin, iron, and erythropoiesis. **Blood.**, 96(3):823-833, 2000.

Guidi, G.C.; Lechi Santonastaso, C. Advancements in anemias related to chronic conditions. **Clin Chem Lab Med.**, 48(9):1217-26, 2010.

Grage-Griebenow, E.; Zawatzky, R.; Kahlert, H.; Brade, L.; Flad, H.; Ernst, M. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. **Eur J Immunol.**, 31(1): 48-56, 2001.

Griveas I, Visvardis G, Sakellariou G, Passadakis P, Thodis I, Vargemezis V, Pavlitou A, Fleva A. Biocompatibility study based on differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ blood monocyte subsets with different dialyzers. **Ren Fail.**, 28(6): 493-499, 2006.

Hanai, H.; Iida, T.; Takeuchi, K.; Watanabe, F.; Yamada, M.; Kikuyama, M.; Maruyama, Y.; Iwaoka, Y.; Hirayama, K.; Nagata, S.; Takai, K. Adsorptive depletion of elevated proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes in patients with inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol.**, 103:1210–1216, 2008.

Henson, P.M.; Bratton, D.L.; Fadok, V.A. Apoptotic cell removal. **Curr Biol.**, 11(19): 795-805, 2001.

Hutchinton, F.N.; Jones, W.J. A cost-effectiveness analysis of anemia screening before erythropoietin in patients with end-stage renal disease. **Am J Kidney Dis.**, 29(5):651-657, 1997.

Jelkmann, W. Regulation of erythropoietin production. **J Physiol.**, 589: 1251–1258, 2011.

Joske, R.A.; Mcalister, J.M.; Prankerd, T.A.J. Isotope investigations of red cell production and destruction in chronic renal disease. **ClinSci.**, 15:511-522, 1956.

Kaplow, L.S.; Goffinet, J.A. Profound neutropenia during the early phase of hemodialysis. **JAMA.**, 25; 203(13): 1135-1137, 1968

Kato, S.; Chmielewski, M.; Honda, H.; Pecoits-Filho, R.; Atsuo, S.; Yuzawa, Y.; Tranaeus, A.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B. Aspects of Immune dysfunction in end-stage renal disease. **Clin. J Am SocNephrol.**, 3: 1526-1533, 2008.

KDOQI. Clinical Practice Guideline and Clinical Practice Recommendations for anemia in chronic kidney disease: 2007 update of hemoglobina target. **Am J KidneyDis.**, 50: 471-530, 2007.

Klahr S. Progression of chronic renal disease. **Heart Dis.**, 3(3): 205- 209, 2001.

Klahr, S.; Morrissey, J. Progression of chronic renal disease. **Am J Kidney Dis.**, 41(3-2): 3-7, 2003.

Kobayashi, N.; Karisola, P.; Pena, C.V.; Dorfman, D.M.; Jinushi, M.; Umetsu, S.E.; Butte, M.J.; Nagumo, H.; Chernova, I.; Zhu, B.; Sharpe, A.H.; Ito, S.; Dranoff, G.; Kaplan, G.G.; Casasnovas, J.M.; Umetsu, D.T.; Dekruyff, R.H.; Freeman, G.J. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells. **Immunity**, 27:927-940, 2007.

Korell, J.; Vos, F.E.; Coulter, C.V.; Schollum, J.B.; Walker, R.J.; Duffull, S. Modeling red blood cell survival data. **J Pharmacokinet Pharmacodyn.**, 38: 787-801, 2011.

Lang, K.S.; Duranton, C.; Poehlmann, H.; Myssina, S.; Bauer, C.; Lang, F.; Wieder, T.; Huber, S.M.
Cation channels trigger apoptotic death of erythrocytes. **Cell Death Differ.**, 10(2): 249-256, 2003.

Lang, K.S.; Lang, P.A.; Bauer, C.; Duranton, C.; Wieder, T.; Huber, S.M.; Lang F.
Mechanisms of suicidal erythrocyte death. **Cell Physiol Biochem.**, ;15(5):195-202, 2005.

Lang, F.; Gulbins, E.; Lang, P.A.; Zappulla, D.; Föller, M. Ceramide in suicidal death of erythrocytes. **Cell PhysiolBiochem.**, 26(1):21-28, 2010.

Lang, F.; Qadri, S.M. Mechanisms and Significance of Eryptosis, the suicidal death of Erythrocytes. **Blood Purif.**, 33: 125-130, 2012.

Ledebo, I. Principles and practice of hemofiltration and hemodiafiltration. **Artif Organs.**, 22(1):20–25, 1998.

Lesaffer, G.; De Smet, R.; Lameire, N.; Dhondt, A.; Duym, P.; Vanholder, R. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. **Nephrol Dial Transplant.**, 15(1): 50–57, 2000.

Levin, A.; Djurdiev, O.; Duncan, J.; Rosenbaum, D.; Werb R. Haemoglobin at time of referral prior to dialysis predicts survival: an association of haemoglobin with long-term outcomes. **Nephrol Dial Transplant.**, 21:370-372006.

