

LEIDY JOHANA NOGUERA GAVIRIA

INVESTIGAÇÃO DO IMPACTO DA HEMODIÁLISE NA POPULAÇÃO E CARGA DE
MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES NO SORO DE PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA

BRASÍLIA

2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LEIDY JOHANA NOGUERA GAVIRIA

INVESTIGAÇÃO DO IMPACTO DA HEMODIÁLISE NA POPULAÇÃO E CARGA DE
MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES NO SORO DE PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

BRASÍLIA

2018

LEIDY JOHANA NOGUERA GAVIRIA

INVESTIGAÇÃO DO IMPACTO DA HEMODIÁLISE NA POPULAÇÃO E CARGA DE
MICROVESÍCULAS EXTRACELULARES NO SORO DE PACIENTES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Aprovado em (28) (02) (2018)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira - (presidente)

Universidade de Brasília

Prof. Dr. Francisco de Asis Rocha Neves

Universidade de Brasília

Prof. Dra. Rosangela Vieira de Andrade

Universidade Católica de Brasília

Dedico este trabalho aos meus país, irmão, sobrinha, primas e tia.

AGRADECIMENTOS

***A Dios**, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este periodo de formación.*

***A mi madre Rosario Gaviria**, por darme la vida, creer en mí y por haberme apoyado en todo momento, aun desde la distancia. Por sus consejos, sus valores, y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.*

***A mi padre Julio Noguera**, por los ejemplos de perseverancia, responsabilidad, compromiso y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.*

Mis padres son el pilar fundamental de todo lo que soy, de toda mi educación, tanto académica, como de la vida, agradezco su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

***A mi orientador Rinaldo Wellerson Pereira**, por todo lo aprendido, y por su gran apoyo ofrecido siempre durante este proceso. Además de la motivación para la culminación de esta maestría y por impulsar el desarrollo de mi formación y crecimiento profesional.*

***A mis familiares y amigos** en Colombia que siempre estuvieron ahí directa o indirectamente, apoyándome y dándome muchas fuerzas para alcanzar esta victoria tan anhelada, no saben cuánto lo valoro y agradezco, en especial mi hermano Julio, mis primas Alejandra, Dayana, mi tía Gloria Noguera y abuela Stella de Noguera.*

***A mi amiga Dianny Jimenez** que fue la persona que creyó en mí y me puso en este camino de la ciencia, además de siempre estar levantando mi ánimo, motivándome a luchar por mis sueños y ayudándome a ser una mejor profesional y persona.*

*Al profesor **Felipe Saldanha Araujo**, el medico **Edmilson Moura**, las estudiantes **Teresa Raquel Serejo**, **Beatriz Argolo**, además de los **miembros y pacientes de la clínica Soclimed DF**, a todos ellos gracias por su compromiso, dedicación, ayuda intelectual y soporte técnico en este trabajo.*

*Finalmente a todas las personas, amigos que me acogieron en este país y que de una u otra forma han estado presentes durante todos estos años, brindándome su cariño y apoyo, en especial **Marina Nogueira y Natalia Gurgel**.*

" Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é se não uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota".

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é considerada um dano renal que induz a perda progressiva da função dos rins, a qual não pode ser revertida. Os pacientes portadores de DRC necessitam da hemodiálise como terapia de substituição renal. A hemodiálise melhora a qualidade de vida do paciente, mas também tem consequências negativas, como o desencadeamento de um estado de inflamação crônica no paciente, que por sua vez se associa com um alto risco cardiovascular. Este trabalho teve como objetivo investigar se a hemodiálise em pacientes com doença renal crônica altera a população e a função de vesículas extracelulares (EVs) (exossomos e microvesículas).

Amostras de sangue de 7 (sete) indivíduos portadores de DRC ativos em programa de hemodiálise foram coletadas. As amostras de soro obtidas a partir das amostras de sangue coletados antes e após a realização da hemodiálise foram utilizadas para realização de testes Proteína C Reativa - PCR LÁTEX e técnicas de purificação e caracterização de EVs. As EVs foram avaliadas quanto a quantidade e distribuição do tamanho pelo método de pulso resistivo (do inglês, Tunable Resistive Pulse Sensing). A estrutura das EVs foi avaliada por microscopia eletrônica. A detecção de proteínas marcadoras de exossomos por Western Blot foi utilizada para reforçar a presença de EVs. O potencial inflamatório das EVs foi testado pelo ensaio de ativação celular com células mononucleares de sangue periférico (CMSP) avaliado por citometria de fluxo.

Os pacientes estudados apresentam um processo inflamatório avaliado pela PCR. As amostras coletadas após o procedimento de hemodiálise apresentaram aumento na contagem de EVs. Exceção feita a um paciente que interessantemente tinha o maior valor de PCR. Os resultados de proliferação celular induzidos por EVs não permitiu uma conclusão sobre o potencial anti ou pró inflamatório das EVs após a hemodiálise. A observação de que há um aumento na população de EVs após o procedimento de hemodiálise abre o caminho para que se possa investigar com maior detalhamento o papel destas EVs no risco para o desenvolvimento da doença cardio renal.

.Palavras-chave: Doença Renal Crônica, hemodiálise, inflamação crônica, Vesículas extracelulares.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a progressive and irreversible loss of function from the kidney. The CKD patients require hemodialysis as renal replacement therapy. Hemodialysis is mandatory to improve the quality of life of CKD patients. However, it also has negative consequences, such as the increased risk of cardiovascular disease, what is believed to be triggered by an inflammatory state in the hemodialysis patient. This study aimed to investigate whether CKD patients under hemodialysis show changes in the quantity and function of EVs (exosomes and microvesicles) prior and after the hemodialysis procedure.

Seven blood samples from CKD patients under hemodialysis therapy were collected. Serum samples obtained from blood samples collected before and after the completion of hemodialysis were used for CRP (C Reactive Protein) testing using the CRP latex technique. Tunable Resistive Pulse Sensing technique was used to evaluate EVs concentration and size distribution. Electron microscopy was used to investigate the EVs structure. Exosome-associated proteins were assayed using Western blotting. Flow cytometry was used to evaluate peripheral blood mononuclear cells (PBMC) proliferation under the presence of EVs purified prior or after the hemodialysis.

CRP test showed that all patients are in an inflammatory state both prior and after the hemodialysis. Based on the data of the seven patients the EVs concentration showed to be increased after the hemodialysis procedure. Cell proliferation induced by EVs purified prior and after the hemodialysis did not allow a conclusion about the inflammatory potential of the EVs after hemodialysis. The observation that there is an increase in the population of EVs after the hemodialysis procedure opens the way so that we can investigate in more detail the role of these EVs in CKD patients under hemodialysis.

Keywords: chronic kidney disease, hemodialysis, chronic inflammation, extracellular vesicles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Classificação e nomenclatura para as vesículas extracelulares.....	25
Figura 2- Biogênese dos exossomos.....	28
Figura 3- Biogênese das microvesículas.....	30
Figura 4- Purificação de vesículas extracelulares.....	45
Figura 5- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 1 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	47
Figura 6- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 2 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	47
Figura 7- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 3 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	48
Figura 8- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 4 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	48
Figura 9- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 5 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	49
Figura 10- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 6 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	49
Figura 11- Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 7 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm.....	50
Figura 12- Concentrações relativas de EVs em pacientes com Doença Renal Crônica em hemodiálise.....	51

Figura 13- Western blot de proteínas marcadoras de exossomos, demonstrando a presença de EVs (exossomos)	53
Figura 14- Micrografias eletrônicas de isolamento EVs do soro de paciente antes da hemodiálise.....	54
Figura 15- Marcadores de ativação linfocitária.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela–1 Dados demográficos e características clinicas dos pacientes.....	43
Tabela – 2 Resultado Proteína C Reativa.....	44
Tabela – 3 Valores de diâmetro de EVs e concentração medidos pelo método de resistência de pulso (do inglês Tunable Resistive Pulse Sensing)	46
Tabela – 4 Concentração de proteínas totais pelo método colorimétrico de dosagem de proteínas (Bradford)	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Aloficocianina (do inglês, Allophycocyanin)
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: deoxyribonucleic acid)
DRC	Doença renal crônica
ESCRT	Complexos de liberação endossomal (do inglês, endosomal sorting complex required for transport)
EVs	Vesículas extracelulares (do inglês, extracellular vesicles)
EV-TRACK	Relatórios transparentes do conhecimento em pesquisa de EVs
FAV	fístula arteriovenosa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, fluorescein isothiocyanate)
fMLP	N-Formilmetionina-Leucil-Fenilalanina
GPX	Glutathione peroxidase eritrocitaria
ILV	Vesículas intraluminais
IRC	Insuficiência renal crônica
ISEV	ISEV Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	microRNAs
MVB	Corpos multivesiculares
NBT/BCIP	AP color development buffer-kit comercial Bio-rad
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Proteína C reativa
PercP	Complexo proteico clorofil peridina
PHA	Fitohemaglutinina
PTA	Ácido fosfotungstico
PVDF	Polyvinylidene fluoride (do inglês, <i>Polyvinylidene Difluoride</i>).
RLAX	Partículas de látex recobertas com IgG de cabra anti-PCR humana
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês sodium dodecyl sulfate)
SOD	Superóxido dismutase
TBST 1X	Tampão Tris Salino com Tween 20
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

H ₂ O	Água
Cm	Centímetros
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
NaCl	Cloreto de sódio
°C	Graus centígrados
h	Horas
L	Litros
µg	Microgramas
µl	Microlitros
µm	Micrometros
mM	Micro Molar
mA	Mil amperes
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
M	Molaridade
nA	Nano ampéres
nm	Nanômetros
g	Força gravitacional
%	Porcentagem
RPM	Revoluções por minuto
KVs	Tensão elétrica
V	Voltagem
(v/v)	% Volume/Volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
1.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA	17
1.1.1	Consequências da Hemodiálises na Doença Renal Crônica.....	17
1.1.2	Inflamação na Doença Renal Crônica.....	19
1.1.2.1	Inflamação no Paciente em Hemodiálises.....	19
1.1.2.2	Marcadores da Inflamação.....	21
1.1.3	Doença Cardiovascular: Principal Comorbidade na Doença Renal Crônica.....	21
1.2	VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVs)	22
1.2.1	Classificação das Vesículas Extracelulares.....	24
1.2.1.1	Microvesículas e Exossomos.....	26
1.2.1.2	Biogênese.....	27
1.2.1.2.1	<i>Exossomos.....</i>	<i>27</i>
1.2.1.2.2	<i>Microvesículas</i>	<i>28</i>
1.3	PAPEL DAS VESICULAS EXTRACELULARES NA INFLAMAÇÃO.....	30
1.4	VESÍCULAS EXTRACELULARES NA DOENÇA RENAL.....	32
1.5	VESÍCULAS EXTRACELULARES E DOENÇA CARDIOVASCULAR COMO PRINCIPAL RISCO NO PACIENTE RENAL CRÔNICO.....	34
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	PACIENTES.....	37
3.2	COLETA DE SANGUE.....	37
3.3	PROTEÍNA C REATIVA (PCR LÁTEX)	38
3.4	PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	38
3.4.1	Precipitação por polímero (ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences))	38
3.4.2	Ultrafiltração.....	39

3.5	CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PELO MÉTODO TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING.....	39
3.6	WESTERN BLOT.....	39
3.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	41
3.8	ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E ENSAIO DE ATIVAÇÃO CELULAR.....	41
3.8.1	Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP)	41
3.8.2	Ensaio de Ativação celular.....	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
3.10	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	42
4.	RESULTADOS.....	43
4.1	DADOS DOS PACIENTES.....	43
4.2	PROTEÍNA C REATIVA (PCR LÁTEX)	44
4.3	PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	44
4.4	CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PELO MÉTODO TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING.....	45
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS MARCADORAS DE EVs PELO MÉTODO WESTERN BLOT.....	51
4.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	54
4.7	ENSAIO DE ATIVAÇÃO CELULAR.....	55
5.	DISCUSSÃO.....	57
6.	CONCLUSÃO.....	64
7.	REFERENCIAS.....	66
8.	APÊNDICE A- TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE EVS DE CADA PACIENTE ANTES E DEPOIS DA HEMODIÁLISE PELO METODO TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING.....	84
9.	ANEXO - A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO...91	

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

De acordo com Junior JER (2004) a doença renal crônica é considerada um dano renal que induz ao detrimento progressivo da função dos rins, o qual não pode ser revertido. Na etapa final que é denominada fase terminal da insuficiência renal crônica (IRC), os rins não conseguem sustentar a normalidade do meio interno do paciente. (1)

Os rins possuem uma função indispensável na fisiologia humana, que consiste em controlar a composição e o volume dos líquidos corporais, podendo manter um ambiente celular constante e estável para realizar funções de excreção dos produtos não desejáveis no metabolismo e de substâncias, produtos químicos e fármacos. (2) Além disso regulam a pressão arterial mediante a secreção da enzima renina e controlando o pH sanguíneo, fazendo a secreção dos íons hidrogênio e mantendo os íons bicarbonato na urina. (3) Quando existe um desequilíbrio na função renal pode ocorrer o que se conhece como insuficiência renal crônica, doença que tem uma alta morbimortalidade causada pela perda da capacidade do rim em realizar funções principais, decorrente da elevada perda de nefrons funcionais. Perda que é irreversível e lentamente progressiva, até levar o indivíduo a doença renal terminal. O paciente será submetido à terapia de substituição renal, modalidade que recebe o nome de diálise, podendo ser de dois tipos: peritoneal e hemodiálises. (4) Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia a hemodiálise é um procedimento mediante o qual um equipamento limpa e filtra o sangue, além de controlar a pressão arterial e equilibrar a concentração de substâncias como ureia, potássio, creatinina e sódio.

1.1.1 Consequências negativas da Hemodiálises na Doença Renal Crônica

O número de pacientes com doença renal crônica em estágio terminal, mantidos em programa crônico de diálise apresenta alta prevalência, atualmente a doença já atinge 10% da população no mundo. Não obstante, os pacientes portadores de doença renal terminal tornem-se dependentes de transplante renal, precisam de tratamento hemodialítico para remover substâncias indesejáveis do

sangue, fazendo uma depuração artificial, entretanto, o contato das células sanguíneas com a membrana de hemodiálise pode ativar a cascata de complemento, aumentando a resposta inflamatória. (5) As causas da inflamação nos pacientes em hemodiálise são multifatoriais, incluindo os fatores relacionados com a diálise (infecções de fístula, bioincompatibilidade, pureza do dialisado e retrofiltração) como não relacionados com a diálise. A grande preocupação que acarreta este estado é que pode incidir futuramente em doença cardiovascular. (6) A supressão da síntese da albumina, transferrina e outras proteínas negativas da fase aguda, além do aumento da taxa de catabolismo são consequências da inflamação que influenciam uma má nutrição moderada resultando na redução dos níveis destas proteínas no paciente em diálise. (7)

O desenvolvimento da doença renal crônica envolve diversos fatores de risco, como a associação as consequências da perda de nefrons que pode desencadear distúrbios metabólicos, entre estes, a hiperfibrinogenia, hiperhomocisteinemia e estresse oxidativo. Este último, é um fator relevante em pacientes hemodializados principalmente o estresse oxidativo intracelular, que poderia dever-se a uma diminuição das atividades de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase eritrocitária (GPX) decorrentes de um possível dano oxidativo durante a hemodiálise. (8,9)

Estudos sugerem que a uremia pode ser considerada como um estado pró-oxidante, observando diminuição da atividade antioxidante e elevados níveis de lipoperoxidação. Porém ainda não está claro a procedência deste estado e se o mesmo é intensificado ou agravado pela diálise. (8,10,11) Pode se dizer que a lipoperoxidação tem uma possível associação a patologias de diversas doenças encontradas em pacientes que realizam hemodiálise, hipótese que se relaciona com aumento no nível plasmático de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, um marcador de peroxidação lipídica, que tem sido relatado em indivíduos que padecem de doença renal crônica e realizam tratamento de diálise. (8,10,12)

Os marcadores de estresse oxidativo estão aumentados nos pacientes e com dano renal crônico em diálise, mais também seus mecanismos de defesa apresentam um quadro clínico de supressão, estado que favorece a uma redução do sistema enzimático e não enzimático de defesa, permitindo o ataque das espécies reativas de oxigênio as células gerando dano celular. (8,12,13) A produção destas diversas espécies reativas de oxigênio em excesso como mecanismo de defesa de

antioxidantes endógenos promove o estado de estresse oxidativo, provocando implicações biológicas. Os oxidantes comprometem todas as etapas da resposta inflamatória. Alguns estudos mostram que marcadores de estresse oxidativo estão aumentados no paciente com insuficiência renal crônica em diálise, por tanto, o mecanismo do estresse oxidativo representa para estes indivíduos, o aumento da indução da resposta inflamatória. (9,13,14)

1.1.2 Inflamação na Doença Renal Crônica

Durante vários anos a inflamação crônica no paciente em terapia substitutiva tem sido reconhecida como a responsável por uma variedade de estados patológicos, abarcando uma triagem entre desnutrição, inflamação, e ateroscleroses que tem sido estabelecida na maior parte dos pacientes com DRC em diálise. (15) A DRC se caracteriza por um estado de inflamação crônica que parece estar relacionado com estresse oxidativo, disfunção endotelial e calcificação vascular. (16) A inflamação na DRC conduz a redução da massa muscular, aumento do catabolismo da proteína muscular e o bloqueio da síntese muscular. Além de alterar a composição de proteínas plasmáticas, a estrutura e função endotelial promovendo o dano vascular.

Os pacientes com DRC em etapa terminal tem uma mortalidade superior que é difícil explicar com fatores de risco tradicional de ateroscleroses. Como hipertensão, dislipidemias mais também outros fatores como inflamação, desnutrição e predisposição a infecção. Os pacientes em hemodiálise crônica tem maior risco de morbidade e mortalidade em comparação com a população geral. Entre os diversos fatores associados a ateroscleroses, têm-se prestado maior atenção a inflamação e suas consequências nesta população. (17–19)

1.1.2.1 Inflamação no Paciente em Hemodiálises

A hemodiálise como modalidade de substituição renal melhora a qualidade de vida do paciente com DRC, ao mesmo tempo esta terapia representa um desafio composto pelos sistemas de complemento, contato e coagulação. (20) A inflamação nos pacientes em hemodiálise pode provocar lesões cardiovasculares. O tratamento de diálise pode originar fatores de risco adicionais para a inflamação

como um maior risco de infecções locais de fístula, membrana de diálises bioincompatível, líquido de diálises, exposição a endotoxinas, infecções crônicas e má nutrição. (21,22)

As causas da inflamação sistêmica na doença renal terminal são múltiplas e incluem doenças relacionadas e relacionadas ao tratamento. A uremia é um estado de imunidade relacionado à disfunção que leva a susceptibilidade a infecções e assim a inflamação. (23) Nos pacientes em tratamento de hemodiálise, o contato entre o sangue e os materiais utilizados para a circulação extracorpórea provocam a ativação de plaquetas, leucócitos e os sistemas de complemento (a coagulação, liderando as reações tromboembólicas), estresse oxidativo e mudanças nos níveis de citocinas pro-inflamatória e anti-inflamatória. (24,25) Notavelmente, a incidência de eventos cardiovasculares na doença são muito altos nas primeiras semanas após o início de hemodiálise, esta terapia tem efeitos agudos sobre perfis de transcrição de citocinas que potencialmente promovem inflamação. (26,27) Um estudo utilizou um antagonista do receptor de IL-1 β para reduzir a inflamação em pacientes em hemodiálise e apesar de observar uma redução nos níveis de proteína C reativa e IL-6, os efeitos desta estratégia sobre o resultado dos pacientes não foi demonstrado. (28)

Em pacientes em hemodiálise crônica, a má nutrição representa um maior risco de progressão da doença cardiovascular aterosclerótica. Na etapa inicial das doenças renais não diabéticas, o processo inflamatório é maior e tem como resultado a má nutrição e conseqüente desenvolvimento de risco a doenças cardíacas. Dados disponíveis sugerem que o paciente com DRC, inclusive em situações estáveis tem aumentados alguns marcadores inflamatórios como a proteína C reativa, e as citocinas IL-8, IL-2, IL-6, IL-1 β y TNF- α e fibrinogênio sérico. Estes marcadores poderiam predizer ao longo prazo o risco cardiovascular e mortalidade no paciente com doença renal em diálise. (18,29,30)

Finalmente sugere-se que a doença renal terminal se associa com um alto risco de doença cardiovascular, e embora seja necessária a substituição parcial da função excretora dos rins mediante este tratamento o risco é maior nos pacientes em hemodiálise. Este mesmo risco está associado com a inflamação sistêmica e aspectos da ativação imune nestes pacientes. O desencadeamento da cascata da coagulação resultante da ativação durante a hemodiálise é um mecanismo que pode

ser potencialmente importante na contribuição do alto risco de doença cardiovascular no paciente renal em estágio terminal. (20,31)

1.1.2.2 Marcadores da Inflamação

Embora a proteína C reativa (PCR) é um marcador importante para a identificação e controle da inflamação na prática clínica, existem outros marcadores disponíveis para a avaliação e monitoramento do estado inflamatório. Os níveis séricos de PCR de alta sensibilidade, fator de necrose tumoral (TNF-alfa), albumina e adiponectina também aumentam no paciente com insuficiência renal crônica. (32,33)

O diagnóstico bioquímico de inflamação se estabelece mediante comprovação de uma elevação dos mediadores inflamatórios (interleucinas: IL-6, IL-1, TNF-alfa), ou determinadas proteínas da fase aguda. Os níveis elevados deste tipo de proteínas de sínteses hepática é o resultado de uma indução enzimática que na maioria dos casos é gerada pelos mediadores inflamatórios, principalmente pela IL-6. (34)

Ainda não existe um consenso sobre que tipo de marcadores devem ser analisados para valorar o grau de inflamação crônica entre os pacientes com DRC, da mesma forma sobre que concentração destes marcadores mostraria a diferença entre pacientes inflamados e não inflamados. O marcador mais fácil e mensurável para detectar a presença de inflamação é a PCR que forma parte do sistema de imunidade inata. Não obstante, embora a perda da função renal possa conduzir ao estresse oxidativo e promover inflamação, a correlação entre PCR e IL-6 não é muito significativa e a iniciação de diálise não reduz a inflamação. (35,36)

A resposta inflamatória na DRC pode ser decorrente de alguns mecanismos referidos na literatura como o aumento do estresse oxidativo, diminuição dos antioxidantes, diminuição do aclaramento de citocinas pró inflamatórias, alteração do sistema imune, e aumento da presença de comorbidades.

