JOSÉ TARCÍSIO GIFFONI DE CARVALHO JUNIOR

EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS P-CRESOL E ESPERMIDINA SOBRE O MECANISMO DE APOPTOSE E FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

São Paulo
2009

JOSÉ TARCÍSIO GIFFONI DE CARVALHO JUNIOR

EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS P-CRESOL E ESPERMIDINA SOBRE O MECANISMO DE APOPTOSE E FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Orientador:
Prof. Dr. Miguel Cendoroglo Neto

Co-orientador:
Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni

Coordenadora:
Profa. Dra. Mirian Aparecida Boim

São Paulo
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho Junior, José Tarcísio Giffoni de
Efeito das toxinas urêmicas p-cresol e espermidina sobre o mecanismo de apoptose e função de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) / José Tarcísio Giffoni de Carvalho Junior - São Paulo, 2009.
xi p., 79 p.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Título em Inglês: Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function.

Palavras-chave: Uremia, Toxinas urêmicas, Mecanismos de apoptose e estresse oxidativo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE NEFROLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Agostinho Tavares

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação: Profa. Dra. Mirian Aparecida Boim

JOSÉ TARCÍSIO GIFFONI DE CARVALHO JUNIOR

EFEITO DAS TOXINAS URÊMICAS P-CRESOL E ESPERMIDINA SOBRE O MECANISMO DE APOPTOSE E FUNÇÃO DE NEUTRÓFILOS POLIMORFONUCLEARES (PMN)

Banca examinadora: Profa. Dra. Milena Brunialti

Profa. Dra. Elizabeth Macaraiello

Prof. Dra. Elsa Petry Gonçalves

Suplente: Prof. Dr. Marcelo Costa Batista

"Se as portas da percepção estivessem limpas, tudo apareceria para o homem tal como é: infinito."

Aldous Huxley

Agradecimentos

Em primeiro lugar para minha família: Humberto, Carla, Luigi, Dimas, Daniela, Maria Antônia, Natália, Fabio e, especialmente, para meus pais: José Tarcísio e Sandra pelo apoio e confiança que depositaram em mim.

Para Marla, uma pessoa especial que recentemente entrou em minha vida, trazendo companheirismo e alegria!

Para todos os amigos de Carvalhos: João Paulo, Guilherme, João Carlos, José Geraldo, Juninho, Vinícius, Renato, Rominho, André, João Marcos, Dalton, Ramon, Leandro, Alex, pelos momentos de descontração e companheirismo durante minhas viagens para minha terra natal.

Para os professores que me ajudaram de forma incalculável durante a faculdade com apoio, amizade e ensinamentos, Luis Carlos Picca e Tiago Severo Peixe. Vocês me ajudaram a chegar aqui.

À Cida Dalboni, que considero minha orientadora, pelos ensinamentos científicos e conselhos que me passou nesse período.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Nefrologia: Aline, Marie, Marcos, Glória, Miguelzinho, Renato, Nadia, Gabriel, Ronaldo, Tiago, Pamela, Larissa, Gabriela, Olinda, Adelson, Margarete, Neida, Rodrigo, Sylvia, Pablo, Debora, pela colaboração e amizade.

Aos colegas da Unifesp de outras disciplinas e departamentos: Danilo, Paulo, Frank, Fernando “Negão”, Luciana, Anderson, Renata Picão, Lorena, Eloisa, Tharcila, Laura, Adriana, Kelly, Rachel, Talita, Paula, Karen, Tais Yoko, Fernanda Marquês, Rodrigo, Ana Paula e Charlys. Obrigado pela amizade!

A todos os funcionários da Casa de Diálise, especialmente à enfermeira Silvia Manfredi, pela colaboração que foi fundamental para realização deste trabalho.

Ao Dr. Miguel Cendoroglo Neto, pela orientação neste trabalho e pela oportunidade de presenciar suas idéias geniais.

A todos voluntários que colaboraram neste estudo, entre os quais muitos citados acima. Sem vocês este estudo não seria possível.

À Universidade Federal de São Paulo pela oportunidade oferecida.

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Nefrologia, Departamento de Medicina, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Escola Paulista de Medicina (EPM), com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 06/58224-8).