Lipsic, E.; Meer, P.; Van Der.; Veldhuisen, D. Erythropoiesis-Stimulating Agents and Heart Failure. **Cardiovascular therapeutics.**, 29: 52-59, 2011.

Loge, J.P.; Lange, R.D.; Moore, L.V. Characterization of the anemia associated with chronic renal insufficiency. **Am J Med.**, 24(1): 4-18, 1958.

Ly, J.; Marticorena, R.; Donnelly, S.; Red Blood Cell Survival in Chronic Renal Failure. **Am J Kidney Dis.**, 44(4): 715-719, 2004.

Macdougall, I.C. Role of uremic toxins in exacerbating anemia in renal failure. **Kidney IntSuppl.**, 78: 67-72, 2001.

McEvoy, L.; Williamson, P.; Schlegel, R.A. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. **Proc Natl Acad Sci.**, (10):3311-5, 1986.

Marques, A.B.; Pereira, D.C.; Ribeiro, R.C.H.M. Motivo e frequência de internação dos pacientes com IRC em tratamento hemodialítico. **ArqCiêncSaúde.**, 12(2): 67-72, 2005.

Martinez, F.O. The transcriptome of human monocyte subsets begins to emerge. **J Biol.**, 8: 99, 2009.

Massry, S.G. Pathogenesis of the anemia of uremia: role of secondary hyperparathyroidism. **Kidney IntSuppl.**, 16: 204-207, 1983.

Merino, A.; Nogueras, S.; García-Maceira, T.; Rodríguez, M.; Martín-Malo, A.; Ramirez, R.; Carracedo, J.; Aljama, P. Bacterial DNA and endothelial damage in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant.**, 23(11):3635-3642, 2008.

Merino, A.; Nogueras, S.; Buendía, P.; Ojeda, R.; Carracedo, J.; Ramirez-Chamond, R.; Martín-Malo, A.; Aljama, P. Microinflammation and endothelial damage in hemodialysis. **Contrib Nephrol.**, 161: 83-88, 2008.

Nockher, W.A.; Scherberich, J.E. Expanded CD14⁺ CD16⁺ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. **Infect Immun.**, 66(6): 2782-2790, 1998.

Nockher, W.A.; Wiemer, J.; Scherberich, J.E. Haemodialysis monocytopenia: differential sequestration kinetics of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺⁺ blood monocyte subsets. **Clin. Exp. Immunol.**, 123(1): 49-55, 2001.

Noguchi, C.T.; Asavaritikrai, P.; Teng, R.; Jia, Y. Role of erythropoietin in the brain. **Crit Rev Oncol Hematol.**, 64: 159-171, 2007.

Noh, J.Y.; Park, J.S.; Lim, K.M.; Kim, K.; Bae, O.N.; Chung, S.M.; Shin, S.; Chung, J.H. A naphthoquinone derivative can induce anemia through phosphatidylserine exposure-mediated erythrophagocytosis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 333:414-420, 2010.

Nurko, S. Anemia in chronic kidney disease: causes, diagnosis, treatment. **Cleve Clin J Med.**, 73(3):289-297, 2006.

Pandolfi, A.; Pietro, N.D.I.; Sirolli, V.; Giardinelli, A.; Silvestre, S.D.I.; Amoroso, L.; Tomo, P.D.I.; Capani, F.; Consoli, A.; Bonomini, M. Mechanisms of Uremic Erythrocyte-Induced Adhesion of Human Monocytes to Cultured Endothelial Cells. **J Cell Physiol.**, 699-709, 2007.

Passlick, B.; Flieger, D.; Ziegler-Heitbrock, H.W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. **Blood.**, 74(7): 2527-2534, 1989.

Ramirez, R.; Carracedo, J.; Berdud, I.; Carretero, D.; Merino, A.; Rodríguez, M.; Tetta, C.; Martín-Malo, A.; Aljama, P. Microinflammation in hemodialysis is

related to a preactivated subset of monocytes. **Hemodial Int.**, Suppl 1:S24-7, 2006;.

Randolph, G.J.; Sanchez-Schmitz, G.; Liebman, R.M.; Schäkel, K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. **J Exp Med.**, 196(4): 517-527, 2002.

Romão Junior, J.E. Doença renal crônica: Definição, epidemiologia e classificação. **J BrasNefrol.**, 26(3): 1-3, 2004.

Schena, F. Management of patients with chronic kidney disease. **InternEmerg Med.**, 6 (1): 77-83, 2011.

Sester, U.; Sester, M.; Heine, G.; Kaul, H.; Girndt, M.; Köhler, H. Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. **Nephrol Dial Transplant.**, 16(7): 1402-1408, 2001.

Shumilina, E.V.; Khromova, Y.u.L.; Shchipunov, Y. A. The Effect of Lysophosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol on Lecithin Polymer-Like Micelles. **KolloidnyiZhurnal.**, 68(2): 269–276, 2006.