1.1.3 Doença Cardiovascular: Principal Comorbidade na Doença Renal Crônica

Pode-se dizer que a morte cardiovascular é a principal causa de mortalidade e morbidade em pacientes com DRC submetidos a diálise, ao mesmo tempo é possível que os fatores de risco tradicionais comuns nos pacientes, não sejam suficientes para explicar a alta prevalência da doença cardiovascular nesta afeição. (37) Neste sentido, o aumento da incidência e prevalência da doença cardiovascular na DRC e o avanço da uremia não pode se explicar utilizando modelos tradicionais e perfis de risco para o desenvolvimento da aterosclerose na população geral. (38) O risco cardiovascular pode ser elevado em pacientes urêmicos mediante um possível mecanismo relacionado com hemostasia disfuncional. O ambiente urêmico provoca defeitos na função plaquetária se manifestando como uma diminuição da aderência ao subendotélio vascular. (39) Não obstante, os níveis de fator de von Willebrand e fibrinogênio circulantes estejam em condições normais em pacientes renais crônicos submetidos a diálise, os níveis de fatores de coagulação são perturbados o que pode desencadear uma diátese hemorrágica. (40,41)

No entanto, tem-se uma evidência de que os pacientes com doença renal em estágio final experimentam uma alta incidência de eventos trombóticos, incluindo trombose de acesso arteriovenoso em pacientes em hemodiálise, (42) trombose venosa profunda espontânea e embolia pulmonar. (43) Neste sentido, uma variedade de mecanismos potenciais podem aumentar o risco pró-trombótico, incluindo hiperagregabilidade plaquetária, e possível presença de microvesículas procoagulantes, biopartículas que fazem parte de um grande grupo chamado vesículas extracelulares (EVs). (44)

Embora as comorbidades que apresentam os pacientes renais em hemodíalises tenham uma explicação biológica e clínica, ainda não está totalmente esclarecida e sabe-se pouco da causa específica que desencadeia uma inflamação crônica nesta população. Na atualidade tem sido proposto que as Vesículas Extracelulares EVs pudessem desempenhar um papel na patogênese de diversas doenças e condições inflamatórias transportando moléculas associadas a danos causados por agentes patogênicos padrões. (45)

1.2 VESÍCULAS EXTRACELULARES (EVs)

O processo de comunicação célula a célula é mediado pela transferência de informação por meio de diversos mecanismos importantes na biologia de qualquer doença. Nos organismos multicelulares, acredita-se que essa comunicação intercelular tem implícita a secreção de fatores solúveis como citocinas, fatores de crescimento e mediadores celulares (lipídios bioativos, nucleotídeos, íons de óxido nítrico). Além disso, a transmissão da informação pode dar-se pela adesão célula a célula intercedida por um conjunto particularizado de moléculas de adesão e, finalmente, pelo intercâmbio de informação utilizando nanotúbulos (46,47).

O espaço extracelular de organismos multicelulares contém íons, proteínas, polissacarídeos e soluções de metabólitos, mas é possível que esse entorno também inclua um grande número de vesículas membranosas. Durante a última década, estudos têm mostrado a importância das vesículas extracelulares (EVs), termo sugerido pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares ISEV (do inglês, International Society for Extracellular Vesicles) em referência a todos os tipos de vesículas presentes no espaço extracelular. Estas vesículas são partículas derivadas da membrana de células, com tamanho variável de 30 a 5.000 nm, incluindo exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Este conjunto de vesículas têm se tornado o foco de pesquisas científicas buscando entender sua participação na comunicação intercelular, transferindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, tendo consequências nas funções fisiológicas e patológicas das células receptoras. (48–50)

Estudos iniciais sobre vesículas extracelulares foram citados por Randolph WE. (1946), no qual partículas derivadas de plaquetas pró-coagulantes sugeriram a existência de uma proteína tromboplástica não diferente da isolada de células de tecido, presente em sangue extravasado normal e que suas propriedades contribuía para a coagulação, o que possivelmente representava uma fração de partículas sedimentadas a altas velocidades que, além do agente tromboplástico continham produtos de degradação dos corpúsculos sanguíneos, gerando uma razoável hipótese: a atividade das células de tecido é limitada a uma fração de partículas de proteína tromboplástica que provavelmente se deriva do citoplasma. Naquele momento eles chamaram de “uma pergunta irrespondível”. (51)

Alguns anos mais tarde, estas mesmas partículas foram denominadas por Wolf P. (1967), “pó de plaquetas”, baseando-se nas técnicas de centrifugação a altas velocidades e microscopia eletrônica, as quais sugeriram a existência de partículas ricas em lipídios produzidas em decorrência do armazenamento de plaquetas, mesmo na ausência de coagulação, supondo que a liberação desse material estava baseada no processo de ativação de plaquetas que sabia-se ocorrer durante o armazenamento das mesmas. (52) Anderson HC. (1969), relata em um estudo as “vesículas de matriz”, identificadas dentro da matriz cartilaginosa da placa epifisária superior da tíbia em camundongos normais, onde não pareciam estar em contato com as células da cartilagem e continham materiais de densidade variável, sugerindo que essas vesículas eram derivadas das células podendo desempenhar um papel no início da calcificação na epífise. (53) Posteriormente foram identificadas partículas liberadas do líquido prostático humano e do plasma seminal, as quais designaram como “prostassomos”, encontrados em vesículas de armazenamento dentro das células prostáticas e secretoras. Brody I et al. (1983), I. propuseram um mecanismo que envolve exocitose com ligação de vesículas de armazenamento e a posterior fusão com a membrana plasmática, tendo como resultado a liberação de prostassomos diretamente no lúmen, e outro mecanismo, que implica o deslocamento de vesículas de armazenamento do interior da célula até o lúmen acinar. (54)

Nos anos 80' estudos apresentaram a primeira descrição do papel dos corpos multivesiculares (MVB) durante a formação dos chamados exossomos, o menor tipo de vesícula extracelular circulante descrito até aquele momento. (55,56) Orr L et al. (1987), sugeriram no seu estudo que durante a maturação de reticulócitos *in vitro* de ovelha ocorre a liberação de material que pode ser sedimentado por ultracentrifugação a partir do meio de incubação sem células, designados como componentes de membrana específicos como parte de um processo metabólico normal onde os reticulócitos liberam tipos de funções associadas com a membrana. (57)

Anos mais tarde, a descoberta da carga de material genético restaura o interesse nessas populações de vesículas circulantes, (58) o que resulta em uma grande notoriedade no meio acadêmico, ampliando as publicações neste amplo contexto referente às EVs, agora definidas como uma população de diversas vesículas circulantes, caracterizadas pela presença de uma bicamada fosfolipídica,

que contém internamente DNA, RNAm, miRNA, enzimas, fatores de crescimento e lipídios. EVs têm sido isoladas de plasma, soro, urina, lágrimas, suor, leite, líquido seminal, líquido cefalorraquidiano, como também em plantas e microrganismos e, recentemente, identificadas na água do mar. (59–62) Supõe-se que estas EVs possam transferir a informação que carregam não só à células distantes do corpo, mas também a outros organismos da mesma espécie e de diferentes espécies. (63)

1.2.1 Classificação das Vesículas Extracelulares

Achados científicos demonstram que as células podem liberar proteínas e moléculas entre os orgânulos intracelulares através de vesículas de membrana que contém receptores definidos. (55) Na última década, diversos estudos têm apresentado um grupo heterogêneo de vesículas que também são liberadas da superfície celular e usadas como sinais intercelulares para gerar um intercâmbio de informação, inclusive a longa distância. (64) Estas vesículas membranosas, formadas por diferentes tipos celulares têm sido classificadas ou definidas pelo seu tamanho, conteúdo lipídico e mecanismo de produção dentro das células, representados na figura 1, o que quer dizer que a diferença central está fundamentada na biogênese de cada uma delas, embora sua definição seja ainda uma questão de disputa. (65)

Tais vesículas podem ser diferenciadas em três principais subtipos: exossomos (30-150 nm), microvesículas (100-1000 nm) e corpos apoptóticos (1-5 μ m). (63,66–68) Os exossomos são as vesículas de menor tamanho, liberadas pela fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática, que contém vesículas intraluminais; as microvesículas são estruturas vesiculares secretadas através da formação ou brotamento da membrana plasmática; e as EVs maiores são os corpos apoptóticos, os quais têm sua biogênese iniciada com a formação ou brotamento da membrana plasmática durante as últimas etapas da apoptose de uma célula. (69,70)

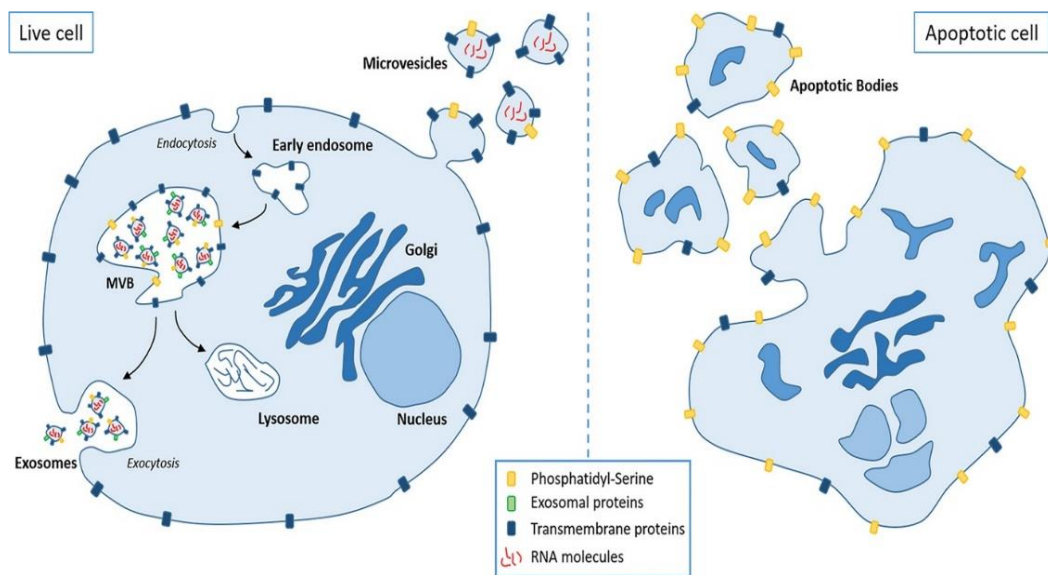


Figura 1. Classificação e nomenclatura para as vesículas extracelulares, Fonte: adaptado de (65).

MVB: Corpos Multivesiculares

1.2.1.1 Microvesículas e Exossomos

Embora microvesículas e exossomos tenham uma similaridade na sua estrutura, existem diferenças relevantes no tamanho, conteúdo, origem celular e composição lipídica. (71)

Diferentes tipos celulares como mastócitos, células dendríticas, linfócitos B, plaquetas, neurônios, adipócitos, células endoteliais e epiteliais liberam constantemente fatores solúveis e vesículas derivadas de membrana no espaço extracelular. (72) Atualmente denominado exossomo, foram inicialmente descritos como vesículas liberadas pelos reticulócitos, com a suposta função de eliminar proteínas essenciais, como o receptor de transferrina, durante o processo de maturação dos eritrócitos. (73) Durante os últimos anos as mesmas vesículas têm ganhado importância não só como mediadores da comunicação celular, participando em processos fisiológicos normais, tais como a resposta imune, lactância e função neuronal, mas também descobertas relacionadas com o desenvolvimento e progressão de doenças hepáticas, doenças neurodegenerativas e câncer. (74–76) Têm sido identificados na maior parte dos fluidos corporais, tais como: urina, líquido

amniótico, soro, saliva, leite materno e secreções nasais, (77) o que justifica o crescimento exponencial de pesquisas centralizadas na importância dos exossomos como biomarcadores potenciais não invasivos em uma variedade de doenças, podendo ser encontrados em uma diversidade de fluidos, os quais podem ser coletados com mínimo desconforto para o paciente.

Estudos feitos nos últimos anos demonstraram a relevância das microvesículas na alteração do ambiente extracelular, na sinalização intercelular e na facilitação da invasão celular através da proteólise da matriz independente de células. (78,79) Neste sentido este tipo de Evs é capaz, através do seu potencial de transferir moléculas bioativas (proteínas, DNA, mRNA e miRNA). Em paralelo, estes avanços sugerem que as microvesículas podem desempenhar um papel muito importante nas futuras estratégias diagnósticas e terapêuticas e, portanto, tornam-se um foco importante da pesquisa na área biomédica. (80–82).

1.2.1.2 Biogênese

1.2.1.2.1 Exossomos

Embora o processo de formação de exossomos ainda não esteja bem definido, modelos atuais sugerem que são formados dentro da via endocítica e liberados pela membrana plasmática através de corpos multivesiculares (MVB). (83) Esses MVB são formados durante a maturação dos endossomos tardios com a acumulação de vesículas intraluminais (ILV). (84) Após a maturação, decorre a fusão dos MVBs com o lisossomo e seu conteúdo sofre degradação lisossomal, e, enquanto a fusão com a membrana plasmática ocorre, o conteúdo é liberado ao espaço extracelular levantando a hipótese de que o processo de classificação e destino para cada vesícula envolve uma variedade de mecanismos que incluem ubiquitinação e a maquinaria do complexo de liberação endossomal ESCRT (do inglês, endosomal sorting complex required for transport) formada por cinco complexos (ESCRT-0, -I, -II, -III e Vsp4) importantes no transporte das mesmas. (85)

Katzmann DJ et al. (2001), demonstraram que a ubiquitinação serve como um sinal na classificação da via MVB, comprovando que os complexos ESCRT -0, -I, II reconhecem proteínas ubiquitinadas na membrana endossomal (86) enquanto o

complexo ESCRT-III poderia ser responsável na formação de membranas e separação das vesículas. (87)

Achados científicos sugerem vias adicionais para a formação de MVB, como a classificação e secreção de exossomos, relatando um mecanismo independente do ESCRT, envolvendo o esfingolípido ceramida, que é produzido durante o estresse celular e apoptose pela síntese ou pela esfingomielinase (enzima que hidrolisa a esfingomielina em ceramida), contribuindo na sinalização celular e desempenhando um papel na formação de vesículas, agrupamento de receptores, fusão de membrana e transporte vesicular. (88)

Investigações indicam que os exossomos produzidos na via esfingomielina estão enriquecidos em tetraspaninas, proteínas transmembrana que podem ter uma função na via da classificação endossomal. (89) O controle da secreção exossomal está coordenado através do transporte e fusão dos MVB com a membrana plasmática pelo microtúbulo, citoesqueleto de actina e Rab-GTPases, que são proteínas expressas atuantes na regulação durante os eventos de transporte das vesículas. (90) Finalmente, os processos referidos podem sugerir que os mecanismos dependentes de ESCRT levam as ILV formadas pelos MVB para a degradação lisossomal, enquanto os mecanismos relacionados com a via esfingomielina levam as ILV para a secreção.

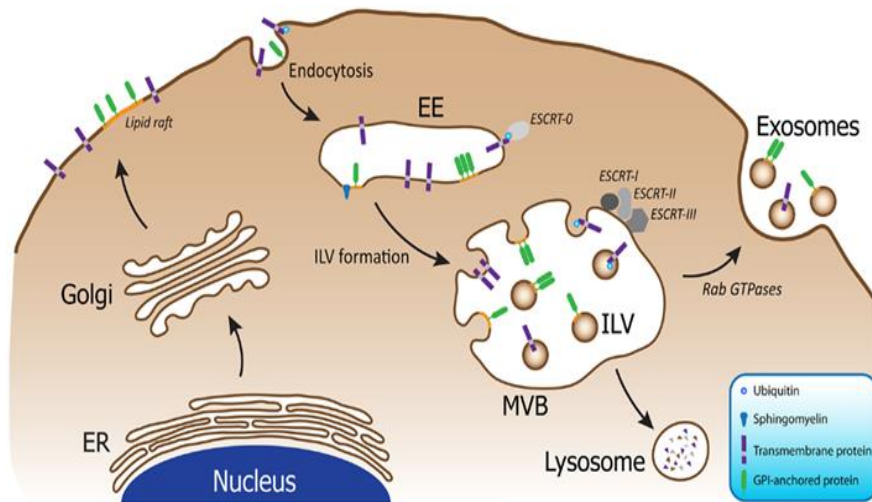


Figura 2. Biogênese dos exossomos, Fonte: adaptado (91). Após a endocitose nos primeiros endossomos (EE), a carga se enovela nas ILV dentro dos MVB com brotamento interno da membrana. Tem-se descrito quatro mecanismos diferentes para facilitar este processo: mono-ubiquitinação e maquinaria ESCRT; em associação com balsas lipídicas; oligomerização ordenada; e segregação em microdomínios por ceramida. Os MVB podem fundir-se com os lisossomos, o que ocasiona a degradação da carga ou alternativamente, os MVB podem fundir-se com a membrana plasmática, o que resulta na liberação de ILV como exossomos: processo que está regulado por Rab GTPases.

1.2.1.2.2 *Microvesículas*

O mecanismo de biogênese das microvesículas difere dos exossomos. Este tipo de EVs surge através do brotamento direto e fusão da membrana plasmática, como demonstrado na figura 3. É importante ressaltar que este mecanismo é a principal diferença entre as partículas relatadas. Neste sentido, sua formação resulta da interação dinâmica entre a contração da proteína do citoesqueleto e a redistribuição dos fosfolipídios. Essa distribuição de proteínas e fosfolipídios não é uniforme e forma microdomínios. A distribuição assimétrica é regulada pelas traslocasas de aminofosfolipídeos: proteínas que podem transferir fosfolipídios de um ponto da membrana plasmática para outro. O processo de gemação é finalizado mediante a contração das estruturas do citoesqueleto através das interações actina-miosina. Os componentes da membrana plasmática são complementados por uma redistribuição vertical de componentes de carga de microvesículas que são seletivamente enriquecidos dentro das microvesículas. (45,78,92–94)

Achados demonstram que em um modelo de melanoma, a superexpressão de um membro da família RHO, proteína de união da GTP ADP-fator de ribosilação

6 (ARF6), apresenta como resultado aumento da secreção de microvesículas. A forma ativada de ARF6 inicia uma cascata de sinalização, começando com a ativação da fosfolipase D e finalizando na fosforilação e ativação da cadeia de miosina, que culmina na liberação de microvesículas. Curiosamente, esta cascata de sinalização não altera significativamente a secreção de EVs associadas ao tamanho dos chamados exossomos. Estas observações e processos sugerem apoio adicional para a hipótese de que os exossomos e microvesículas diferem na sua biogênese, como foi citado anteriormente, e representam um mecanismo único de formação de EVs diferentes ao tipo exossomal, que revela a liberação regulada de microvesículas, as quais contêm cargas moleculares especificamente enriquecidas (78).

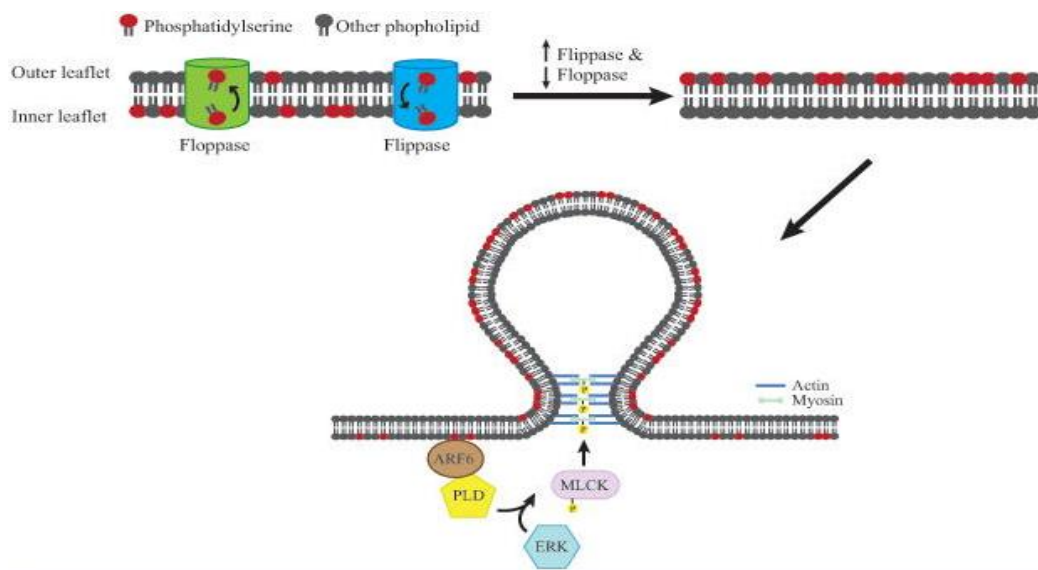


Figura 3. Biogênese das microvesículas, Fonte: adaptado (95). As microvesículas surgem a través da gemação e fusão externa da membrana plasmática, como resultado da interação dinâmica entre a redistribuição dos fosfolípidios e a contração da proteína do citoesqueleto. A formação de vesículas/gemação da membrana é induzida pela translocação da fosfatidilserina até a superfície da membrana externa mediante a atividade das translocasas de aminofosfolípidios. Para permitir o desenvolvimento de microvesículas, o fator ADP-ribose 6 (ARF) inicia uma cascata de sinalização que começa com a ativação da fosfolipase D (PLD) que recluta a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) na membrana plasmática. ERK fosforila e ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). A fosforilação e ativação da cadeia leve de miosina por MLCK desencadeia a liberação de microvesículas.