SUMÁRIO

Agradecimentos v

Lista de Abreviaturas ix

Resumo x

1. Introdução 01

2. Objetivo 06

3. Material e Métodos 08

4. Resultados 20

5. Discussão 23

6. Referências Bibliográficas 44

Anexos: Artigo Submetido 56

Anexos: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa 79

LISTA DE ABREVIATURAS

DRC	Doença Renal Crônica
HD	Hemodiálise
DPAC	Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
S. aureus	*Staphyloccocus aureus*
DCFH	2', 7' – Diclorofluoresceína
DCFH	2', 7' – Diclorofluoresceína Diacetato
IP	Iodeto de Propídeo
PS	Fosfatidil Serina
PMA	4-Forbol 12-Miristato 13-Acetato
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
MAC-1	Molécula de adesão celular Tipo 1
EUTox	The European Uremic Toxin Work Group
Da	Daltons
PKC	Proteína Kinase C
HSP	Heat Shock Proteins
NADPH	Sistema da Nicotinamina Adenina-Dinucleotídeo Fosfato Oxidase

RESUMO

***Introdução**:* As infecções são a segunda causa de mortalidade e a primeira causa de morbidade em pacientes com doença renal crônica (DRC). Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN) de pacientes com DRC apresentam várias alterações funcionais, que incluem menor capacidade na produção de espéceis reativas de oxigênio (ERO), migração celular, além de apresentarem apoptose acelerada. Estas disfunções celulares podem contribuir para as infecções observadas nesses pacientes. A toxicidade de solutos urêmicos representa um dos fatores associados a apoptose e disfunção de PMN de pacientes urêmicos.

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das toxinas urêmicas espermidina e p-cresol em concentrações urêmicas, sobre apoptose e função de PMN de indivíduos sadios e PMN de pacientes com DRC.

***Métodos**:* Avaliamos o efeito da espermidina e do p-cresol sobre a apoptose e seus mecanismos (expressão de CD95, Caspase 3), expressão de integrinas (CD11b) e metabolismo oxidativo (produção espontânea e estimulada de ERO) de PMN de indivíduos sadios e PMN de pacientes com DRC através de Citometria de Fluxo.

***Resultados**:* Não observamos diferenças na taxa de apoptose, apoptose tardia, viabilidade e expressão de CD95 e caspase 3 em PMN de indivíduos sadios incubados com espermidina e p-cresol. Houve uma diminuição na produção de ERO espontânea e estimulada por *S. aureus* e PMA em PMN incubados com espermidina. O p-cresol induziu diminuição na produção de ERO estimulado por PMA. A espermidina e p-cresol diminuíram a expressão de CD11b. Quando avaliamos o efeito da espermidina e do p-cresol sobre PMN de

pacientes com DRC não observamos diferenças em relação a todos os parâmetros avaliados.

***Conclusão**:* Observamos que a espermidina e o p-cresol diminuíram a expressão de CD11b e o metabolismo oxidativo de PMN de indivíduos sadios. É possível que essas toxinas, principalmente a espermidina, possuam efeitos deletérios sobre a imunidade inata na uremia, o que pode contribuir para as maiores taxas de infecções bacterianas nessa população.

INTRODUÇÃO

As infecções são a segunda causa de mortalidade e a primeira causa de morbidade em pacientes urêmicos em hemodiálise (HD) e Diálise Peritonial Ambulatorial Contínua (DPAC) (1-4). Embora nos últimos anos tenha diminuído a incidência de infecções, essas continuam contribuindo para uma menor sobrevida desses pacientes (1).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) são células responsáveis pela defesa de nosso organismo contra infecções bacterianas e fúngicas (1). Durante um processo infeccioso, os PMN eliminam o agente agressor por meio de mecanismos interligados, como a migração para os tecidos, fagocitose e destruição dos microorganismos através de enzimas e produtos do metabolismo oxidativo (1;5).

A migração dos PMN para os tecidos ocorre pela quimioatração destes pelas quimiocinas para o local da injúria, resultando no aumento da expressão de L-selectina em sua superfície, que são responsáveis pelo processo de rolamento dessas células sobre o endotélio (6;7). A firme adesão do PMN ao endotélio é mediada pela interação entre moléculas de adesão, MAC-1 (CD11b/CD18) presente nos PMN e ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) presentes no endotélio (7). Após adesão do PMN ao endotélio, essas células migram para o sítio de infecção ou injúria através da diapedese, onde ocorre a fagocitose do agente invasor. O papel central na destruição de bactérias ingeridas é mediado por uma cadeia de eventos metabólicos que acontecem na membrana celular dos PMN. Após a ingestão de partículas por fagocitose, o sistema da nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)-oxidase é ativado, iniciando uma cascata de reações que leva à produção de espécies reativas de oxigênio, como o superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais de

hidroxila e o hipoclorito (8;9). Esses compostos são extremamente tóxicos para a bactéria e estão diretamente envolvidos na morte de microorganismos. Após esses PMN desempenharem essas funções, os mesmos entram em apoptose e são removidos por fagocitose pelos macrófagos (10;11).