Siedlar, M.; Frankenberger, M.; Ziegler-Heitbrock, L.H.; Belge, K.U. The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes. **Immunobiology**, 202(1): 11-17, 2000.

Sunderkotter, C.; Nikolic, T.; Dillon, M.J.; Van Rooijen, N.; Stehling, M.; Drevets, D.A.; Leenen, P.J.I. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **J. Immunol.**, 172: 4410-4417, 2004.

Skrzeczynska-Moncznik, J.; Bzowska, M.; Loseke, S.; Grage-Griebenow, E.; Zembala, M.; Pryjma, J. Peripheral blood CD14^{high} CD16 monocytes are main producers of IL-10. **Scand. J Immunol.** 67(2):152-159, 2008.

Szaflarska, A.; Baj-Krzyworzeka, M.; Siedlar, M.; Weglarczyk, K.; Ruggiero, I.; Hajto, B.; Zembala, M. Antitumor response of CD14⁺/CD16⁺ monocyte subpopulation. **ExpHematol.**, 32(8): 748-755, 2004.

Tacke, F.; Randolph, G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology.**, 211(6-8):609-618, 2006.

Takeyama, N.; Yabuki, T.; Kumagai, T.; Takagi, S.; Takamoto, S.; Noguchi, H. Selective expansion of the CD14(+)/CD16(bright) subpopulation of circulating monocytes in patients with hemophagocytic syndrome. **Ann. Hematol.**, 86: 787-792, 2007.

Tsagalidis, G. Renal anemia: a nephrologist's view. **Hippokratia**; 15(15): 39-43, 2011.

Terpstra, V.; van Berkel, T.J. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice. **Blood.**, 95(6):2157-63, 2000.

Vanholder, R.; De Smet, R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. **J Am SocNephrol**, 10(8):1815–1823, 1999.

Vanholder, R.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P.P.; Deppisch, R.; Descamps-Latscha, B.; Henle, T.; Jorres, A.; Massy, Z.A.; Rodriguez, M.; Stegmayr, B.; Stenvinkel, P.; Wratten, M.L. Uremic toxicity: present state of the art. **Int J Artif Organs.**, 24(10): 695-725, 2001.

Vanholder, R. ; De Smet, R. ; Glorieux, G. ; Argilés, A. ; Baurmeister, U. ; Brunet, P. ; Clark, W. ; Cohen, G. ; De Deyn, P.P. ; Deppisch, R. ; Descamps-Latscha, B. ; Henle, T. ; Jörres, A. ; Lemke, H.D. ; Massy, Z.A. ; Passlick-Deetjen, J. ; Rodriguez, M. ; Stegmayr, B. ; Stenvinkel, P. ; Tetta, C. ; Wanner, C. ; Zidek, W. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney Int.**, 63(5): 1934–1943, 2003.

Vaziri, N. D.; Pahl, M.Y.; Crum, A.; Norris, K. Effect of uremia on structure and function of immune system. **J RenNutr.**, 22(1): 149-156, 2012

Voormolen, N.; Grootendorst, D.C.; Urlings, T.A.; Boeschoten, E.W.; Sijpkens, Y.W.; Huisman, R.M.; Krediet, R.T.; Dekker, F.W. Prevalence of anemia and its impact on mortality and hospitalization rate in predialysis patients. **Nephron ClinPract.**, 115(2): 133-141, 2010.

Weissinger, E.M.; Kaiser, T.; Meert, N.; De Smet, R.; Walden, M.; Mischak, H.; Vanholder, R.C. Proteomics: a novel tool to unravel the patho-physiology of uraemia. **Nephrol Dial Transplant** ., 19: 3068-3077, 2004;.

Wood, B.L; Gibson, D.F; Tait, J.F. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations. **Blood.**, 1;88(5):1873-80, 1996.

Yilmaz, M.I.; Solak, Y.; Covic, A.; Goldsmith, D. Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory. **Blood purify.**, 32: 220-225, 2011.

Zatz, R. Insuficiência renal crônica: mecanismos de adaptação e progressão. In: Riella MC. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. 3ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1996; 450-455.

Ziegler-Heitbrock, H.W. The biology of the monocytesystem. **Eur J Cell Biol.**, 49(1): 1-12, 1989

Ziegler-Heitbrock, H.W.; Fingerle, G.; Ströbel, M.; Schraut, W.; Stelter, F.; Schütt, C.; Passlick, B.; Pforte, A. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. **Eur J Immunol.**; 23: 2053-2058, 1993.

Ziegler-Heitbrock, H.W.L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. **Immunol Today.**, 17: 424-428, 1996.

Ziegler-Heitbrock, L.; Ancuta, P.; Crowe, S.; Dalod, M.; Grau, V.; Hart, D.N.; Leenen, P.J.; Liu, Y.J.; MacPherson, G.; Randolph, G.J.; Scherberich, J.; Schmitz, J.; Shortman, K.; Sozzani, S.; Strobl, H.; Zembala, M.; Austyn, J.M.; Lutz, M.B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood.** 21,116(16):74-80, 2010.