1.3 PAPEL DAS VESICULAS EXTRACELULARES NA INFLAMAÇÃO

Sabe-se que a inflamação é o resultado das interações entre as células no sangue, por tanto acreditasse que as EVs poderiam ter um papel fundamental desempenhando diferentes funções durante as etapas do processo ao transportar fatores anti-inflamatórios ou pro-inflamatórios, (96) a través da transferência horizontal de citocinas e receptores de quimosinas a células receptoras, e induzindo-as a liberar posteriormente citocinas. (97)

Estudos recentes centram no papel funcional das microvesículas na resposta inflamatória durante a formação de trombos e ateromas, como promotores da intercomunicação celular nesses ambientes patológicos, induzidos pela imunidade. (98) As microvesículas de sangue periférico, células endoteliais e macrófagos desempenham um papel fisiológico no início, progressão e desenvolvimento da inflamação, observando que estes EVs encontram-se associados com transtornos metabólicos, detectados incluso antes do diagnóstico clínico de doença cardiovascular. (99)

As EVs também poderiam desencadear a inflamação ativando a cascata do complemento. A unidade de reconhecimento da via clássica do complemento, C1q, se liga a microvesículas liberadas de células jurkat apoptóticas. C1q unido a microvesículas pode ativar a via clássica do complemento, demonstrado pela ligação do C3 e C4 na superfície das mesmas, confirmado pela detecção de uma população de microvesículas C1q-positivas em plasma humano. (100)

Entre as interações com as células, as microvesículas derivadas de plaquetas podem melhorar a união de neutrófilos a outros neutrófilos. Experimentos demostram que incluso quando a L-selectina está bloqueada, as microvesículas derivadas de plaquetas permitem que os neutrófilos tenham uma agregação e adesão as células pre-unidas. O mecanismo molecular que explica este fenômeno ocorre mediante a interação entre P-selectina em microvesículas derivadas de plaquetas e P-selectina-glicoproteína em neutrófilos, assim este tipo de EVs podem promover o contato célula-célula induzindo moléculas de adesão. (101) Alguns dos mecanismos para estimular inflamação que podem utilizar as microvesículas é a administração de ácido araquidônico a outras células, uma vez que este ácido a partir de microvesículas derivadas de plaquetas pode aumentar a adesão dos monócitos as células endoteliais. (102) Além das microvesículas derivadas de

plaquetas, as liberadas de outro tipo celular podem também ter propriedades pro inflamatórias. Por exemplo, derivadas de células polimorfonucleares estimulas por fMLP (N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine) podem induzir a expressão de IL-6 e proteína quimiotáctica de monócitos (MCP-1) em células endoteliais. (103)

Mackenzie A et al. (2001), demonstraram que a ativação dos receptores P2X7 por ATP extracelular também estimula a liberação de microvesículas das células monocíticas THP-1. Curiosamente a IL-1 β liberada após ativação dos receptores P2X7 nestas condições se encontra dentro da fração microvesicular, já que os níveis de IL-1 β foram significativamente maiores nas microvesículas do que no sobrenadante livre das mesmas. Estes resultados sugerem que após ativação dos receptores P2X7, a IL-1 β ativa pode se acumular em microvesículas para sua posterior liberação. (104)

Por outro lado, as microvesículas também podem ter uma resposta anti-inflamatória. Um estudo com células tubulares proximais cultivadas com adição de fenoldopam (agonista do receptor da dopamina), liberaram exossomos obtendo uma redução na produção das espécies ativas de oxigênio no túbulo distal e células do conduto coletor, o que indica uma transferência de uma resposta anti-inflamatória. (105) Além disso, no vaso a citoproteção endotelial foi evidenciada pelos efeitos benéficos causados por parte das microvesículas, sugerindo que atuam como agentes citoprotectores e antiinflamatórios a traves da administração de proteína C ativada ou anexina 1. (98) Ao mesmo tempo, a regulação da resposta inflamatória através de microvesículas pode estar dirigida por mecanismos independentes de citosinas, incluída a indução apoptótica de células imunitárias mediante a sinalização de FAS-ligante associado a vesículas. A inflamação estimula a coagulação e a interação destes dois sistemas mediante as microvesículas. Neste sentido, as microvesículas derivadas de células sanguíneas na coagulação, imunidade e inflamação estão interconectadas e interdependentes, sendo de particular importância uma vez que a coordenação destas funções fisiológicas reguladas por microvesículas tem um papel importante no desenvolvimento de doença cardiovascular. (106–109)

1.4 VESICULAS EXTRACELULARES NA DOENÇA RENAL

O papel das EVs em processos fisiológicos em estado de repouso podem tornar-se patológicos quando são liberadas em excesso, como no estado inflamatório e malignidade, ou em processos de doença, especificamente em doenças renais. (71) As EVs podem ser biomarcadores da doença renal, além de mediadores de inflamação, supressão imune, trombose, adesão, ou crescimento e regeneração. Dentro do rim, as EVs podem ser originadas de células sanguíneas, células endoteliais, podócitos ou células epiteliais tubulares, e detectados dentro da circulação, urina ou tecido. (110)

A disfunção endotelial é considerada uma doença inflamatória sistêmica como resultado de um processo associado à expressão da molécula de adesão aumentada, perda de fatores antitrombóticos, aumento do vasoconstritor e ativação plaquetária liberando dois tipos de EVs: microvesículas e exossomos. (102,111) A disfunção endotelial e a calcificação vascular são fatores de risco para morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes com doença renal. In vitro, as vesículas parecem ser importante na mediação da calcificação. (112)

A presença de EVs urinários foi descrita pela primeira vez a princípios da década de 1990, e foram caracterizadas completamente no ano 2004. Recentemente tem-se demonstrado que as EVs de origem urinária são liberadas ativamente por quase todas as células renais ao longo do nefro e o trato urogenital, assim como pela infiltração de células inflamatórias. (113–115)

Na insuficiência renal a lesão microvascular induzida pela sepsis promove a liberação de EVs na circulação sistêmica, demonstrando que estes EVs tem uma associação direta com a patogênese da sepsis, tanto na coagulação como nos sinais inflamatórios, modulando o número de EVs através da sinalização da calpaína. (116,117) Além disso, se evidencia que os EVs contribuem na insuficiência renal associada ao síndrome urêmico hemolítico induzido pela infecção de *Escherichia coli* enterohemorrágica, se demonstrou que a toxina bacteriana toxina Shiga circula unida a EVs derivados de células sanguíneas que chegam ao rim e são transferidas a células endoteliais capilares glomerulares e peritubulares, logo após passam através da membrana basal e entram em podócitos, seguido pela endocitose onde as EVs inibem, a síntese de proteínas e conduzem a morte das células endoteliais glomerulares. (118)

As EVs secretadas a partir de células progenitoras da artéria renal, derivadas de nefrectomia radical humana demonstraram potencializar a migração de células endoteliais quando cocultivadas com células endoteliais lesionadas, descobrindo uma possível utilização de EVs derivadas de células progenitoras proangiogênicas do paciente no transplante de células autólogas terapêuticas para a lesão endotelial microvascular. (119)

F. Martino et al. (2012), mostraram que em pacientes com dano renal agudo, os microRNAs circulantes não são eliminados na diálise. A detecção de miR-21 e 210 no dialisado e ultrafiltrado pressupõem que os miRNAs na circulação são transportadores por estruturas maiores, como proteínas e microvesículas. Deste modo como os miRNAs não se vem afetados pela diálise poderias ser biomarcadores da lesão renal aguda. (120)

1.5 VESÍCULAS EXTRACELULARES E DOENÇA CARDIOVASCULAR COMO PRINCIPAL RISCO NO PACIENTE RENAL CRÔNICO

Sabe-se da comunicação entre as células imunes circulantes e células endoteliais vasculares, que é um evento chave no desenvolvimento da placa aterosclerótica que se facilita graças as microvesículas circulantes. (121,122)

Embora em indivíduos saudáveis, as microvesículas se derivam principalmente das plaquetas, em condições patológicas e inflamatórias estas podem se derivar de outro tipo de células, como as endoteliais e os eritrócitos. Tem-se encontrado níveis aumentados de microvesículas no sangue em diversas doenças, assim como em pacientes com insuficiência renal crônica. (110,123,124) Este tipo de pacientes tem um alto risco de eventos cardiovasculares e mostram disfunção endotelial, a qual é considerada um elemento chave na patogênese da aterosclerose. (125) Por exemplo, um estudo identificou microvesículas endoteliais circulantes como possível fator de risco na ocorrência de eventos cardiovasculares em pacientes com doença renal crônica, o que proporciona evidencia para o uso de microvesículas como marcador substituto da disfunção endotelial em doenças cardiovasculares. (126)

Tem-se observado níveis aumentados de microvesículas principalmente de origem endotelial na patologia cardiovascular. Neste sentido, a disfunção endotelial é um evento inicial no desenvolvimento da aterosclerose e relaciona-se com

prognóstico cardiovascular desfavorável. (80,127) As células endoteliais lesionadas podem liberar microvesículas que se consideram marcadores de disfunção endotelial. (128)

As microvesículas formam parte da hemostasia e tem um potencial procoagulante na doença. Contribuem a inflamação mediante a influência sobre interações célula-célula e a liberação de citosinas, além de mediar o tônus vascular. Achados demonstram que microvesículas derivadas de plaquetas e macrófagos se reúnem no núcleo lipídico de placas ateroscleróticas com o objetivo de desencadear sinais pró inflamatórias, angiogênicas e trombóticas. Esses resultados aumentam a possibilidade que o objetivo das microvesículas seja uma estratégia terapêutica na aterosclerose. (129,130)

O potencial procoagulante das microvesículas se centra nas vesículas liberadas pelas plaquetas, ao mesmo tempo microvesículas liberadas por células mononucleares sanguíneas também promovem a coagulação. A resposta procoagulante pode ser gerada pelas microvesículas a través de duas propriedades: fator tecidual, uma proteína transmembrana que atua como cofator do fator VIIa (proconvertina), e exposição de fosfolipídios aniônicos na membrana externa das EVs. A exposição superficial do fator tecidual, desempenha um papel biológico de iniciação primária na cascata da coagulação. (80,131,132)

As EVs como antes mencionado neste texto, podem estar implicadas em diversas doenças. Especificamente no caso da DRC elas podem participar na sua fisiopatologia e no quadro clínico que caracterizam aos pacientes com insuficiência renal crônica, através de diversos efeitos, dependendo da sua célula de origem e contexto. De fato, podem estar relacionadas com a progressão da DRC, promovendo angiogênese alterada, inflamação e processos pró trombóticos. O papel prejudicial das microvesículas é a consequência do entorno no qual são produzidas, assim como da célula alvo com a qual interagem.

No momento da confecção deste documento não há publicações nos bancos de dados consultados que tratam da investigação do impacto das EVs na inflamação do paciente com doença renal crônica em hemodiálises, por tanto, é importante gerar dados que possam elucidar o papel biológico e fisiopatológico e os mecanismos das EVs neste tipo de doença. Da mesma forma, a hemodiálise representa um processo de vital importância na vida destes pacientes, porém além de melhorar signos e sintomas, pode gerar diversos estados patológicos decorrentes

do procedimento. Pouco se sabe do efeito da hemodiálise em relação a vesículas extracelulares, neste sentido, este estudo pretende investigar o impacto da hemodiálise na população e carga de microvesículas extracelulares no soro de pacientes com doença renal crônica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a hemodiálise em pacientes com doença renal crônica altera a população e a função de vesículas extracelulares (exossomos e microvesículas).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Purificar e caracterizar vesículas extracelulares a partir do soro de um conjunto de pacientes antes e após uma sessão de hemodiálise.
- Caracterizar as vesículas extracelulares quanto ao número, tamanho e proteínas específicas de membrana.
- Testar em células mononucleares de sangue periférico a atividade pró ou anti-inflamatória das vesículas purificadas antes e após a hemodiálise.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Sete (7) pacientes em hemodiálise foram estudados. Os indivíduos escolhidos fazem parte do grupo de pacientes ativos em programa de hemodiálise ambulatorial da clínica particular (Soclimed - Brasília, DF). Os pacientes estudados tinham no momento da coleta idade entre 45 e 57 anos. Foram critérios de exclusão: tempo de diálise menor a 1 ano, acesso via cateter venoso infectado, presença ou suspeita de infecção, incapacidade para assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TLCE), decisão de não participar do estudo pelo paciente ou seu representante legal, diagnóstico de neoplasia ou impossibilidade de obter dados completos. Todos os pacientes tinham fístulas arteriovenosas nativas (FAV), o tempo de diálise para todos foi de aproximadamente 4 h. Foram coletadas amostras de sangue antes e após o procedimento da hemodiálise. As coletas fazem parte da rotina laboratorial dessa unidade de Nefrologia, não configurando risco adicional para aqueles que se voluntariaram para nossa pesquisa. A escolha dos pacientes foi realizada a partir de classificação interna da clínica e separados em dois grupos: um grupo designado número 1 (um), composto por indivíduos que realizam hemodiálise segunda, quarta e sexta e o grupo número 2 (dois), que realiza hemodiálise terça, quinta e sábado. As amostras foram coletadas o primeiro dia da semana de tratamento de hemodiálise de cada paciente, representando um maior intervalo de tempo entre uma dialise e outra.

3.2 COLETA DE SANGUE

Em todos os indivíduos foram coletados 10 mL de sangue venosa em tubos sem anticoagulante, antes e após o procedimento de hemodiálise. As amostras coletadas antes do início da diálise, foram antes da administração de qualquer anticoagulante. Posteriormente foi separada a fração de soro de cada amostra mediante centrifugação diferencial (3.500 RPM). Foram feitas duas etapas adicionais de centrifugação diferencial: 1.200 x g por 30 min e 10.000 x g por 45 min, com o objetivo de garantir a remoção de células e restos celulares. Posteriormente o sobrenadante foi armazenado a temperatura de - 80 °C.

3.3 PROTEÍNA C REATIVA (PCR LÁTEX)

Para realizar esta técnica destinada a determinação de proteína C reativa no soro humano, utilizou-se uma alíquota de soro de cada paciente. Posteriormente 50 µl de amostra de cada paciente antes e depois o procedimento de hemodiálise, de controle positivo (soro humano com concentração de PCR > 20 mg/L) e negativo (soro de animal) foram pipetados em círculos distintos de uma lâmina de reação adicionando uma gota (50 µl) do reagente RLAX (partículas de látex recobertas com IgG de cabra anti-proteína C-Reativa humana) em cada um dos círculos. Finalmente foram misturadas as gotas efetuando um movimento rotatório durante dois minutos. Após do tempo especificado foi lido o resultado por presença de aglutinação em fundo escuro. Foram feitas diluições seriadas para obter um resultado semiquantitativo, e reportado o maior título ou diluição (aglutinação). Para saber a concentração aproximada, foi multiplicado o fator de diluição da maior diluição com resultado positivo pela sensibilidade do teste (6 mg/L).

3.4 PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

3.4.1 Precipitação por polímeros (ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences))

O sistema comercial ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences) foi utilizado para a purificação de vesículas extracelulares, seguindo as recomendações do fabricante. Alíquotas de 1.550 µl de soro foram descongeladas e transferidas para um tubo estéril e sobre este volume adicionou-se 390.6 µl de ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution®. A mistura foi homogeneizada invertendo o tubo 10 vezes e em seguida incubada *overnight* a 4 °C. Após a incubação a mistura Exoquick/soro foi centrifugada por 1.500 x g durante 30 min a 4 °C. Após essa centrifugação as EVs ficaram num pellet seco no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido por aspiração com pipeta e foi feita uma nova centrifugação de 1.500 x g por 5 min para garantir a completa remoção do reagente, tendo cuidado para não remover as EVs presentes no pellet. Para finalizar, cada pellet foi ressuspendido em 500 µL de tampão PBS 1X (do inglês, Phosphate

Buffered Saline) (fosfato de sódio 10 mM e NaCl 150 mM (pH 7,4) e filtrado em filtros de 0,22 µm. Destes 500 µL, 150 µL foram utilizados para as metodologias de caracterização de exossomos e 350 µL foram utilizados para o ensaio em culturas de CMSP.

3.4.2 Ultrafiltração

5 mL de soro de indivíduo saudável foram adicionados a tubo Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), e procedeu-se a centrifugação a 4.000 x g por 10 min até obter um volume de 1 mL, posteriormente amostra foi armazenada a - 80 °C.

3.5 CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PELO MÉTODO TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING

A determinação da concentração de partículas por mL no soro e a determinação do diâmetro das partículas foi feita utilizando a tecnologia resistência de pulso (do inglês, Tunable Resistive Pulse Sensing, IZON, Christchurch, New Zealand)). O fundamento da técnica se baseia no monitoramento do fluxo de corrente elétrica que passa por um poro de abertura ajustável. Partículas únicas são medidas em tempo real e em alta performance. Amostras de EVs foram diluídas em tampão PBS 1X e 40 µL de EVs foram lidas utilizando os seguintes parâmetros: poro NP200; abertura do poro 48mm; corrente utilizada de 0,50 V e pressão 20 cm.H₂O. A corrente média entre todas as amostras variou entre 100 nA e 130 nA. A análise do diâmetro médio, moda e concentração de partículas foram feitas utilizando o programa *Izon Control Suite* versão 3.3.2. A calibração foi feita utilizando o calibrador sugerido pelo fabricante, sendo este, partículas de poliestireno CPC200, de diâmetros e concentrações conhecidas. O calibrador foi diluído em PBS 1X e medido de forma idêntica as amostras.

3.6 WESTERN BLOT

A identificação de proteínas marcadoras de EVs (exossomos) foi feita começando pela extração de proteínas de vesículas extracelulares (EVs). Alíquotas de 100 µL de EVs foram diluídas em 100 µL de tampão de lises (0,125M Tris-HCL (pH 6.8), 10 % glicerol, 2.3 % dodecil sulfato de sódio SDS (do inglês sodium dodecyl sulfate) e um volume de 0.2 µL de coquetel inibidor de proteases foi adicionado, para evitar a degradação de proteínas. Posteriormente foram sonicadas por 15 min e centrifugadas por 5 min a 13.000 x g temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20 °C.

O conteúdo de proteínas totais de EVs foi quantificado pelo método de Bradford e analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 %. Foram aplicadas proteínas extraídas de EVs de: controles positivos (EVs soro indivíduo saudável (purificação por ultrafiltração), lizado de CMSP) e paciente antes e depois da hemodiálise.

As proteínas foram separadas por tamanho em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% em cuba de eletroforese (Bio-Rad Mini Protean II). Em cada gel foi aplicado uma concentração de 30 µg de proteína extraída de cada amostra. A eletroforese foi realizada com voltagem de 90 V e amperagem de 150 mA por 2 h. Um gel foi corado com *Coomassie blue* e as proteínas dos outros géis foram transferidas para membranas de polyvinylidene fluoride PVDF (do inglês, *Polyvinylidene Difluoride*). A transferência foi feita semi-seca utilizando o transferidor *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-rad* em tampão de transferência contendo 48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% (v/v) metanol e 1,3 mM SDS. A transferência foi feita por 30 min a uma voltagem de 15 V. Após a transferência os géis foram corados com *Comassie blue* para se analisar a eficiência da transferência. As membranas foram bloqueadas por 3 h em leite desnatado 5 % diluído em tampão tris-buffer salino TBST 1X (do inglês, Tris-buffered saline, 0.1 % Tween 20) (50mM Tris.HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com anticorpos primários policlonais de coelho anti-CD63, anti-CD9, anti-calnexina, anti-CD81 (*Santa Cruz Biotechnology*), todos diluídos para o título de 1:500 em tampão TBST 1X com 2% de leite desnatado. Após três lavagens de 5 min com TBST 1X, o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:2000; Sigma) conjugados com fosfatase alcalina foi aplicado às

membranas e estas incubadas por 1 h em leite desnatado 5% diluído em tampão TBST 1X. Após 3 lavagens de 5 min com TBST 1X as membranas foram reveladas utilizando revelador NBT/BCIP (*AP color development buffer, Bio-Rad*) até o surgimento da cor. A revelação foi interrompida utilizando água deionizada por 10 min.

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Telas de microscopia eletrônica (Grids de nickel) foram cobertas por uma fina película de Formvar. A amostra foi fixada com Karnovsky (Glutaraldeído 2 %, Paraformaldeído 2%, 5 M CaCl₂ e sacarose 3 % em tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M) *overnight*. Cinco microlitros da amostra fixada foram depositados sobre o filme, seguido de contrastação utilizando ácido fosfotúngstico (PTA). As imagens foram adquiridas utilizando 80 KV's em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1011, do laboratório de microscopia eletrônica da Universidade de Brasília (UnB).

3.8 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E ENSAIO DE ATIVAÇÃO CELULAR

3.8.1 Isolamento de Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP)

As CMSP foram isoladas usando um gradiente de densidade (Ficoll-Paque Amersham Biosciences) a partir de amostras de sangue periférico contendo anticoagulante EDTA, e coletadas de indivíduos saudáveis. Tubos estéreis de 15 mL foram preenchidos com 3 mL de Ficoll-paque, 4 mL de sangue total e 4 mL de tampão PBS 1X estéril, reagentes e amostras foram adicionados a temperatura ambiente. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 360 x g por 25 min. Após a centrifugação as CMSP constituíram uma camada branca que foi retirada por pipetagem e transferida para um novo tubo estéril e lavada três vezes com PBS 1X. Finalmente o pellet celular foi ressuscitado em 1 ml de PBS 1X.

3.8.2 Ensaio de Ativação celular

CMSP (4×10^5) foram plaqueadas (placas de cultura 96 poços: K12-096 KASVI) com adição de 200 μ l de meio criado pelo Roswell Park Memorial Institute,

meio sintético complexo (RPMI) (GIBCO®), contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina mais estreptomicina. Foram adicionadas uma concentração de EVs (25 µg/mL), das amostras antes e depois da hemodiálise de cada paciente, constituindo dois grupos, sendo um destes estimulado com 5 µg/mL de fitohemaglutinina (PHA). Posteriormente as placas foram mantidas em estufa a 37 °C, numa atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ e após um tempo de 24 h as células foram recolhidas e transferidas para microtubos estéreis que se centrifugaram a 1.200 rpm por 5 minutos, sendo obtido o botão celular ressuspenso em PBS1X e incubado por 30 minutos com anti-CD69 FITC (Isotiocianato de fluoresceína do inglês, fluorescein isothiocyanate), anti-CD25 APC Alofocianina (do inglês, Allophycocyanin) e anti-CD3 PercP complexo proteico clorofil peridina (do inglês, Peridinin Chlorophyll Protein Complex) (Thermo Fisher), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente os microtubos contendo as CMSP marcadas com os anticorpos foram centrifugados e ressuspenso em 300µL de PBS 1X 4% formaldeído. A ativação celular foi analisada no citômetro FACSVerse (BD Bioscience) do Instituto de Biologia-UnB.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). A comparação entre os dados obtidos nos pacientes foi analisada por testes paramétricos (teste t pareado) e não paramétricos (teste wilcoxon). Os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

3.10 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

A aprovação ética para este estudo foi outorgada pelo comitê de ética em pesquisa da universidade católica de Brasília registrado com número **CAAE**: 64599316.8.0000.0029. Se obteve o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) por escrito de todos os indivíduos participantes (Anexo).

4. RESULTADOS

4.1 DADOS DOS PACIENTES

As características dos pacientes são mostradas na tabela 1. Estes dados são apresentados com o objetivo de evidenciar que variáveis como idade, sexo, atividade física, transplante, doença de base, tempo de sessão hemodiálise e tipo de acesso são comparáveis entre os pacientes. Diferentemente das variáveis tempo de tratamento hemodiálise e comorbidades, que são pouco comparáveis entre os mesmos.