A apoptose é um mecanismo controlado de morte celular envolvido na regulação da homeostase de tecidos, que pode ser iniciada por duas vias principais: a via extrínseca, que é desencadeada pela ativação de receptores de membrana, por exemplo CD95/Apo1 (principal via de apoptose de PMN), e a via intrínseca, iniciada a partir da liberação do citocromo C da mitocôndria (12). No entanto, ambas vias de ativação da apoptose convergem à sinalização em uma única via, que resulta na ativação de uma família de enzimas denominadas de caspases (13). A ativação das caspases é um mecanismo central para a execução da apoptose. As caspases são divididas em caspases iniciadoras e caspases efetoras. As caspases iniciadoras (por ex: caspase-8 e a caspase-9) clivam pró-formas inativas de caspases efetoras (por ex: caspase-3 e a caspase-7), ativando-as. Estas, por sua vez, clivam outros substratos protéicos da célula, resultando no processo apoptótico, que inclui a diminuição do tamanho celular e do núcleo, membrana plasmática íntegra, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (13;14).

O processo de apoptose celular está envolvido em várias patologias, incluindo a DRC. De fato, vários estudos relatam que leucócitos de pacientes urêmicos apresentam uma maior taxa de apoptose quando comparada a indivíduos sadios (15-17). Além disso, PMN de pacientes com DRC apresentam menor capacidade em destruir microorganismos (18-20) e essa disfunção está associada ao processo de morte acelerada por apoptose (13,14).

A terapia dialítica *per se* (21-24) e a toxicidade de solutos urêmicos (25-28) representam os principais fatores de risco associados à apoptose e disfunção de PMN de pacientes urêmicos.

Baseado em publicações até 2007, mais de 100 solutos foram classificados como toxinas urêmicas pelo grupo europeu *'The European Uremic Toxin Work Group* (EUTox). As toxinas urêmicas podem ser classificadas de acordo com suas características físico-químicas em: 1) Moléculas pequenas solúveis em água (p. ex.: uréia e creatinina); 2) moléculas médias (p. ex.: PTH e fator D do complemento) e 3) compostos ligados a proteínas (p. ex.: poliaminas e p-cresol) (29-33).

As poliaminas são cátions orgânicos, sendo as mais conhecidas a espermidina, espermina, putrescina e cadaverina. São derivadas do metabolismo bacteriano dos aminoácidos ornitina e metionina (34;35). Essas substâncias apresentam uma distribuição predominantemente intracelular e grande afinidade por proteínas e têm um papel fundamental no crescimento celular normal (36;37).

O p-cresol é produzido por bactérias intestinais, como resultado da metabolização da tirosina, ácido fenilacético e fenilalanina, tendo sua excreção pela via renal (38). Essa toxina urêmica apresenta uma baixa depuração pelos métodos dialíticos por ser um composto lipossolúvel e ligado às proteínas (39-41). Recentemente, foi relatado que o p-cresol circula em grande quantidade na forma conjugada, o p-cresilsulfato (42;43).

Vários estudos na literatura relatam que essas toxinas, entre outras, são responsáveis pela disfunção dos PMN de pacientes com DRC. De fato, Ferrante demonstrou que a espermidina inibiu a migração de PMN *in vitro*.

Além disso, outros estudos relataram que o metabolismo oxidativo de PMN estava deprimido quando essas células foram incubadas com a espermidina (44;45). Em relação ao p-cresol, alguns estudos demonstraram que essa toxina deprime o metabolismo oxidativo de PMN (46;47). Além disso, Dou *et al*, em experimento realizado *in vitro,* observaram que o p-cresol na concentração urêmica inibiu a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, o que sugere que essa toxina iniba a migração de leucócitos para o sitio de infecção, contribuindo para o padrão disfuncional observado no sistema imune dos pacientes urêmicos (40). Consistente a esses achados, há trabalhos na literatura que observaram que o p-cresol se relaciona com a taxa de morbidade por infecções em pacientes em hemodiálise (48; 49).