Tabela – 1 Dados demográficos e características clínicas dos pacientes

VARIÁVEL/PACIENTE	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Idade (anos)	53	45	55	52	48	46	57
Sexo (F/M)	M	F	M	F	M	F	M
Atividade física	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
Transplante	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Doença de base	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
Tempo SHD	4 horas	3 horas	3h30'	4 horas	4 horas	4 horas	4 horas
Tempo de THD	15 anos	5 anos	3 anos	19 anos	4 anos	11 anos	11 anos
Comorbidades	1,3,4,, 6	1,4,12 13	1,3,11	1,3,4,6, 10,11	1,10,11	1,4,6,16 22,23	1,6,16, 21,25
Tipo de acesso	FAV	FAV	FAV	FAV	FAV	FAV	FAV

P (pacientes) F (feminino), M (masculino), NH (nefropatia hipertensiva), SHD (sessão hemodiálise) THD (tratamento hemodiálise), (1), dislipidemia (3), hiperparatiroidismo 2ario (4), hiperfosfatemia (6), hipercalemia (10), anemia (11), rim policístico (12), síndrome do pânico (13), hipocalcemia (16), hipovitaminose D (21), obesidade classe 3 (22), GPID excessivo (23), hiperparatiroidismo 3ario (25), FAV (fístula arterio-venosa).

4.2 PROTEÍNA C REATIVA (PCR LÁTEX)

Os resultados do teste PCR LATEX estão representados na tabela 2. São mostradas as concentrações aproximadas (mg/L) - (resultados positivos ou negativos) de cada paciente antes e depois da hemodiálise. Este teste indica presença ou ausência de um estado inflamatório no paciente.

Tabela – 2 Resultado Proteína C Reativa

PACIENTE (Código)	RESULTADO (Concentração)
P1AH	12 mg/L
P1DH	12 mg/L
P2AH	12 mg/L
P2DH	6 mg/L
P3AH	192 mg/L
P3DH	96 mg/L
P4AH	6 mg/L
P4DH	6 mg/L
P5AH	6 mg/L
P5DH	6 mg/L
P6AH	12 mg/L
P6DH	12 mg/L
P7AH	12 mg/L
P7DH	6 mg/L

Análise dos Resultados de PCR: Código do paciente (exemplo: P1AH-DH (P1: paciente N° 1, AH: antes da hemodiálise DH: depois da hemodiálise)). Resultado: presença de aglutinação tênue ou nítida (positivo: concentração de PCR igual o superior a 6 mg/L), ausência de aglutinação (negativo: concentração de PCR inferior a 6 mg/L).

4.3 PURIFICAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

A purificação ou isolamento de EVs são mostradas na figura 4. Pode-se observar o pellet final, onde estão contidas as EVs, que se obteve utilizando o método comercial ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences). Existe uma impressão visual de aumento no volume ou quantidade do pellet (EVs) nas amostras depois da hemodiálise (DH), tendência ou padrão que se manteve em todas as amostras dos pacientes estudados.

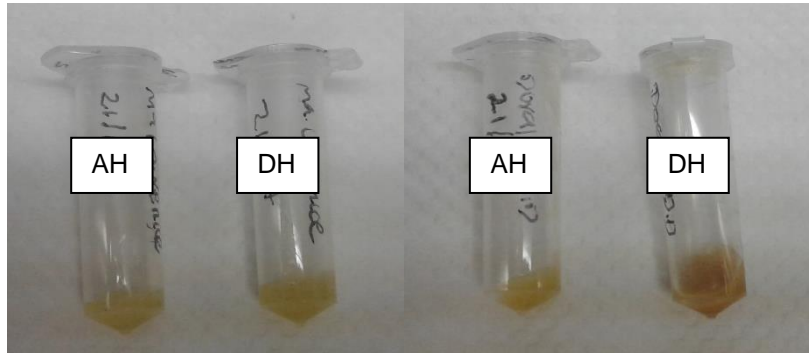


Figura 4. Purificação de vesículas extracelulares. AH (amostra antes da hemodiálise), DH (amostra depois da hemodiálise). Pellet de EVs: amostras representativas do grupo de pacientes estudados.

4.4 CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PELO MÉTODO TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING

Foi realizado um estudo comparativo nas amostras de vesículas extracelulares dos pacientes antes e depois da hemodiálise (AH-DH) purificadas pelo método ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences), obtendo diferenças significativas nas concentrações de partículas por mililitro (AH vs DH) em alguns dos indivíduos estudados, além de diferenças no tamanho em nanômetros.

Os dados brutos que mostra a técnica de pulso resistivo apresentam uma informação relevante em quanto a contagem de partículas/mL em cada paciente, podendo observar um aumento relativo ou significativamente após o procedimento de hemodiálise na maioria dos pacientes. A média dos tamanhos caracterizados em cada amostra, evidencia a presença de EVs (exossomos e microvesículas).

Tabela – 3 Valores de diâmetro de EVs e concentração medidos pelo método de resistência de pulso (do inglês Tunable Resistive Pulse Sensing)

Diâmetro /amostras	P1AH	P1DH	P2AH	P2DH	P3AH	P3DH	P4AH	P4DH
Media (nm)	128	145	158	153	127	137	133	128
Moda (nm)	119	113	125	118	117	112	118	118
Concentração partículas/mL	1,46E11	1,64E11	3,20E10	1,21E11	2,30E10	1,51E10	2,07E11	2,04E11
Diâmetro /amostras	P5AH	P5DH	P6AH	P6DH	P7AH	P7DH		
Media (nm)	1,51E10	8,06E11	1,33E11	3,93E11	5,21E10	5,85E10		
Moda (nm)	125	137	116	114	125	132		
Concentração partículas/mL	119	105	97	94	109	105		

Valores de diâmetro de EVs e concentração média de triplicata técnica, para as amostras dos pacientes antes e depois o procedimento de hemodiálise. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

As figuras 5 a 11, apresentam a comparação da concentração, distribuição e tamanho de EVs de cada paciente antes e depois da hemodiálise, purificadas pelo sistema Exoquick em nanoporo de 200 nm, identificando uma tendência de aumento na concentração de EVs após o procedimento de hemodiálise, além de mostrar uma caracterização do tamanho compatível com EVs (exossomos e microvesículas). A distribuição mostrada neste gráfico evidencia uma grande população de partículas na faixa do tamanho característico de exossomos (30-200 nm) e uma população de microvesículas (50-1000 nm).

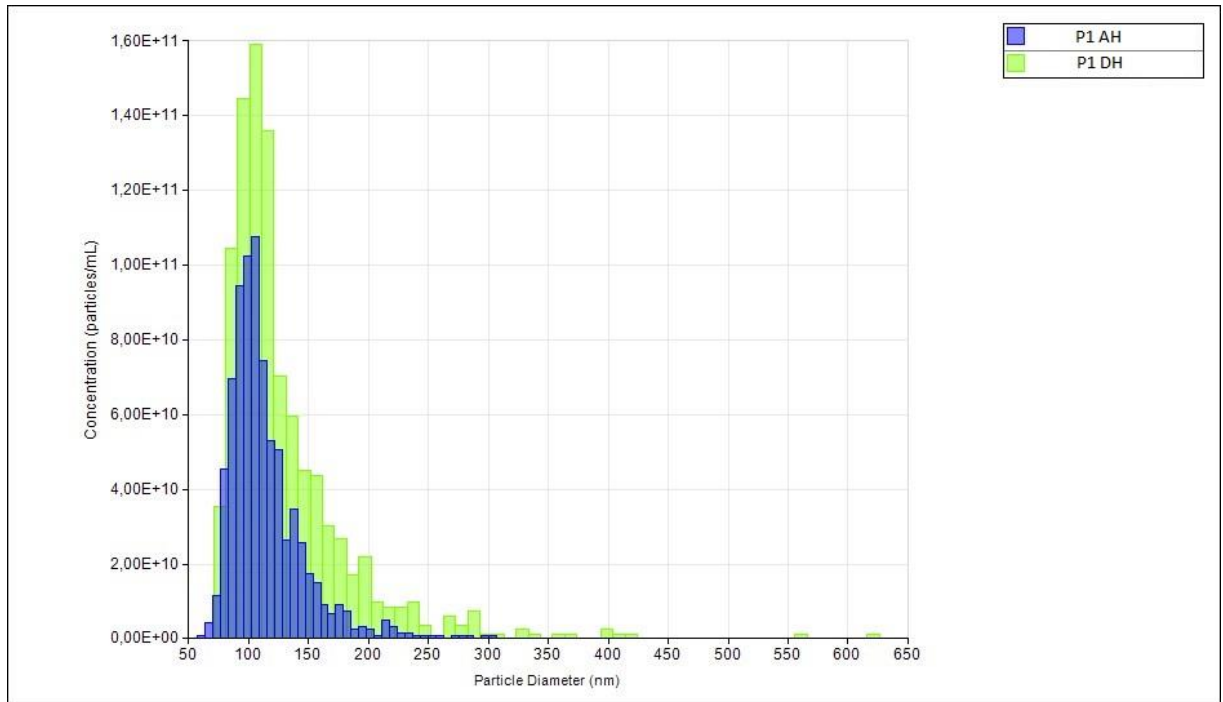


Figura 5. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 1 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

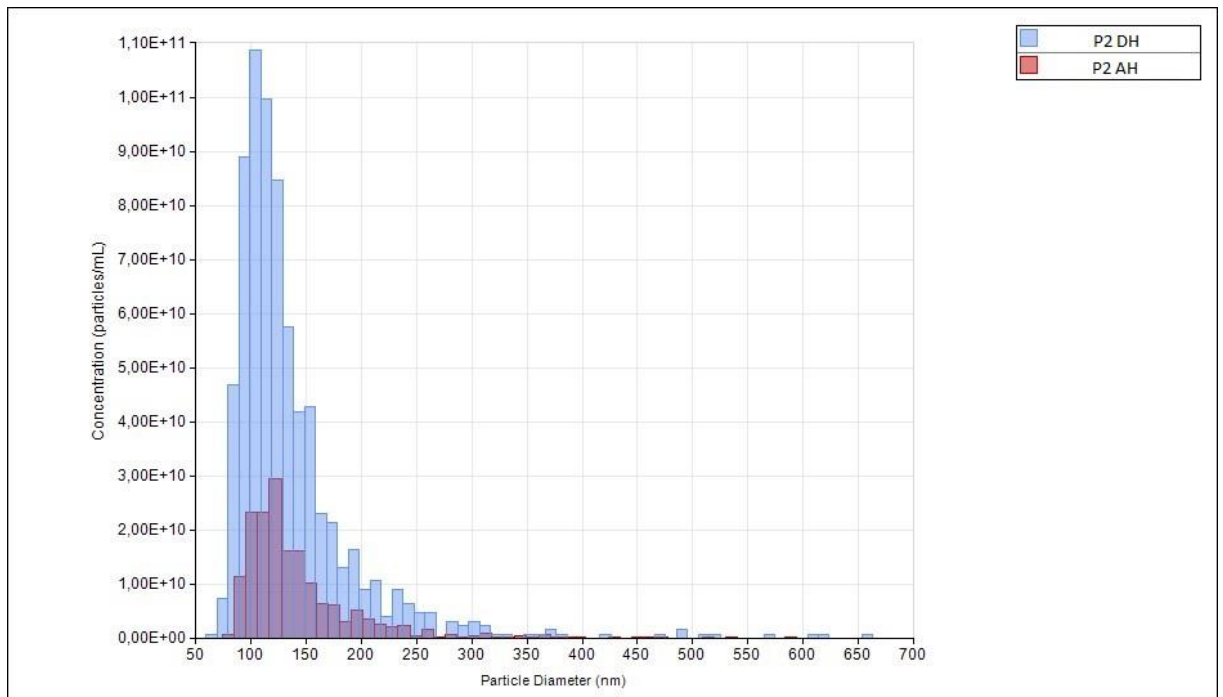


Figura 6. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 2 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

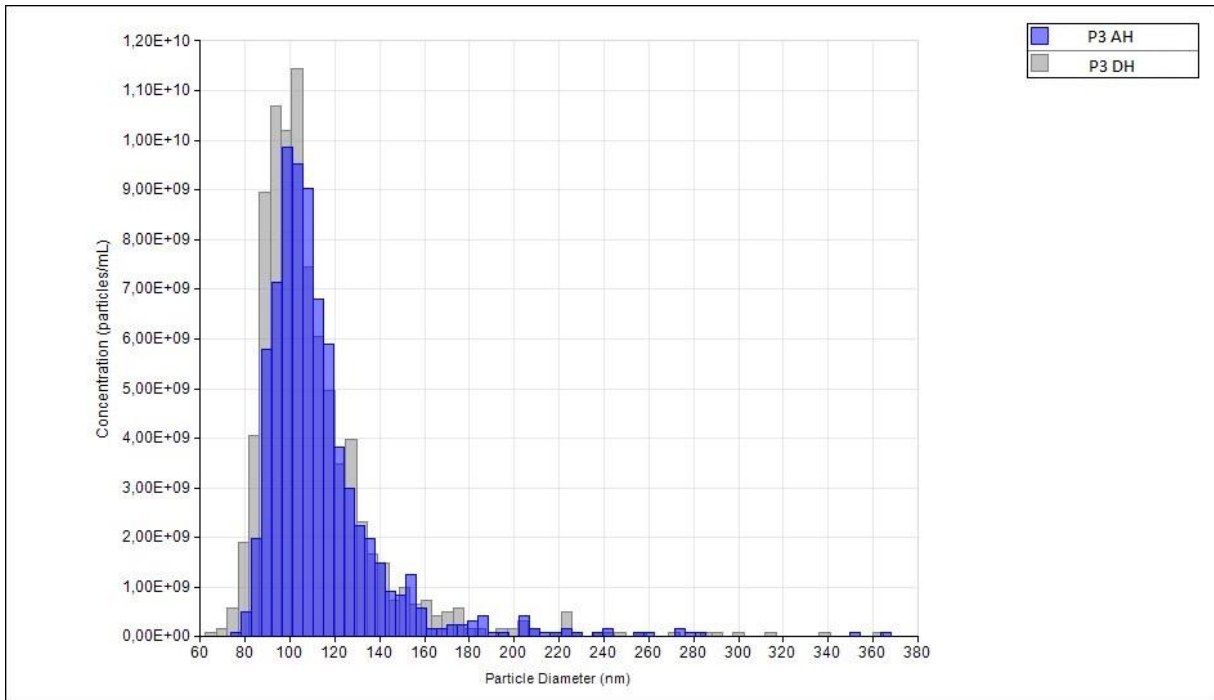


Figura 7. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 3 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

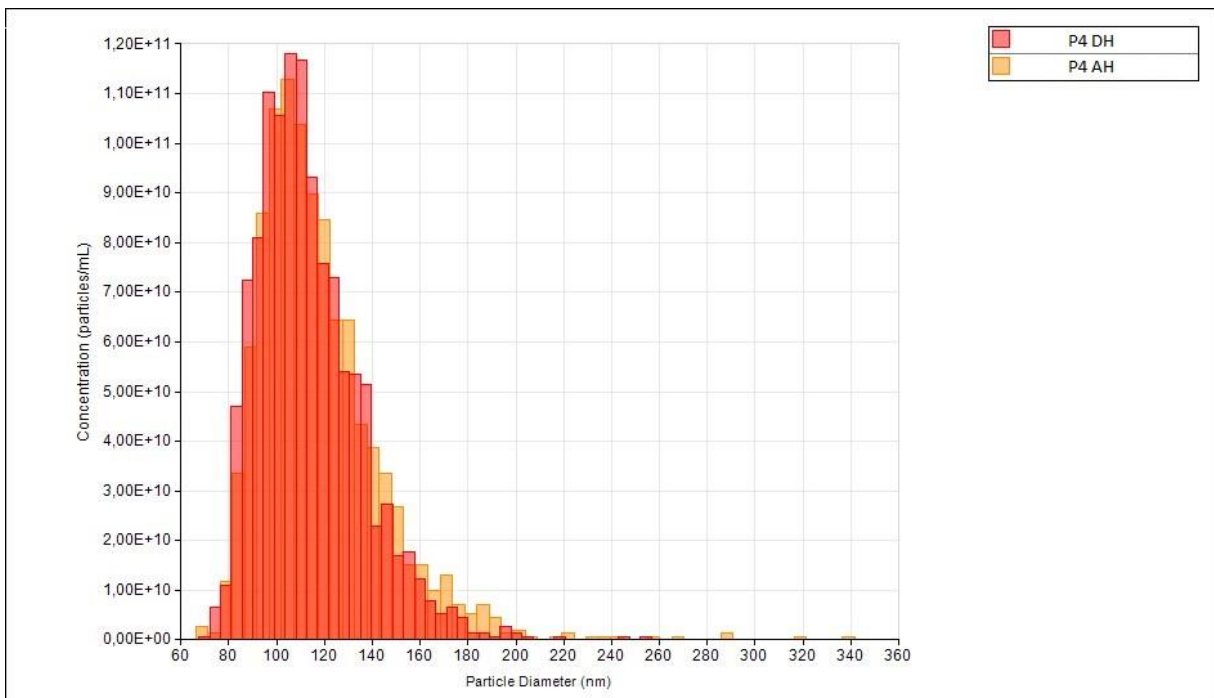


Figura 8. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 4 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

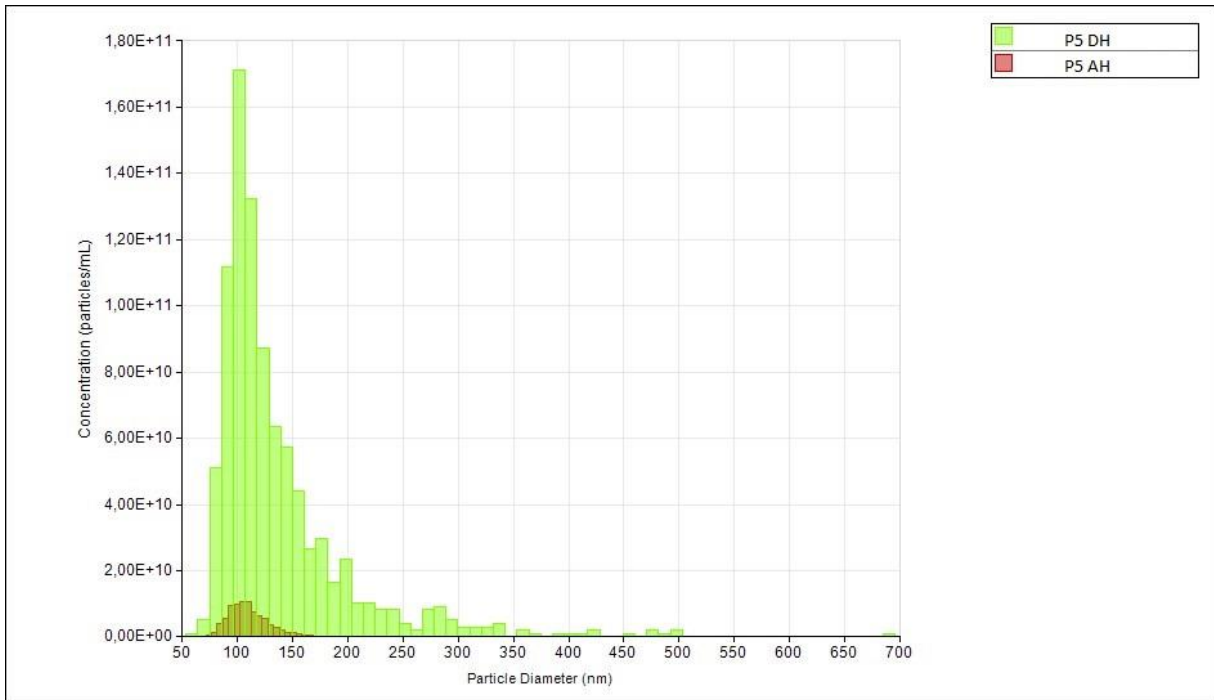


Figura 9. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 5 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

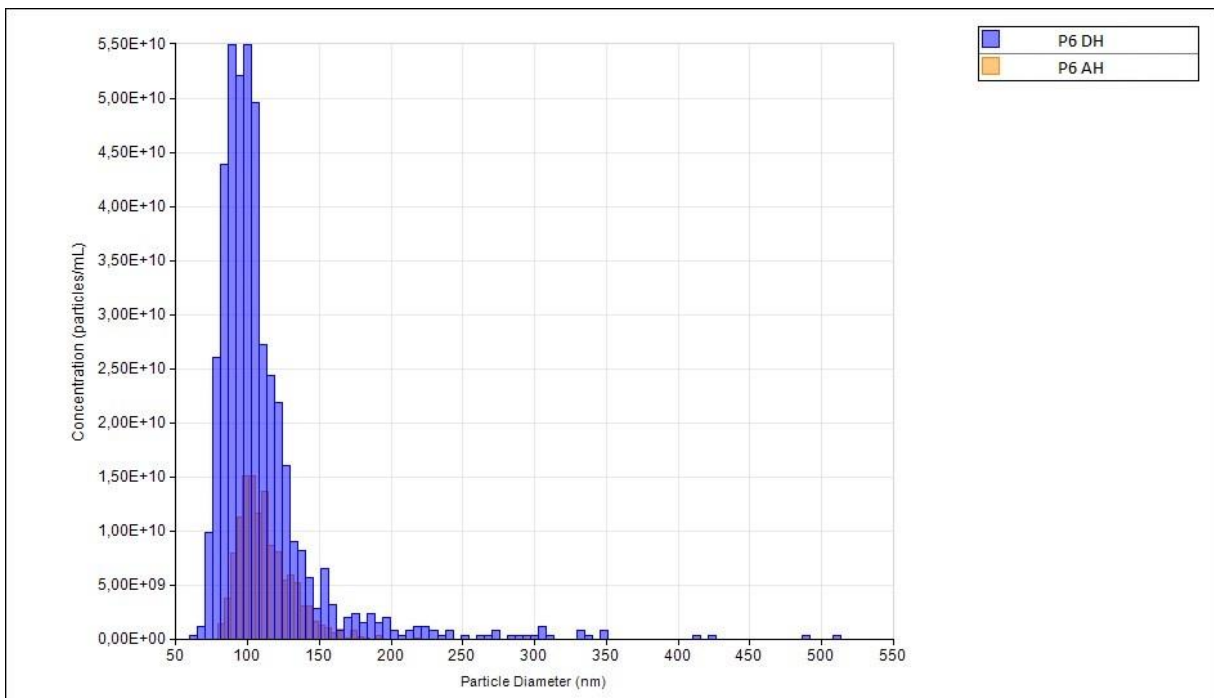


Figura 10. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 6 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

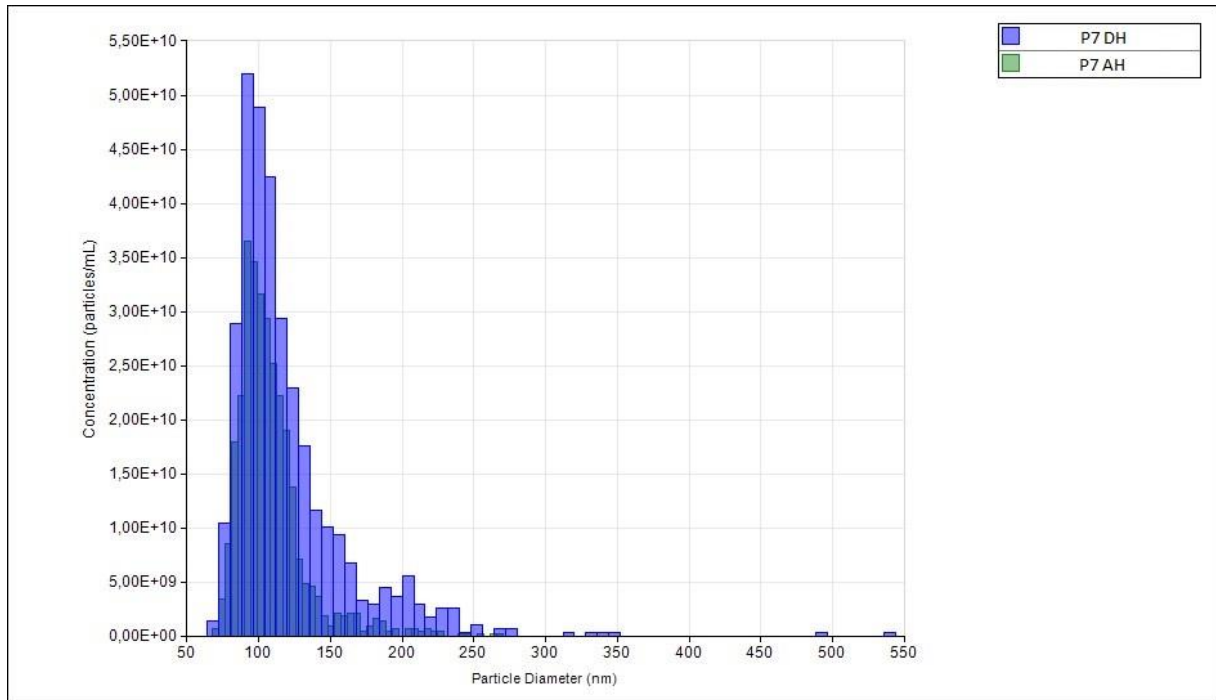


Figura 11. Comparação da distribuição e tamanho das vesículas extracelulares paciente 7 antes e depois da hemodiálise purificadas por Exoquick em nanoporo de 200 nm. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

A figura 12 mostra a análise do número de partículas das amostras de EVs purificadas de cada paciente. Na figura 7A, o teste t pareado representa a média da concentração de partículas/mL de cada paciente antes e depois da hemodiálise, e na figura 7B, o teste Wilcoxon representa a mediana do grupo de pacientes antes e depois da hemodiálise, sugerindo um aumento significativo na concentração de partículas/mL em alguns pacientes após o processo de hemodiálise. Embora alguns indivíduos não apresentem diferença significativa na contagem de partículas entre as amostras antes e depois da hemodiálise, os gráficos A e B sugerem uma clara tendência ao aumento na concentração das mesmas após o procedimento de hemodiálise.

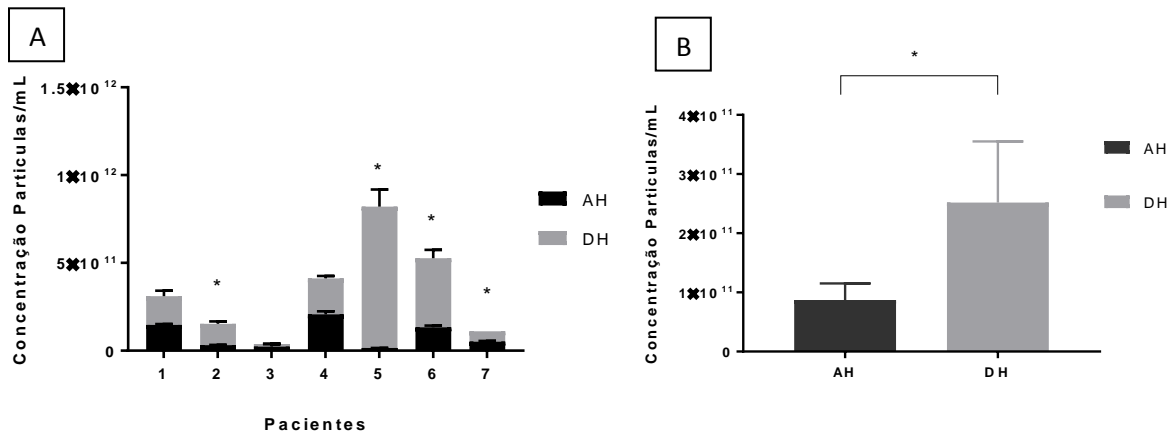


Figura 12. Concentrações relativas de EVs em pacientes com Doença Renal Crônica em hemodiálise. Foram contadas partículas de cada amostra dos pacientes antes da hemodiálise (AH) e depois da hemodiálise (DH) por triplicata técnica, pelo método pulso resistivo (do inglês, Tunable Resistive Pulse Sensing). **(A)** concentração de EVs pacientes AH vs DH, teste pareado (*diferença significativa* $p < 0,05$, (1) - p 0,38; (2) - p 0,00; (3) - p 0,36; (4) - p 0,86; (5) - p 0,00; (6) - p 0,00; (7) - p 0,04) **(B)** concentração de EVs grupos de pacientes AH vs DH. Teste wilcoxon (*diferença significativa* $p < 0,05$, p - 0,01) (*) diferença significativa em relação AH vs DH.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS MARCADORAS DE EVs (EXOSSOMOS) PELO MÉTODO WESTERN BLOT

Os dados da tabela 4, mostram a quantificação proteica das EVs isoladas mediante o método ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences) revelando concentrações diferentes, conseqüentemente se apresenta um padrão de maior nível de proteína total detectado em algumas das amostras dos pacientes depois do procedimento de hemodiálise.

Tabela – 4 Concentração de proteínas totais pelo método colorimétrico de dosagem de proteínas (Bradford)

Amostras		Concentração µg/mL	
		AH	DH
P1	P1	27.000	31.000
P2	P2	24.000	25.000
P3	P3	20.000	14.000
P4	P4	20.000	36.000
P5	P5	21.000	22.000
P6	P6	17.000	36.000
P7	P7	15.000	23.000

Valores em µg/mL das concentrações de proteína total para cada amostra de EVs purificadas nos pacientes antes e depois da hemodiálise. P (paciente), AH (antes da hemodiálise), DH (depois da hemodiálise).

A figura 13, apresenta a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% das proteínas extraídas das amostras de EVs purificadas pelo método. ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution® (System Biosciences). Os resultados demonstraram que o perfil proteico das EVs isoladas do controle positivo (CP) (EVs purificadas do soro de indivíduo saudável, pelo método de ultrafiltração (Tubo cônico 100k Amicon®)), de CMSP, e amostras de paciente antes e depois da hemodiálise (AH-DH), são compostas predominantemente por bandas de proteínas com pesos moleculares compreendidos entre 7 kDa a 210 kDa. Ao mesmo tempo, se demonstra a capacidade de reconhecimento das bandas de proteínas específicas de EVs isoladas a partir do soro de paciente antes e depois da hemodiálise, avaliada por Western Blot para detecção dos marcadores específicos para EVs CD63, CD81 e CD9. A calnexina expressada na membrana de CMSP e não nas amostras de pacientes antes e após hemodiálise, demonstraram a pureza da purificação de Evs por nosso método antes descrito. Os resultados mostrados representam o indivíduo número 1, e foram escolhidos como amostra representativa, a partir do grupo de resultados gerados pelos mesmos experimentos feitos com cada paciente.

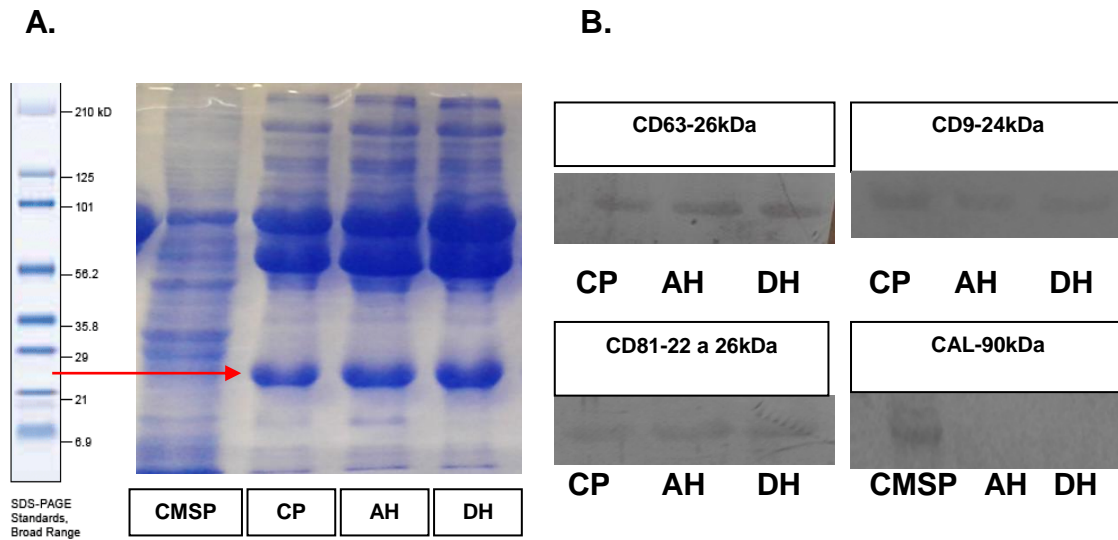


Figura 13. Western blot de proteínas marcadoras de exossomos, demonstrando a presença de EVs (exossomos). **A.** (SDS-PAGE 12%) representativo do perfil de proteínas de CMSP (células mononucleares de sangue periférico), CP (EVs isoladas de soro indivíduo saudável) e AH-DH (amostras de EVs paciente antes e depois da hemodiálise). **B.** *Western Blot* representativo dos componentes de EVs isoladas do soro de paciente antes e depois da hemodiálise (AH-DH), CP (EVs isoladas de pool de soro indivíduos saudáveis), CAL (Calnexina), reconhecidos por anticorpos específicos para certificação de que as estruturas isoladas são compatíveis com EVs. Cada membrana marcada pelos anticorpos foi recortada e montada de acordo com o peso molecular de cada proteína. Na parte superior estão os pesos moleculares em kDa dos marcadores CD63, CD81, CD9 e Calnexina

4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica (figura 14) de Evs isoladas do soro de um dos pacientes do estudo, confirmo a presença de vesículas com morfologia e tamanho (100nm), consistente com as definições atuais de EVs (exossomos).

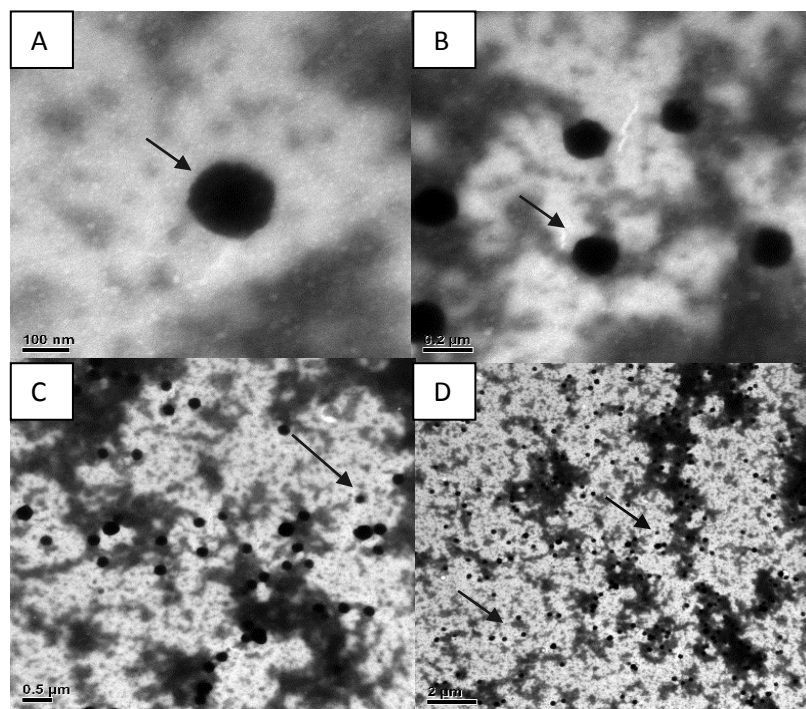


Figura 14. Micrografias eletrônicas de isolamento EVs do soro de paciente antes da hemodiálise, mostrando a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomos. **A.** mostrando partícula em barra de escala: 100 nm **B.** mostrando partículas em barra de escala: 200 nm **C.** mostrando partículas em barra de escala: 500 nm e **D.** mostrando partículas em barra de escala: 2000 nm. As setas indicam as vesículas extracelulares.

4.7 ENSAIO DE ATIVAÇÃO CELULAR

Foi determinada a expressão de marcadores de ativação de linfócitos CD25 e CD69 em CMSP, que durante 24 h estiveram em contato com amostras de EVs antes e depois o procedimento de hemodiálise de sete pacientes com DRC, culturas que foram submetidas a dois tipos de condições: ambiente inflamatório (PHA) e não inflamatório (sem PHA). Na figura 10, o teste t pareado mostra a comparação da porcentagem de ativação de linfócitos (CD3) que foram mantidos em cultura com 25 $\mu\text{g/mL}$ de EVs purificadas de sete pacientes antes e depois da hemodiálise durante 24 h, posteriormente marcados com os anticorpos (CD25 e CD69 conjugados com fluorocromo) para detectar ativação mediante a técnica de citometria de fluxo. Os resultados demonstram que existe uma variação entre os efeitos das EVs, dependendo de cada indivíduo de onde foram originadas. A figura 15 A revela que quando os linfócitos não estão em situação inflamatória, as EVs depois do procedimento de hemodiálise induzem diminuição na expressão do marcador CD25, em contrapartida a figura 15 B demonstra que há tendência de aumento na expressão do CD69. A figura 15 C e D, mostraram que quando os linfócitos estão em situação inflamatória (PHA) existe uma variabilidade na porcentagem de ativação de CD25 e CD69, ligada a cada indivíduo.

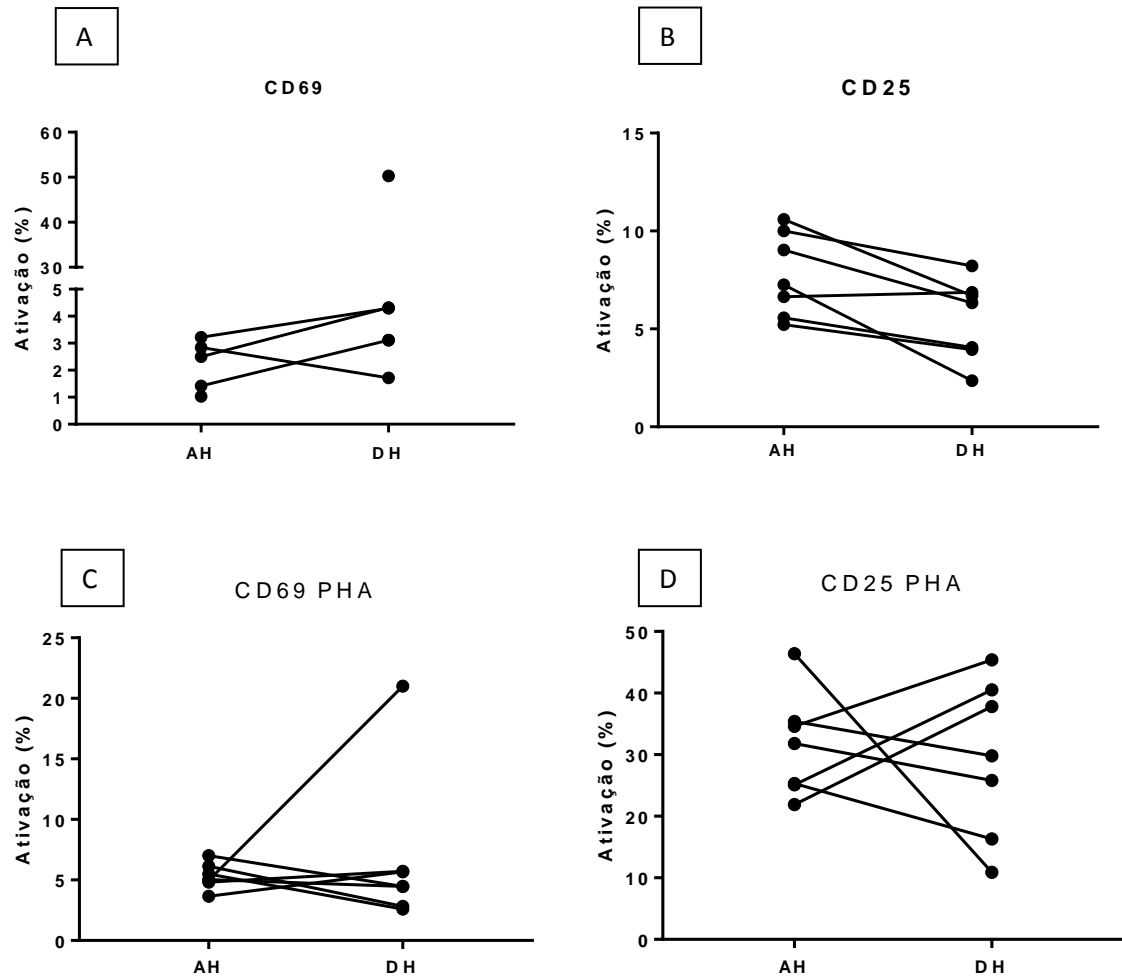


Figura 15. Marcadores de ativação linfocitária. **A.** expressão em % do marcador CD69 em pacientes antes e depois da hemodiálise (AH-DH), **B.** expressão em % do marcador CD25 em pacientes antes e depois da hemodiálise (AH-DH), **C.** expressão em % do marcador CD69-PHA em pacientes antes e depois da hemodiálise (AH-DH), **D.** expressão em % do marcador CD25-PHA em pacientes antes e depois da hemodiálise (AH-DH), (teste t pareado CD25 p: 0,01 CD69 p: 0,07)

5. DISCUSSÃO

Estudaram-se 7 (sete) indivíduos com doença renal crônica ativos no programa de hemodiálise de uma clínica particular (Soclimed – Brasília, DF). Tal escolha implicou em um grande desafio investigativo devido a complexa diversidade do grupo, o qual detém fatores que podem apresentar um viés na pesquisa, como sexo, idade, tempo de tratamento e comorbidades, além do estado clínico decorrente da doença. Embora sempre existam variações fisiopatológicas de um indivíduo para o outro, este estudo obteve padronização em algumas variáveis de alto impacto para o objetivo desta pesquisa, como a idade, que foi definida em um intervalo adequado afim de reduzir a interferência decorrente da grande diferença de idade entre os pacientes e o sexo, tendo em vista que algumas doenças são mais intensificadas em homens ou mulheres. Deste modo, o estudo fornece uma estimativa real do paciente com doença renal crônica, logrando melhor suporte para a análise de resultados em homens e mulheres.

Pacientes com doença renal crônica em tratamento de hemodiálise apresentam um estado inflamatório que pode desencadear diversas comorbidades, que são, por sua vez, um ponto difícil de controlar, visto que podem decorrer do tempo de tratamento ou estado de cronicidade da doença. Devido a possibilidade de causar variação nos dados, estão implícitas em estudos que envolvem tais doenças e devem ser tratadas como parte do quadro clínico. Sabendo que representam maior risco de deterioração da saúde e risco de morte elevado na maioria, a variabilidade nas condições demográficas e comorbidades explica só uma parte das diferenças na mortalidade entre os diferentes centros de diálises.(133)

A variável mais relevante a ser considerada em nosso estudo é a doença de base, a qual foi alvo de uma standardização com maior êxito, ao selecionar uma das principais causas de insuficiência renal crônica: a hipertensão arterial, neste contexto denominada nefropatia hipertensiva. Tal patologia corresponde a uma das doenças mais frequentes nesta população, e que, associada à doença renal crônica, influencia a um elevado risco cardiovascular. (4,134)

O diagnóstico bioquímico da inflamação se estabelece mediante a comprovação da elevação dos mediadores inflamatórios como interleucinas: IL-6, IL-1, TNF- α , ou de determinadas proteínas denominadas da fase aguda, como por exemplo a denominada PCR. O incremento plasmático destas últimas proteínas de

sínteses hepática é o resultado de uma indução enzimática causada na maioria dos casos pelos mediadores inflamatórios, principalmente a IL-6. (34)

O biomarcador mais facilmente mesurável na prática clínica para detectar a presença de inflamação é a PCR que forma parte do sistema de imunidade inata. Neste trabalho foi realizada a técnica supracitada com a finalidade de confirmar a inflamação ativa nos pacientes com DRC estudados. Os dados mostraram títulos altos de PCR em todos os pacientes o que representam de fato a presença de um estado inflamatório ativo, além de variabilidade após o procedimento hemodiálitico, onde, em alguns casos o paciente apresentou títulos menores, enquanto outros mantiveram os mesmos níveis. Estes resultados se correlacionam com a literatura, a qual sugere que o limite superior (ponto de corte) de PCR que define o diagnóstico de inflamação, e arbitrário, ao mesmo tempo que na população geral, uma PCR >3 mg/L se considera um marcador de alto risco para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares. (135) A presença de estados fisiopatológicos no paciente com DRC poderia estar associada a elevações constantes de PCR. (136)

Um dado relacionado a este quesito que seria importante ressaltar é atividade física (caminhada, exercício aeróbico) realizada por alguns pacientes. Achados recentes de um estudo de seguimento por 10 anos respaldam fortemente a função do exercício regular na redução dos níveis plasmáticos de IL-6 e PCR. (137) Uma revisão sistemática da literatura sobre o tema publicada entre 1975 e 2004, de fato conclui que a atividade física regular se associa com um "efeito anti-inflamatório" a longo prazo. (138) Esta informação poderia explicar de certa forma o fato de que alguns pacientes (paciente número 1, 2, 6 e 7) que realizam atividade física tenham apresentado títulos de PCR menores.

A relação entre EVs e o processo de hemodiálise em pacientes renais crônicos não está bem elucidada, justificando um dos objetivos deste estudo, o acompanhamento comparativo de pacientes antes e após a hemodiálise. Para tanto, pesquisas que envolvem estudo de EVs necessitam cumprir requisitos determinados pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares - ISEV para comprovar a existência dessa população nas amostras e suas funções. Para isso, foi lançada a plataforma EV-TRACK - *Transparent Reporting and Centralizing Knowledge in Extracellular Vesicle Research* para estimular o relatório de parâmetros experimentais para a correta interpretação e reprodução de um experimento.(50) Entre os requisitos mencionados pela ISEV encontra-se o isolamento como parte

fundamental do processo, seguido pela determinação da concentração de EVs, incluindo um método de detecção individual das mesmas, como o método de contagem estimada versus faixa de tamanho, TRPS – Tunable Resistive Pulse Sensing

As amostras de EVs purificadas foram submetidas a análise e caracterização baseada no tamanho, concentração e distribuição de partículas pelo método supracitado. Os dados apresentados da análise de cada amostra do paciente antes e depois da hemodiálise confirma a presença de partículas com tamanhos compatíveis com EVs do tipo exossomos e microvesículas. (64,95) Ao mesmo tempo, o análise da concentração de partículas/mL de cada amostra antes e depois da hemodiálise sugere um aumento significativo em alguns pacientes após o processo de hemodiálise. Embora alguns indivíduos não apresentem diferença significativa na contagem de partículas entre as amostras antes e depois da hemodiálise, existe uma clara tendência ao aumento na concentração das mesmas após o procedimento hemodialítico, do mesmo modo a concentração de proteínas de EVs mantem um padrão de elevação após o procedimento de hemodiálise na maioria dos pacientes o que poderia estar correlacionado com esta contagem alterada de EVs. A informação da distribuição de partículas que evidenciam os gráficos gerados a partir dos dados da contagem pela técnica de pulso resistivo, demonstram um pico maior da população de partículas /mL no tamanho entre 50 e 200 nm, tamanho que como foi antes dito se correlaciona com a presença de exossomos e microvesículas, embora também exista evidencia de algumas partículas maiores. Estes gráficos ainda sem aplicação de testes estatísticos podem mostrar um marcado aumento da concentração de partículas em cada amostra dos pacientes após o procedimento de hemodiálise.

Um padrão proteico comum nos exossomos isolados que podem permitir sua identificação, são as tetraspaninas, as quais têm como mais importantes: CD63, CD81, CD82, CD9, CD37, CD53. Combinações de marcadores geralmente são usadas para definir os exossomos, CD63 e CD9 são biomarcadores potenciais na confirmação dos mesmos por meio de ferramentas como o Western Blot, importante na identificação e integridade das proteínas. (139,140) Com esta técnica, a presença de proteínas marcadoras de EVs (exossomos) foi confirmada, e a fim de garantir segurança no experimento, foi utilizada como controle negativo a calnexina, uma proteína que se expressa normalmente no espaço intracelular de várias células,

(141) representando ausência nas amostras de EVs isoladas do paciente antes e depois da hemodiálise o que sugere uma boa purificação por parte da técnica utilizada neste estudo. O método Bradford destinado a quantificação de proteínas continua mostrando o padrão de aumento da concentração de proteínas totais de EVs purificadas das amostras de cada paciente após o procedimento de hemodiálise. Neste ponto dos resultados, o paciente número 3 apresenta diferenças significativas comparadas com o resto de indivíduos, percebendo um comportamento ao longo do estudo muito característico, sendo o único fora do padrão de aumento de pellet, partículas/mL e concentração de proteínas totais após o procedimento de hemodiálise, além de mostrar-se uma concentração mais elevada de PCR, o que em teoria é um paciente com uma inflamação maior que o resto de indivíduos estudados. Futuros experimentos teriam que ser feitos para desvendar as possíveis causas dessa diferença marcada, já que um só paciente não proporciona suficiente informação que possa nos levar a gerar uma hipótese real deste evento específico. Com o objetivo de confirmar a presença e pureza da purificação de EVs, foi feita a técnica de microscopia eletrônica onde imagens obtidas de partículas com um tamanho de aproximadamente 100 nm são mostradas neste trabalho evidenciando vesículas com aparência consistente com as definições atuais de EVs (exossomos e microvesículas).

De Broe ME et al. (1977), (99) demonstrou em seu estudo a existência de um aumento no nível plasmático de EVs de origem endotelial relacionado com a disfunção endotelial nas doenças cardiovasculares podendo ser um dado importante de predição em pacientes com doença renal em etapa terminal. Ainda, achados baseados no estudo de Burton JO et al. (2013), demonstram que microvesículas endoteliais estão elevadas em pacientes submetidos a hemodiálise e diálise peritoneal, com fatores de risco cardiovasculares tradicionais e síndromes coronárias agudas, enquanto as microvesículas plaquetárias se associam com estado de doença aterosclerótica. (142)

Embora as EVs neste estudo não estejam caracterizadas em quanto à sua origem, estes resultados referentes ao aumento de EVs após o procedimento de hemodiálise, poderiam sugerir uma possível implicação das mesmas em doenças renais crônicas, acarretando múltiplos efeitos, como alterações e estados patológicos dependendo do contexto e célula de procedência. De fato sabe-se que as EVs estão

involucradas em processos fisiológicos essenciais para a homeostases renal, promovendo angiogêneses alterada, inflamação e processos pro-fibróticos. (71)

Sabendo a importância do papel das EVs na comunicação de célula a célula, seja estimulando as células alvo por interações mediadas por receptores ou no transporte e carregamento de informação genética entre células e órgãos distantes e que estas contêm materiais que refletem o conteúdo genético e proteômico da célula secretora (46,143), Este tipo de descobertas abre uma perspectiva de modular EVs e explorar suas funções para enfoques terapêuticos.

A inflamação, resultado da interação entre células do sangue, mostra-se fortemente relacionada e associada às microvesículas. Acredita-se que as EVs tenham um papel importante durante as etapas do processo inflamatório transportando fatores anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios. (96)

Entretanto, são escassos os estudos acerca do procedimento de hemodiálise em relação aos níveis circulantes de EVs.(31,142) Desta forma, o estudo objetivou aprofundar-se também neste quesito, pressupondo a possibilidade de um aumento sérico de EVs após o procedimento de hemodiálise e uma provável associação com estados fisiopatológicos no paciente com DRC, principalmente o estado inflamatório.

A hemodiálise ainda sendo um procedimento substitutivo da função renal indispensável para a estabilidade e manutenção do paciente com DRC, gera transtornos que podem estar associados a bioincompatibilidade de biomateriais em circuitos da hemodiálise, particularmente entre as membranas e o sangue. Esta interação pode conduzir a inflamação de todo o corpo em pacientes tratados, e este estado ocorre traz a ativação de sistemas intravasculares, como cascata da coagulação, plaquetas e leucócitos. Tal ativação conduz a liberação de biomarcadores inflamatórios como a PCR, IL-6 e fator de necroses tumoral, que podem ser medidos no plasma do paciente. (144) Incluso o estresse oxidativo apresentado no contexto uremico e durante o tratamento de hemodiálise se sugere como causa de inflamação sistêmica em falha renal avançada. Mencionado que estes processos são contribuintes adicionais a inflamação que se provoca pela ativação do sistema imune inato. (145,146)

Conhecendo que as microvesículas endoteliais estão elevadas em pacientes submetidos a hemodiálise, com fatores de risco cardiovasculares tradicionais e síndromes coronárias agudas, (142) podemos pensar numa possível associação

com o aumento da inflamação sistêmica, a qual está fortemente relacionada com disfunção endotelial e eventos cardiovasculares em pacientes com DRC. (147) Como as células endoteliais saudáveis podem ter propriedades antitrombóticas e anti-inflamatórias, a disfunção endotelial provavelmente representa um vínculo relevante entre a inflamação e os eventos cardiovasculares. A disfunção endotelial aguda tem um papel nos eventos e remodelação a longo prazo da parede vascular, produzindo rigidez arterial e calcificação. (148,149)

Os pacientes podem experimentar eventos tromboembólicos durante e depois de uma sessão de hemodiálise devido a inflamação originada por reações contra materiais estranhos no circuito de hemodiálise que involucram a cascata intravascular. A estenoses de acesso vascular e trombozes também são complicações frequentes em pacientes em hemodiálise. (25,150)

Tendo escassas bases literárias defendendo um possível vínculo entre EVs e inflamação no paciente com DRC, criei um interesse por ter um cenário que possa elucidar um pouco a provável relação do aumento de EVs e o estado inflamatório no paciente renal terminal em tratamento de hemodiálise.

Para tanto, foi desenhado um ensaio de ativação celular onde se objetivou determinar a ativação de linfócitos usando marcadores CD25 e CD69 em linfócitos T, como interesse por definir uma possível ativação imune associada a EVs de pacientes com DRC. Os resultados sugerem de modo geral que dependendo das EVs utilizadas de cada paciente tem-se um comportamento diferente, existindo muita variação entre os efeitos das mesmas, dependentes do paciente de onde foram originadas. O dado mais promissor e interessante, é que quando os linfócitos não estão em situação inflamatória, as EVs após a hemodiálise induzem diminuição na expressão do marcador CD25 existindo uma diferença marcante e significativa ($p < 0,01$), o que poderia indicar que as EVs depois o procedimento de hemodiálise induzem um efeito de baixa ativação de linfócitos T, levando-se em conta a importância deles na iniciação da resposta imune no processo pro inflamatório. Em contraposição embora os dados do CD69 sejam muito variáveis entre pacientes, representado pela ausência de diferença significativa ($p: 0,07$), sugere-se uma tendência de aumento na sua expressão.

O estudo da resposta dos linfócitos T induzida pela ativação poderia ajudar a compreender melhor processos fisiopatológicos no paciente com DRC, especificamente no processo inflamatório crônico. Inúmeras células desempenham

um papel importante na resposta do sistema imunitário, entre estas os linfócitos, constituindo o 20-30% dos leucócitos, com uma variação decorrente do estado de saúde de cada indivíduo. Os linfócitos T se caracterizam por um receptor (TCR), específico, e sua função baseia-se em reconhecer o antígeno que lhe é apresentado a activar o linfócito. (151) O receptor de antígeno das células T na superfície celular está associado a um complexo de peptídeos (CD3), sendo este elemento, importante e necessário para a sinal de transdução após o reconhecimento do antígeno pelo TCR. (152)

Posterior a ativação das células T, vários marcadores da superfície celular são regulados positivamente, cada um deles numa fase diferente do processo de ativação. O marcador de ativação inicial é o CD69, que é uma glicoproteína de superfície celular induzível que é expressa após a ativação a través do receptor TCR ou IL-2. Desempenha um papel na proliferação e sobrevivência dos linfócitos T ativados.(153,154) Se expressa em níveis basais muito baixos em linfócitos em repouso, porém, após ativação com fitohemaglutinina (PHA) (mitógeno que causa ativação a través do TRC), sua expressão aumenta dependentemente do tempo entre 3 e 12 h, permanecendo elevada até 24 horas e posteriormente diminuindo. (155)

O CD25 é a cadeia alfa do receptor trimérico da IL-2, considerado um marcador de ativação celular. Se expressa na superfície de vários subconjuntos de linfócitos de sangue periférica, como as células T de memória reguladora e em repouso. Se regula positivamente dentro das 24 horas após estimulação do complexo TCR-CD3 e permanece elevada alguns dias.(155,156)

Várias citocinas liberadas por monócitos e macrófagos, assim como outros agentes que desencadeiam a ativação de células T, são capazes de induzir a expressão dos marcadores CD25 e CD69, conhecidos também como antígenos de ativação. Estas moléculas celulares tem uma expressão que pode ser induzida em linfócitos T, B, e NK gerada pela estimulação com patógenos durante a inflamação ou por mitógenos (PHA). (157)

Embora o papel dos linfócitos T ativados seja estudado em relação ao estado inflamatório em diversas patologias, especificamente nos pacientes portadores de DRC existem poucos estudos detectando alterações na proporção de células T CD3 e na taxa de linfócitos que expressam CD25 e CD69, ligado a um possível efeito gerado por EVs isoladas do soro de pacientes com DRC antes e após

um procedimento de hemodiálise. Futuros experimentos deveram ser feitos para ter uma noção real da associação de EVs com inflamação em pacientes com DRC, inclusive porque essa variabilidade poderia estar influenciada por fatores decorrentes do estado fisiopatológico de cada paciente. Porém, conhecendo que os linfócitos T ativados são células que contribuem a resposta específica, produzindo linfoquinas que prolongam a inflamação como resposta inume,(158) poderíamos disser que existe um possível efeito de ativação aumentada ou diminuída de células T causado por EVs circulantes de pacientes com DRC, e que esse fenômeno pode-se correlacionar com um possível efeito pró inflamatório ou anti-inflamatório associado a este tipo de EVs, conjetura que teria que ser confirmada com futuras pesquisas onde sejam padronizadas variáveis chaves que dificultam o analises dos dados e um aumento no número amostral para ter resultados com alta confiabilidade.

6. CONCLUSÃO

As microvesículas têm como função principal a sinalização por meio de interações específicas com as células alvo e a transferência de produtos gênicos, sendo, portanto, participantes em processos fisiológicos e patológicos. Deste modo, neste trabalho realizado com pacientes com DRC em hemodiálise foi confirmada a presença de um processo inflamatório no paciente, que poderia estar relacionado com EVs circulantes e, conseqüentemente, evidencia um aumento na concentração das mesmas após o procedimento hemodialítico.

Ainda não está claro o efeito real das EVs nos estados fisiopatológicos do paciente com DRC, mas pode-se observar com este estudo o possível efeito inflamatório ou anti-inflamatório movido pelas EVs no paciente com insuficiência renal crônica após a hemodiálise. A presença de EVs nos fluidos como o sangue as torna facilmente acessíveis e seu número, origem celular, composição e função podem depender da doença. Portanto, obter mais informação sobre a EVs na DRC, como por exemplo, a sua especificidade molecular, poderia permitir a identificação da origem celular, proporcionando novas ferramentas de diagnóstico, inclusive oferecendo informação prognósticas em diversos estados fisiopatológicos dos pacientes, como a inflamação crônica, as doenças renais e cardiovasculares. O reconhecimento de sinais emitidos por EVs poderia abrir novas estratégias de terapias nesta população estudada.

Estes achados requerem uma maior investigação, porém, sugere-se a partir dessa pesquisa que as EVs podem detectar-se como biomarcadores de doenças devido a seu elevado número e suas propriedades, além de contribuir no desenvolvimento de doenças, incluindo a doença renal, ao induzir inflamação. Também é cabível supor que essa contribuição na indução e progressão da doença renal pode conduzir à criação de modernos tratamentos que sejam orientados na redução sistêmica de EVs na circulação.

Ainda que o formato do experimento não tenha sido desenhado para investigar associações com morbidade e mortalidade cardiovascular, há interesse na realização de futuros ensaios, considerando a sua importância.

Finalmente, este estudo tem limitações que futuramente poderão ser corrigidas. Embora o número pequeno de indivíduos represente inicialmente uma dificuldade com relação à confiabilidade nos resultados, o estudo tem semelhança

em número amostral a outras publicações relacionadas, além de apresentar resultados reproduzíveis condizentes com a literatura atual.

A identificação da origem celular das EVs precisa ser feita, podendo ter um panorama funcional mais específico neste tipo de doença. Além de realizar replicatas biológicas, afim de confirmar os dados com maior precisão e credibilidade.

REFERENCIAS

1. Junior JER. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J Bras Nefrol.* 2004;26(1):1–3.
2. Hall, John E. GAC. *Tratado De Fisiologia Medica.* ELSEVIER. 2011. 160 p.
3. Tortora G, Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología.* Panamericana. 2013. 607-612, 593-596 p.
4. Bortolotto LA. Hipertensão arterial e insuficiência renal crônica. *Rev Bras Hipertens.* 2008;15(3):152–5.
5. Dummer CD, Thomé FS, Veronese F V. Chronic renal disease, inflammation and atherosclerosis: New concepts about an old problem. *Rev Assoc Med Bras*
6. Yao Q, Lindholm B, Stenvinkel P. Inflammation as a cause of malnutrition, atherosclerotic cardiovascular disease, and poor outcome in hemodialysis patients. *Hemodialysis International.* 2004. p. 118–29.
7. Kaysen GA, Eiserich JP. Characteristics and Effects of Inflammation in End-Stage Renal Disease. In: *Seminars in Dialysis.* 2003. p. 438–46.
8. Paul JL, Sall ND, Soni T, Poignet JL, Lindenbaum A, Man NK, et al. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron [Internet].* 1993;64(1):106–9.
9. Nguyen-Khoa T, Massy Z a, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(2):335–40.
10. Schettler V, Wieland E, Verwiebe R, Schuff-Werner P, Scheler F, Oellerich M. Plasma lipids are not oxidized during hemodialysis. *Nephron.* 1994;67(0028–2766 (Print)):42–7.
11. Hirayama A, Nagase S, Gotoh M, Takemura K, Tomida C, Ueda A, et al. Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in

- uremia. *Nephron*. 2000;86(4):436–40.
12. Cristol JP, Bosc JY, Badiou S, Leblanc M, Lorrho R, Descomps B, et al. Erythropoietin and oxidative stress in haemodialysis: beneficial effects of vitamin E supplementation. *Nephrol Dial Transpl*. 1997;12(11):2312–7.
 13. Zwołńska D, Władysław G, Maria S, Katarzyna K-P, Szprynger K. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis. *Pediatr Nephrol*. 2006;21:705–10.
 14. Bayés B, Pastor MC, Bonal J, Foraster A, Romero R. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular mortality in haemodialysis--role of seniority and intravenous ferrotherapy: analysis at 4 years of follow-up. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(December 2005)
 15. Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: Sources, consequences, and therapy. *Seminars in Dialysis*. 2002. p. 329–37.
 16. Stenvinkel P, Pecoits-Filho R, Lindholm B. Coronary artery disease in end-stage renal disease: No longer a simple plumbing problem. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(7):1927–39.
 17. Nusair MB, Rajpurohit N, Alpert MA. Chronic Inflammation and Coronary Atherosclerosis in Patients with End-Stage Renal Disease. *Cardiorenal Med*. 2012;2(2):117–24.
 18. Yao Q, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease. *Scand J Urol Nephrol*. 2004;38(5):405–16.
 19. CHEN H-A, WANG J-J, CHOU C-T, CHIEN C-C, CHU C-C, SHEU M-J, et al. Predictors of Longterm Mortality in Patients with and without Systemic Lupus Erythematosus on Maintenance Dialysis: A Comparative Study. *J Rheumatol*. 2011;38(11):2390–4.
 20. Ekdahl KN, Soveri I, Hilborn J, Fellström B, Nilsson B. Cardiovascular disease in haemodialysis: Role of the intravascular innate immune system. *Nature*

- Reviews Nephrology. 2017. p. 285–96.
21. Tarakçioğlu M, Erbağcı AB, Usalan C, Deveci R, Kocabaş R. Acute effect of hemodialysis on serum levels of the proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm.* 2003;12(1):15–9.
 22. Nadeem M, Stephen L, Schubert C, Davids MR. Association between periodontitis and systemic inflammation in patients with end-stage renal disease. *SADJ.* 2009;64(10):470–3.
 23. Betjes MGH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(5):255–65.
 24. Hörl WH. Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13 Suppl 1:S62-71.
 25. Frank RD, Weber J, Dresbach H, Thelen H, Weiss C, Floege J. Role of contact system activation in hemodialyzer-induced thrombogenicity. *Kidney Int.* 2001;60(5):1972–81.
 26. Friedrich B, Alexander D, Janessa A, Häring HU, Lang F, Risler T. Acute effects of hemodialysis on cytokine transcription profiles: Evidence for C-reactive protein-dependency of mediator induction. *Kidney Int.* 2006;70(12):2124–30.
 27. Eckardt K-U, Gillespie IA, Kronenberg F, Richards S, Stenvinkel P, Anker SD, et al. High cardiovascular event rates occur within the first weeks of starting hemodialysis. *Kidney Int.* 2015;88(5):1117–25.
 28. Hung AM, Ellis CD, Shintani A, Booker C, Ikizler TA. IL-1 β receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(3):437–42.
 29. Helal I, Zerelli L, Krid M, ElYounsi F, Ben Maiz H, Zouari B, et al. Comparison of C-reactive protein and high-sensitivity C-reactive protein levels in patients on hemodialysis. *Saudi J Kidney Dis Transplant An Off Publ Saudi Cent Organ Transplantation, Saudi Arab.* 2012;23(3):477–83. 1&site=ehost-live

30. Akdag I, Yilmaz Y, Kahvecioglu S, Bolca N, Ercan I, Ersoy A, et al. Clinical value of the malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome for long-term prediction of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease: A 5-year prospective study. *Nephron - Clin Pract.* 2008;108(2):99–106.
31. Carmona A, Agüera ML, Luna-Ruiz C, Buendía P, Calleros L, García-Jerez A, et al. Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2017;312(4):F673–81.
32. Brito F, Almeida S, Figueredo CMS, Bregman R, Suassuna JHR, Fischer RG. Extent and severity of chronic periodontitis in chronic kidney disease patients. *J Periodontal Res.* 2012;47(4):426–30.
33. Kir HM, Eraldemir C, Dervisoglu E, Caglayan C, Kalender B. Effects of chronic kidney disease and type of dialysis on serum levels of adiponectin, TNF- α and high sensitive C-reactive protein. *Clin Lab.* 2012;58(5–6):495–500.
34. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B, et al. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13 Suppl 1(suppl 1):S28-36.
35. Pupim LB, Himmelfarb J, McMonagle E, Shyr Y, Ikizler TA. Influence of initiation of maintenance hemodialysis on biomarkers of inflammation and oxidative stress. *Kidney Int.* 2004;65(6):2371–9.
36. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004;65(3):1009–16.
37. Foley R, Parfrey P, Sarnak M. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5):S112–9.
38. Kalantar-Zadeh K, Block G, Humphreys MH, Kopple JD. Reverse epidemiology of cardiovascular risk factors in maintenance dialysis patients. *Kidney Int.* 2003;63(3):793–808.

39. Castillo R, Lozano T, Escolar G, Revert L, Lopez J, Ordinas A. Defective platelet adhesion on vessel subendothelium in uremic patients. *Blood*. 1986;68(2):337–42.
40. Vaziri ND, Gonzales EC, Wang J, Said S. Blood Coagulation, Fibrinolytic, and Inhibitory Proteins in End-Stage Renal Disease: Effect of Hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 1994;23(6):828–35.
41. Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Seminars in Dialysis*. 2006. p. 317–22.
42. Nampoory MRN, Das KC, Johny K V., Al-Hilali N, Abraham M, Easow S, et al. Hypercoagulability, a serious problem in patients with ESRD on maintenance hemodialysis, and its correction after kidney transplantation. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(4):797–805.
43. Casserly LF, Reddy SM, Dember LM. Venous thromboembolism in end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(2):405–11.
44. Aggarwal A, Kabbani SS, Rimmer JM, Gennari FJ, Taatjes DJ, Sobel BE, et al. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. *Am J Kidney Dis*.
45. Hugel B. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology*. 2005;20(1):22–7.
46. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*. 2006;20(9):1487–95.
47. Fujita Y, Yoshioka Y, Ito S, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Intercellular communication by extracellular vesicles and their MicroRNAs in Asthma. *Clin Ther*. Elsevier; 2014;36(6):873–81.
48. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(16):2667–88.

49. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1–60.
50. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res*. 2017;120(10):1632–48.
51. Randolph WE, Service M. THE SIGNIFICANCE OF THE PROTEIN OF BLOOD * The activators of blood clotting present ' in mammalian tissue , i . e . the agents responsible for the conversion of prothrombin to thrombm , have been shown to be lipoproteins of a very high particle weight (l . 1946;(7).
52. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269–88.
53. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol*. 1969;41(1):59–72.
54. Brody I, Ronquist G, Gottfries A. Ultrastructural localization of the prostasome - an organelle in human seminal plasma. *Ups J Med Sci*. 1983;88(2):63–80.
55. Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated Endocytosis of Transferrin and of the Transferrin Receptor in Rat Reticulocytes Recycling. *J Cell Biol*. 1983;97:329–39.
56. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. 1987;262(19):9412–20.
57. Orr L, Adam M, Johnstone RM. Externalization of membrane-bound activities during sheep reticulocyte maturation is temperature and ATP dependent. *Biochem Cell Biol*. 1987;65(12):1080–90.
58. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654–9.

59. Dudani JS, Gossett DR, Tse HTK, Lamm RJ, Kulkarni RP, Carlo D Di. Rapid inertial solution exchange for enrichment and flow cytometric detection of microvesicles. *Biomicrofluidics*. 2015;9(1):14112.
60. Xu R, Greening DW, Rai A, Ji H, Simpson RJ. Highly-purified exosomes and shed microvesicles isolated from the human colon cancer cell line LIM1863 by sequential centrifugal ultrafiltration are biochemically and functionally distinct. *Methods*. 2015;87:11–25.
61. Van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med*. 2009;67(7):266–73.
62. Biller SJ, Mcdaniel LD, Breitbart M, Rogers E, Paul JH, Chisholm SW. Membrane vesicles in sea water: Heterogeneous DNA content and implications for viral abundance estimates. *ISME J*. Nature Publishing Group; 2017;11(2):394–404.
63. Lawson C, Kovacs D, Finding E, Ulfelder E, Luis-Fuentes V. Extracellular Vesicles: Evolutionarily Conserved Mediators of Intercellular Communication. *Yale J Biol Med*. 2017;90(3):481–91.
64. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*. Taylor & Francis; 2017;8(4):220–32.
65. Bruno S, Porta S, Bussolati B. Extracellular vesicles in renal tissue damage and regeneration. *Eur J Pharmacol*. Elsevier; 2016;790:83–91.
66. Sun Y, Liu J. Potential of cancer cell-derived exosomes in clinical application: A review of recent research advances. *Clin Ther*. Elsevier; 2014;36(6):863–72.
67. Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov A V. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc*. 2015;2015(4):319–23.
68. Lemoine S, Thabut D, Housset C, Moreau R, Valla D, Boulanger CM, et al. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Nature Publishing Group; 2014;11(6):350–61.
69. Szabo G, Misja P. Membrane vesicles , current state-of-the-art : emerging role

- of extracellular vesicles. 2011;2667–88.
70. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. 2009;9(AugustT).
 71. Ståhl A lie, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol. Pediatric Nephrology*; 2017;1–20.
 72. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569–79.
 73. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983;33(3):967–78.
 74. Zhou S, Abdouh M, Arena V, Arena M, Arena GO. Reprogramming malignant cancer cells toward a benign phenotype following exposure to human embryonic stem cell microenvironment. *PLoS One*. 2017;12(1):1–21.
 75. Foster BP, Balassa T, Benen TD, Dominovic M, Elmadjian GK, Florova V, et al. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2016. p. 379–95.
 76. Chistiakov DA, Chistiakov AA. ??-Synuclein-carrying extracellular vesicles in Parkinson's disease: deadly transmitters. *Acta neurologica Belgica*. 2017. p. 43–51.
 77. Hannafon BN, Ding WQ. Intercellular communication by exosome-derived microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):14240–69.
 78. Muralidharan-Chari, Vandhana; Clancy, James; Plou, Carolyn; Romao, Maryse; Chavrier, Philippe; Raposo, Graca; D'Souza-Schorey C. ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*. 2009;19(22):1875–85.
 79. Raposo G, Method M, Chavrier P, Souza-schorey CD. derived Microvesicles.

- 2015;
80. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43–51.
 81. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 2010;123(10):1603–11.
 82. Fleissner F, Goerzig Y, Haverich A, Thum T. Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine. *Am J Transplant.* 2012;12(2):289–97.
 83. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. *Traffic.* 2011;12(12):1659–68.
 84. Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28(1):337–62.
 85. Schmidt O, Teis D. The ESCRT machinery. *Curr Biol. Elsevier;* 2012;22(4):R116–20.
 86. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell.* 2001;106(2):145–55.
 87. Wollert T, Wunder C, Lippincott-schwartz J, James H. NIH Public Access. 2009;458(7235):172–7.
 88. van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J.* 2003;369(Pt 2):199–211.
 89. van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, et al. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Dev Cell.* 2011;21(4):708–21.
 90. Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell

- physiology. *Physiol Rev.* 2011;91(1):119–49.
91. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol.* 2012;3 MAY(May):1–12.
 92. McConnell RE, Higginbotham JN, Shifrin DA, Tabb DL, Coffey RJ, Tyska MJ. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol.* 2009;185(7):1285–98.
 93. Robert F.A. Zwaal and Alan J. Schroit. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *J Am Soc Hematol.* 1998;91(2):371–82.
 94. Leventis PA, Grinstein S. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu Rev Biophys.* 2010;39(1):407–27.
 95. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol.* 2013;113(1):1–11.
 96. Köppler B, Cohen C, Schlöndorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: Anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol.* 2006;36(3):648–60.
 97. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood.* 2004;104(8):2543–8.
 98. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Seminars in immunopathology.* 2011. p. 469–86.
 99. Hulsmans M, Holvoet P. MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease. *Cardiovascular Research.* 2013. p. 7–18.
 100. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijssma O, Nieuwland R, Schwaebble WJ, et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement

- activation. *Eur J Immunol*. 2002;32(6):1726–36.
101. Forlow SB, McEver RP, Nollert MU. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 2000;95(4):1317–23.
 102. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1998;102(1):136–44.
 103. Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol*. 1998;161(8):4382–7.
 104. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity*. 2001;15(5):825–35.
 105. Gildea JJ, Seaton JE, Victor KG, Reyes CM, Bigler Wang D, Pettigrew AC, et al. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells. *Clin Biochem*. 2014;47(15):89–94.
 106. Jodo S, Xiao S, Hohlbaum A, Strehlow D, Marshak-Rothstein A, Ju S Te. Apoptosis-inducing membrane vesicles: A novel agent with unique properties. *J Biol Chem*. 2001;276(43):39938–44.
 107. Levi M, Van Der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004. p. 2698–704.
 108. Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, et al. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(6).
 109. Tushuizen ME, Diamant M, Sturk A, Nieuwland R. Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: Friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):4–9.
 110. Karpman D, Ståhl A, Arvidsson I. Extracellular vesicles in renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2017.

111. Fox JE. Shedding of adhesion receptors from the surface of activated platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994;5:291–304.
112. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, et al. Human vascular smooth muscle cells undergo vesicle-mediated calcification in response to changes in extracellular calcium and phosphate concentrations: a potential mechanism for accelerated vascular calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2857–67.
113. Sato S, Zhu XL, Sly WS. Carbonic anhydrase isozymes IV and II in urinary membranes from carbonic anhydrase II-deficient patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(16):6073–6.
114. Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101(36):13368–73.
115. Ranghino A, Dimuccio V, Papadimitriou E, Bussolati B. Extracellular vesicles in the urine: Markers and mediators of tissue damage and regeneration. *Clin Kidney J*. 2015;8(1):23–30.
116. Ricci Z, Ronco C. Pathogenesis of Acute Kidney Injury During Sepsis. *Curr Drug Targets*. 2009;10:1179–83.
117. Zafrani L, Gerotziafas G, Byrnes C, Hu X, Perez J, Leví C, et al. Calpastatin controls polymicrobial sepsis by limiting procoagulant microparticle release. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185(7):744–55.
118. Ståhl A, Arvidsson I, Johansson KE, Chromek M, Rebetz J, Loos S, et al. A Novel Mechanism of Bacterial Toxin Transfer within Host Blood Cell-Derived Microvesicles. *PLoS Pathog*. 2015;11(2).
119. Pang P, Abbott M, Chang SL, Abdi M, Chauhan N, Mistri M, et al. Human vascular progenitor cells derived from renal arteries are endothelial-like and assist in the repair of injured renal capillary networks. *Kidney Int*. 2017;91(1):129–43.
120. Martino F, Lorenzen J, Schmidt J, Schmidt M, Broll M, Görzig Y, et al.

- Circulating microRNAs are not eliminated by hemodialysis. *PLoS One*. 2012;7(6).
121. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol Cell*. 2010;39(1):133–44.
 122. Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, et al. Microparticles: Major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular Research*. 2012. p. 633–44.
 123. Jansen F, Nickenig G, Werner N. Extracellular vesicles in cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2017. p. 1649–57.
 124. Quek C, Hill AF. The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017. p. 1178–86.
 125. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):566–73.
 126. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating Endothelial Microparticles Are Associated with Vascular Dysfunction in Patients with End-Stage Renal Failure. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3381–8.
 127. Simak J, Gelderman MP. Cell membrane microparticles in blood and blood products: Potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion Medicine Reviews*. 2006. p. 1–26.
 128. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003. p. 168–75.
 129. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS. The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2007. p. 159–65.

130. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. In: *Journal of Internal Medicine*. 2008. p. 528–37.
131. Spek CA. Tissue factor: From “just one of the coagulation factors” to a major player in physiology. In: *Blood Coagulation and Fibrinolysis*. 2004.
132. Oehmcke S, Westman J, Malmström J, Mörgelin M, Olin AI, Kreikemeyer B, et al. A Novel Role for Pro-Coagulant Microvesicles in the Early Host Defense against *Streptococcus pyogenes*. *PLoS Pathog*. 2013;9(8).
133. Goodkin DA, Bragg-Gresham JL, Koenig KG, Wolfe RA, Akiba T, Andreucci VE, et al. Association of Comorbid Conditions and Mortality in Hemodialysis Patients in Europe, Japan, and the United States: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(12):3270–7.
134. Maqueda IG, Rodríguez CC, Cervantes CE, Garcia A, Moral JRP, Prieto E, et al. BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA - ANGIOTENSINA EN LA ENFERMEDAD ONTARGET Enfermedad cardiovascular y función renal . Mecanismos patogénicos. 2008;
135. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003. p. 499–511.
136. De Souza Terra F, Maria A, Dias Costa D, Tavares De Figueiredo E, Moterani De Mo-Rais A, Dias Costa M, et al. As principais complicações apresentadas pelos pacientes renais crônicos durante as sessões de hemodiálise. *Rev Bras Clínica Médica*. 2010;8(3):187–92.
137. Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: A systematic review. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005. p. 1563–9.
138. Hamer M, Sabia S, Batty GD, Shipley MJ, Tabák AG, Singh-Manoux A, et al. Physical activity and inflammatory markers over 10 years: Follow-up in men

- and women from the whitehall II cohort study. *Circulation*. 2012;126(8):928–33.
139. Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luiders TM, Willemsen R, Severijnen LAA, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31(1):114–21.
 140. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*. 1998;273(32):20121–7.
 141. Okazaki Y, Ohno H, Takase K, Ochiai T, Saito T. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2000;275(46):35751–8.
 142. Burton JO, Hamali HA, Singh R, Abbasian N, Parsons R, Patel AK, et al. Elevated Levels of Procoagulant Plasma Microvesicles in Dialysis Patients. *PLoS One*. 2013;8(8).
 143. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clin Chim Acta*. 1977;81(3):237–45.
 144. Wanner C, Amann K, Shoji T. The heart and vascular system in dialysis. *Lancet (London, England)*. 2016. p. 276–84.
 145. Annuk M, Soveri I, Zilmer M, Lind L, Hulthe J, Fellström B. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *J Nephrol*. 2005;18(6):721–6.
 146. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellstrom B. Oxidative Stress and Endothelial Function in Chronic Renal Failure. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12):2747–52.
 147. Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2747–52.

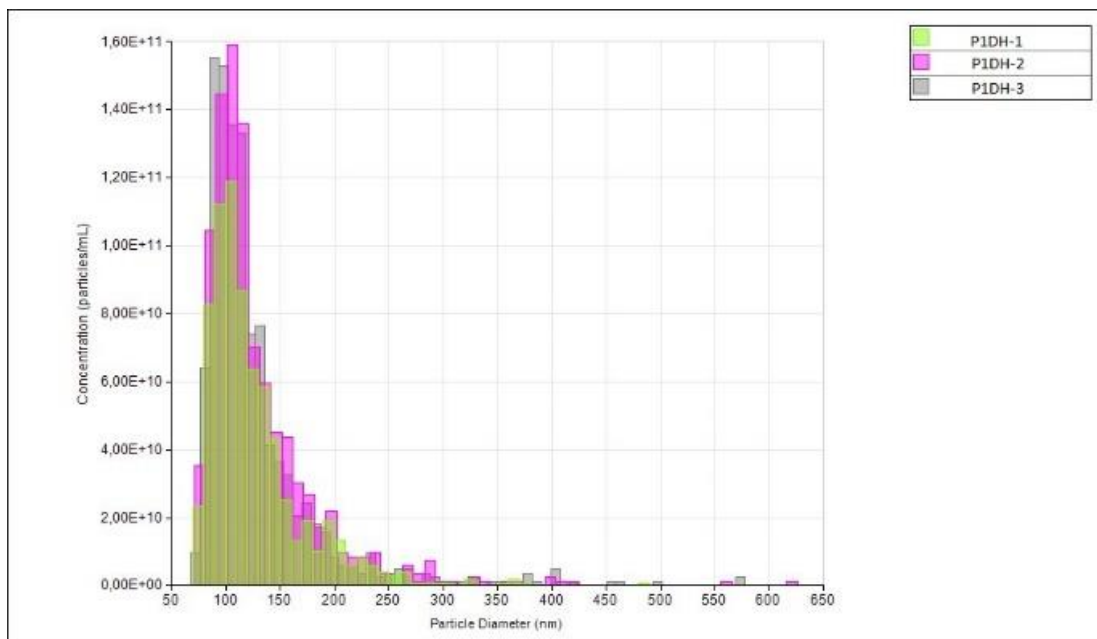
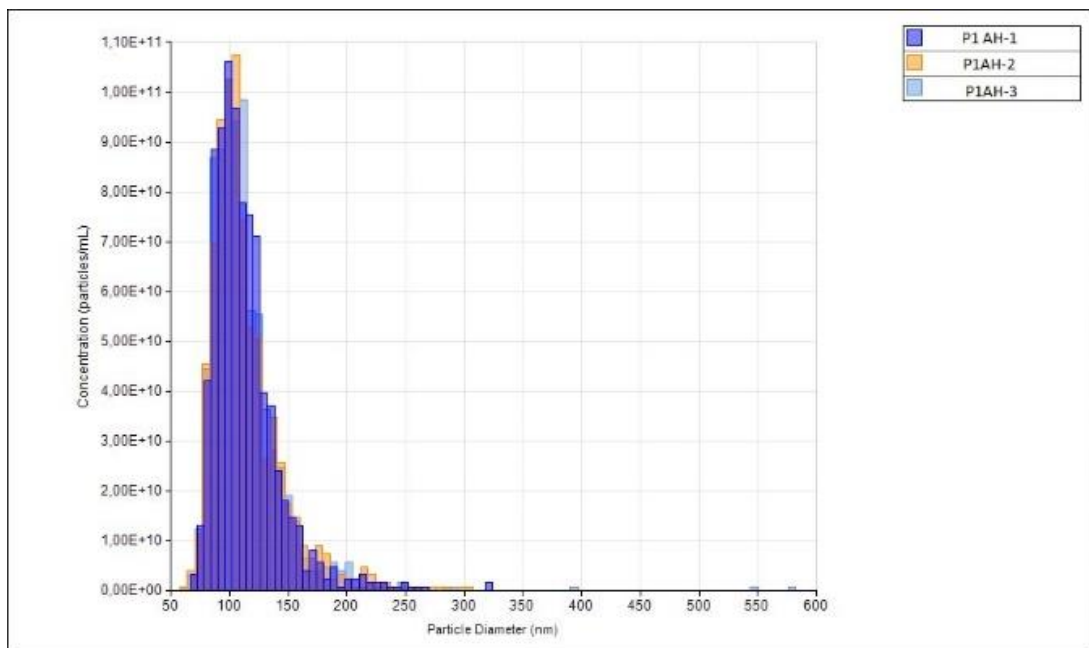
148. Taal MW. Arterial stiffness in chronic kidney disease: An update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2014. p. 169–73.
149. Agharazii M, St-Louis R, Gautier-Bastien A, Ung RV, Mokas S, Larivière R, et al. Inflammatory cytokines and reactive oxygen species as mediators of chronic kidney disease-related vascular calcification. *Am J Hypertens*. 2015;28(6):746–55.
150. Woodruff TM, Nandakumar KS, Tedesco F. Inhibiting the C5-C5a receptor axis. *Molecular Immunology*. 2011. p. 1631–42.
151. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. *Immunology*. 2003. 619 p.
152. Male D, Brostoff J, Roth DB RI. *Immunology*. Elsevier. 2013.
153. López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sánchez-Mateos P, et al. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*. 1993;178(2):537–47.
154. Cambiaggi C, Scupoli MT, Cestari T, Gerosa F, Carra G, Tridente G, et al. Constitutive expression of CD69 in interspecies T-cell hybrids and locus assignment to human chromosome 12. *Immunogenetics*. 1992;36(2):117–20.
155. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods*. 2004;293(1–2):127–42.
156. Jackson AL, Matsumoto H, Janszen M, Maino V, Blidy A, Shye S. Restricted expression of p55 interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990;54(1):126–33.
157. Sancho D, Gómez M, Sánchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory

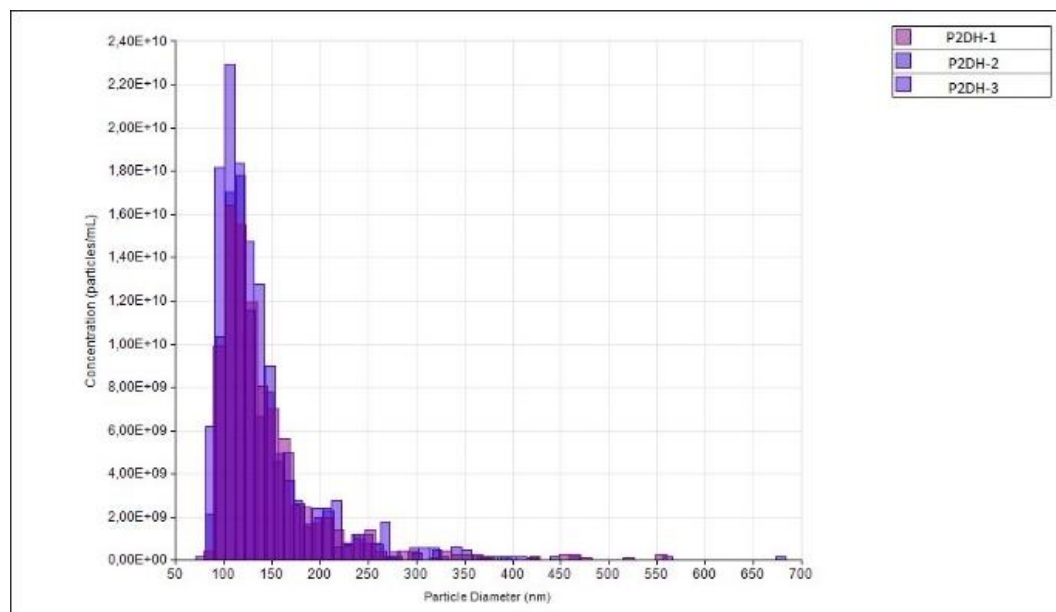
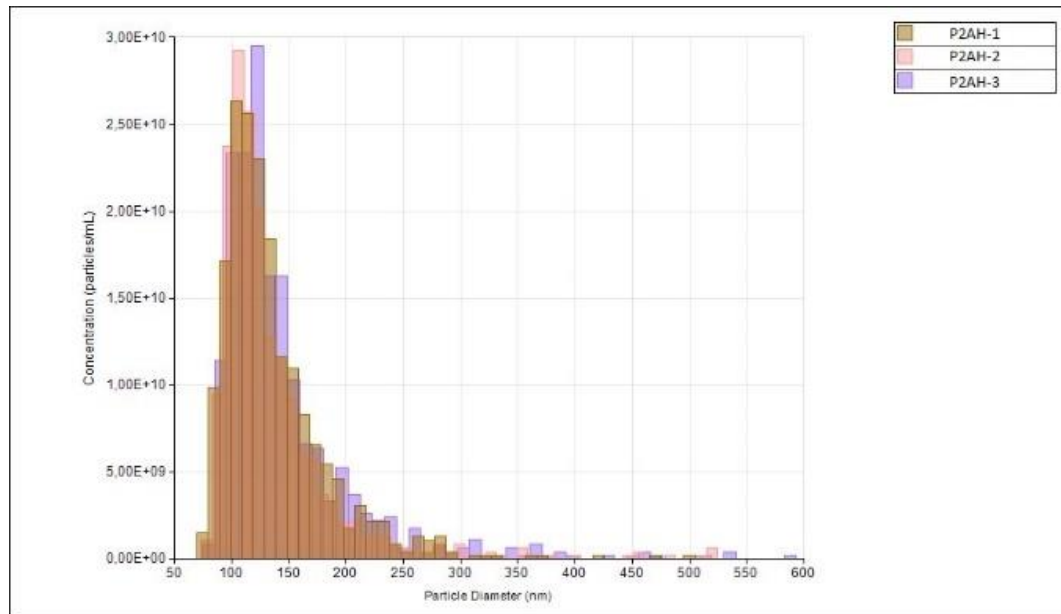
molecule induced following activation. Trends in Immunology. 2005. p. 136–40.

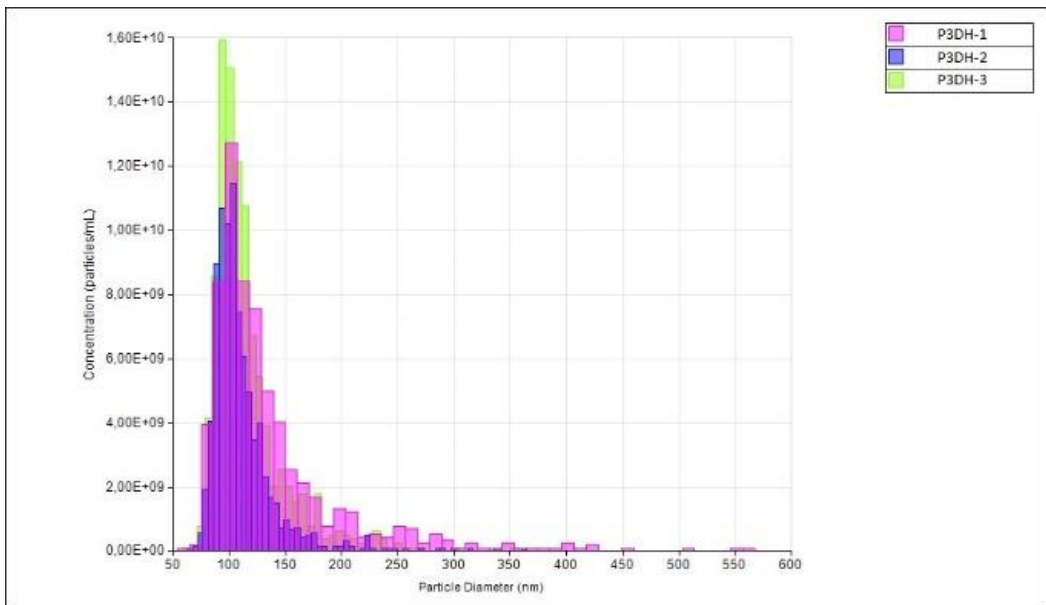
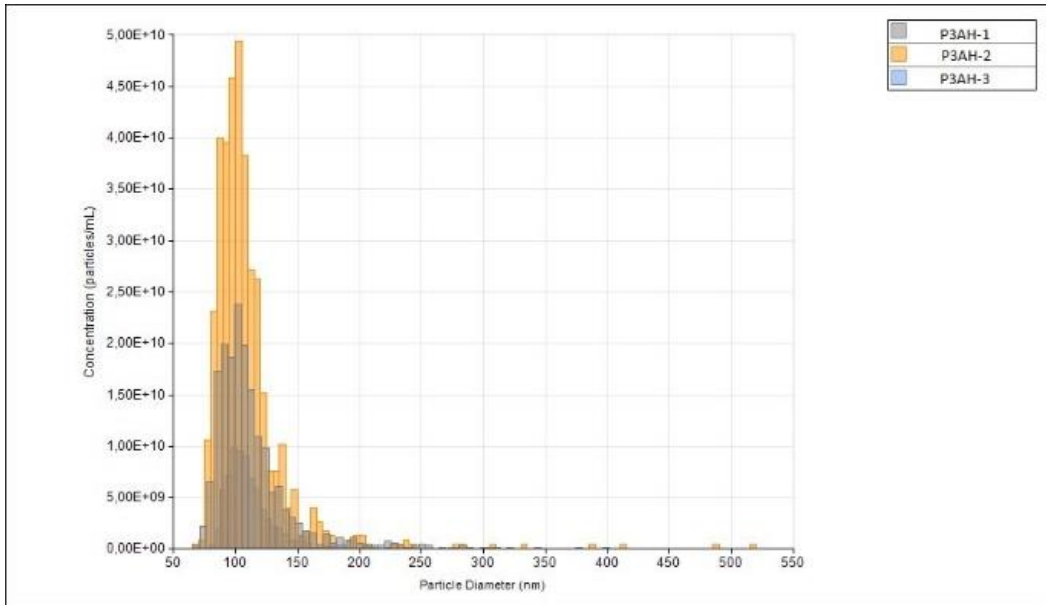
158. Bórdes R. El proceso inflamatorio. Rev Enfermería. 1994;4:9–12.

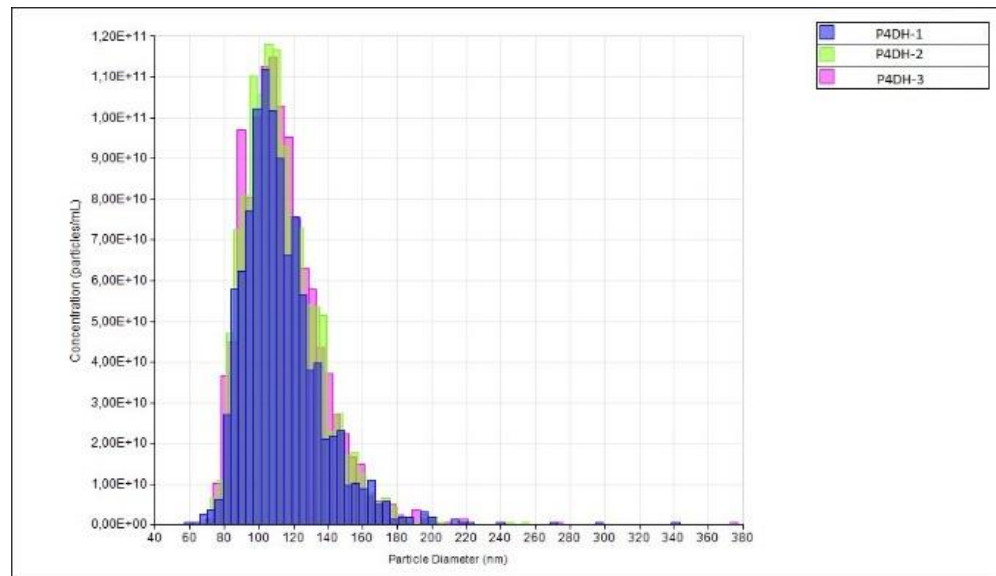
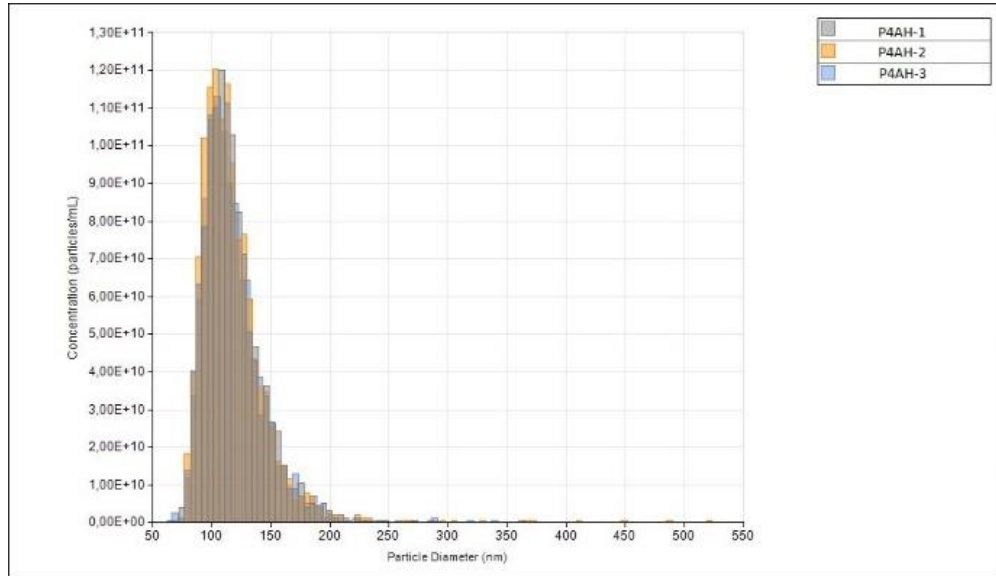
APÊNDICE A - TAMANHO E DISTRIBUIÇÃO DE EVS DE CADA PACIENTE ANTES E DEPOIS DA HEMODIÁLISE PELO METODO TUNABLE RESISTIVE PULSE SENSING

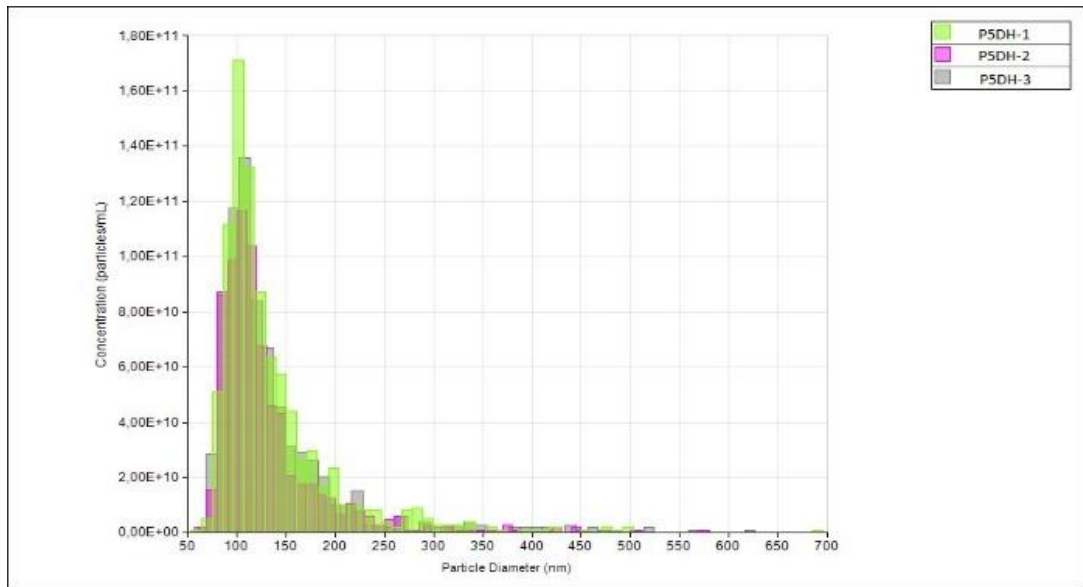
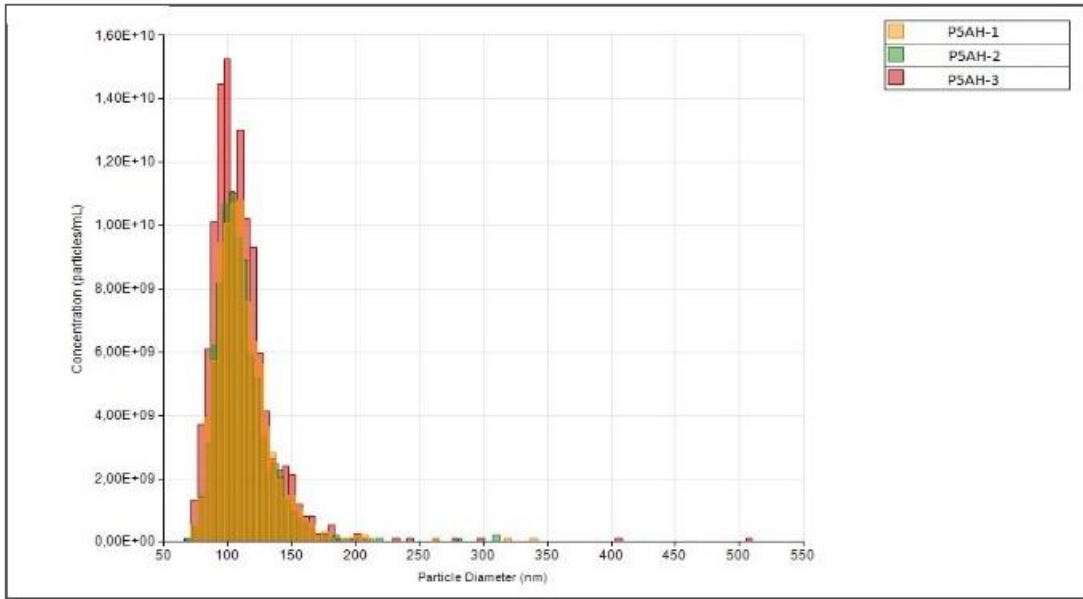
Dados que representam resultados das triplicatas de cada amostra. O programa utilizado para gerar os gráficos: software *Izon Control Suite* versão 2.2. P (paciente), AH (antes da hemodiálise) DH (depois da hemodiálise)

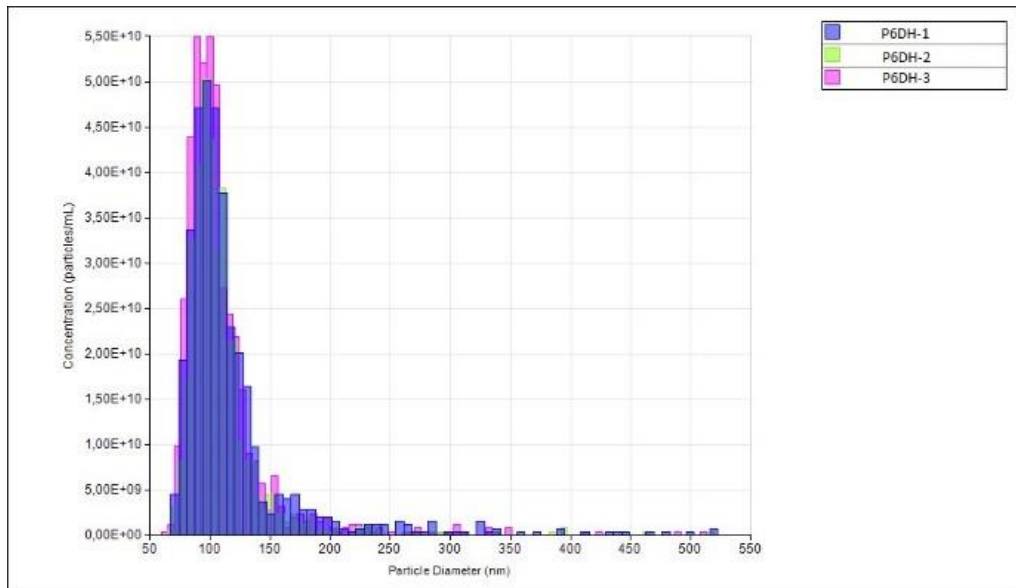
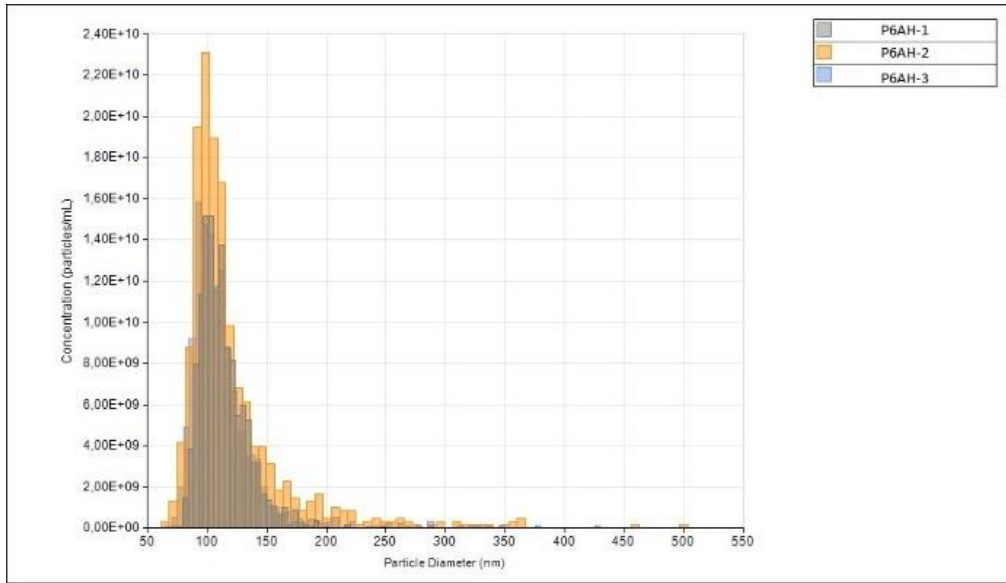


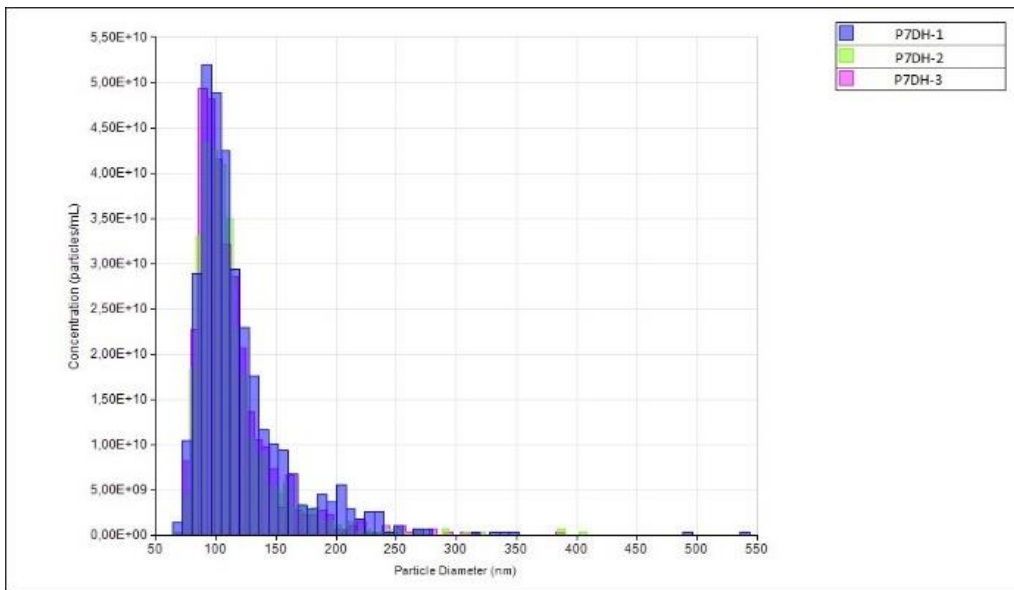
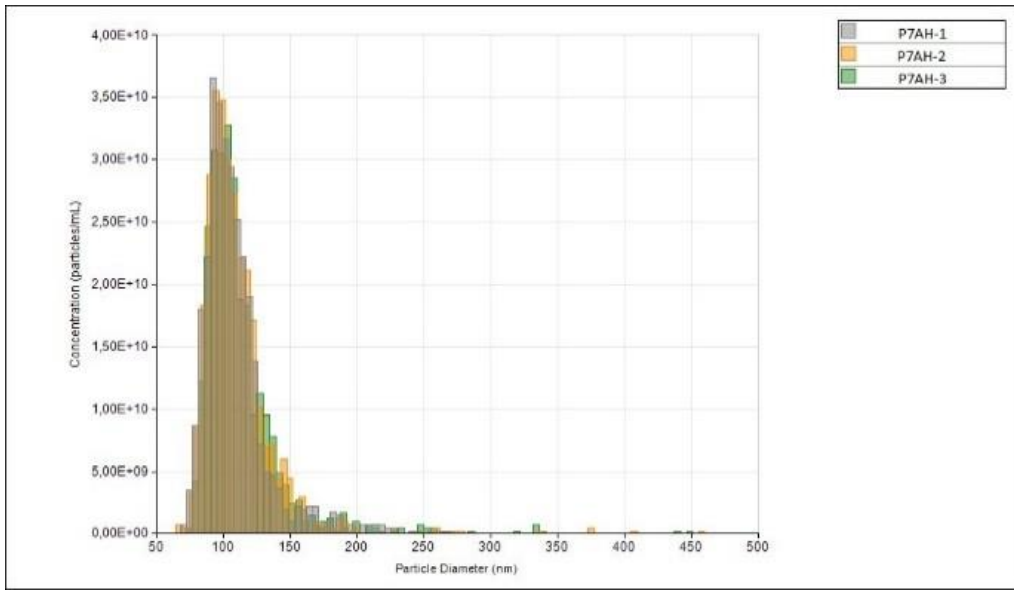












ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa Influência da hemodiálise no nível sérico de microvesículas em pacientes renais crônicos, sob a responsabilidade do pesquisador Leidy Johana Noguera Gaviria, a qual pretende avaliar o impacto da hemodiálise na concentração de microvesículas no sangue de pacientes submetidos àquele tratamento. Sua participação é voluntária e se dará por meio de coleta de sangue antes e após a realização da sessão de hemodiálise, assim como coleta de dados do seu prontuário (gênero, idade, nefropatia de base, doenças concomitantes, há quanto tempo submete-se a hemodiálise). Os **benefícios** que a pesquisa trará ao (a) Sr. (a) e à população serão potenciais melhorias no procedimento de hemodiálise, proporcionados pelo melhor entendimento do que acontece durante aquele método dialítico. Se o (a) Sr. (a) aceitar participar, estará contribuindo para o conhecimento médico acerca do nível sérico de microvesículas durante o procedimento hemodialítico. Os **riscos** decorrentes de sua participação na pesquisa são aqueles inerentes à coleta de sangue em veia periférica (hemorragia local, infecção), que serão minimizados devido à coleta sob condições estéreis, por profissionais habilitados; não haverá qualquer prejuízo do procedimento hemodialítico agendado, atraso em seu início ou aumento do período de diálise.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Haverá a suspensão da pesquisa caso perceba algum risco/dano à saúde do sujeito participante. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Serão assegurados aos participantes da pesquisa as condições de acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação, conforme o caso, enquanto for necessário. Os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação no estudo, além do direito à assistência integral, têm direito a indenização, conforme itens III.2.h, IV.4.c, V.6 e V.7 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador no endereço SHLS 716 – conjunto E – UTI Térreo – Hospital Santa Luzia, pelo telefone (61) 34456083, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UCB, endereço: QS 07 lote 01 EPCT - Anexo Bloco Central - sala L 002, campus I, horário de funcionamento de segunda a sexta-feira (8h às 13h e 14h às 18h) - telefone: (61) 3356-9784.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

Assinatura do participante

Edmilson Leal Bastos de Moura