Em estudo anterior realizado por nosso grupo (50), investigamos treze toxinas urêmicas (Uréia, Creatinina, p-Cresol, Fenol, Ácido Hipúrico, Indoxil Sulfato, Ubiquitina, Espermina, Espermidina, PTH, Angiogenina, Fator D do Complemento e a β2 – Microglobulina), descritas como possíveis responsáveis pela disfunção de PMN na uremia. Nossa hipótese era de que algumas dessas toxinas poderiam induzir apoptose acelerada, que, por sua vez, seriam responsáveis pela disfunção dos PMN. As toxinas que apresentaram maior efeito sobre os PMN foram à espermina e a espermidina, levando a um aumento na taxa de apoptose dessas células. O p-cresol levou a uma diminuição da taxa de viabilidade e o fenol alterou a fagocitose e o metabolismo oxidativo. Porém, quando realizamos este estudo, as doses utilizadas para a Espermidina e p-Cresol foram diferentes das preconizadas atualmente pelo EuTox, que determina as concentrações médias de toxinas urêmicas encontradas em plasma de pacientes com DRC.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito das toxinas urêmicas espermidina e p-cresol, em concentrações urêmicas (preconizados pelo EUTox), sobre PMN de indivíduos sadios e PMN de pacientes com DRC em relação à apoptose e seus mecanismos (expressão de CD95, Caspase 3), expressão de integrinas (CD11b) e metabolismo oxidativo (produção espontânea e estimulada de ERO).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 25 indivíduos sadios com idade > 18 anos e cinco pacientes em tratamento pré-dialítico com clearance de creatinina entre 15 e 30 mL/min/1,72 mm^2. Todos foram selecionados do Ambulatório de Uremia - Fundação Oswaldo Ramos/Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos saudáveis e pacientes portadores de Hepatite B e/ou C, infecção pelo HIV, em tratamento imunossupressor (quimioterápicos ou corticóides), portadores de neoplasias, infecção recente (<1 mês), doença reumatológica em atividade (Lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide) e gestantes.

Todos os indivíduos foram admitidos no estudo após ler e assinar o termo de consentimento informado, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP.

Foi coletada uma amostra de 30 ml de sangue periférico dos indivíduos previamente orientados a comparecer em jejum. 20 mL foram colocados em tubo estéril contendo 20 UI de heparina e 10 mL em tubo sem anticoagulante, para posterior retirada do soro. A coleta do sangue foi realizada pela equipe de enfermagem das unidades de diálise, da Fundação Oswaldo Ramos

Isolamento de Leucócitos Polimorfonucleares do Sangue Periférico

Com a finalidade de remover agentes indutores de espécies reativas de oxigênio e morte celular, todos os reagentes como água, meio de cultura (RPMI), NaCl 0,2; 0,9 e 1,6%, EDTA 3mM e Dextran 3%, foram submetidos à

ultra-filtração utilizando-se uma membrana de acetato de celulose de 0.22 µm (Corning-Costar, NY, USA).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) foram isolados através de centrifugação, em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA) como descrito: foram adicionados no tubo de 50 mL, 20 mL de sangue com anticoagulante e 20 mL de NaCl 0,9%. Após a homogeneização desta mistura, acrescentou-se 10 mL de Ficoll-Hypaque. Este tubo foi centrifugado por 45 minutos a 500 g em temperatura ambiente. Após centrifugação, as camadas contendo células mononucleares, Ficoll-Hypaque e plasma foram desprezadas. No fundo do tubo ficou uma camada com eritrócitos e PMN. Foi adicionado 25 mL de solução tampão fosfato (PBS - Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e 25 mL de Dextran 3% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Essa mistura foi homogeneizada lentamente e deixada em repouso por 20 minutos, para a sedimentação dos eritrócitos. Após este período a camada superior contendo PMN foi transferida para outro tubo de 50 mL, onde o volume foi completado com PBS para 50 mL e centrifugados a 500 g, por 10 minutos e com temperatura de 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e realizado lise hipotônica com a finalidade de remoção dos eritrócitos. Para isso, foram adicionados 20 mL de NaCl 0,2% por 30 segundos e em seguida adicionado 20 mL de NaCl 1,6%. Esse ciclo foi repetido por mais duas vezes, sendo que após a última centrifugação obtivemos uma camada isolada de PMN. Essas células foram ressuspensas em PBS e uma alíquota de 25 µL foi retirada para a contagem de células e viabilidade utilizando-se 75 µL de azul de Tripan (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) em câmara de hemocitometria (câmara de Neubauer). Após a contagem dos PMN, foram

ressuspensos em volume adequado para obter uma concentração de 5 milhões de células/mL.

Incubação dos Leucócitos Polimorfonucleares com as Toxinas Urêmicas

Os PMN foram distribuídos em quatro tubos de 12 x 75 mm com concentração de 5 x 10^6 células/mL por tubo. Foi adicionado para cada tubo 50% de soro autólogo e 50% de meio de cultura RPMI-1640 (pH 7.4, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 10 mmol/L de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, NY, USA), 10 mmol/L de L-Glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomycina (Gibco, BRL, Life Technologies, TM, USA). Os tubos foram incubados por 10 minutos e 24 horas a 37°C com 5% de CO_2 com 40,70 mg/mL de P-cresol e 0,19 mg/mL de Espermidina (Toxinas urêmicas na concentração encontrada em pacientes com Doença Renal Crônica, descrita na última revisão do EuTox (European Uremic Toxin Work Group) (Vanholder, 2007), 20 µM de Camptotecina (controle positivo para apoptose) e somente com RPMI (controle) (Quadro 1).

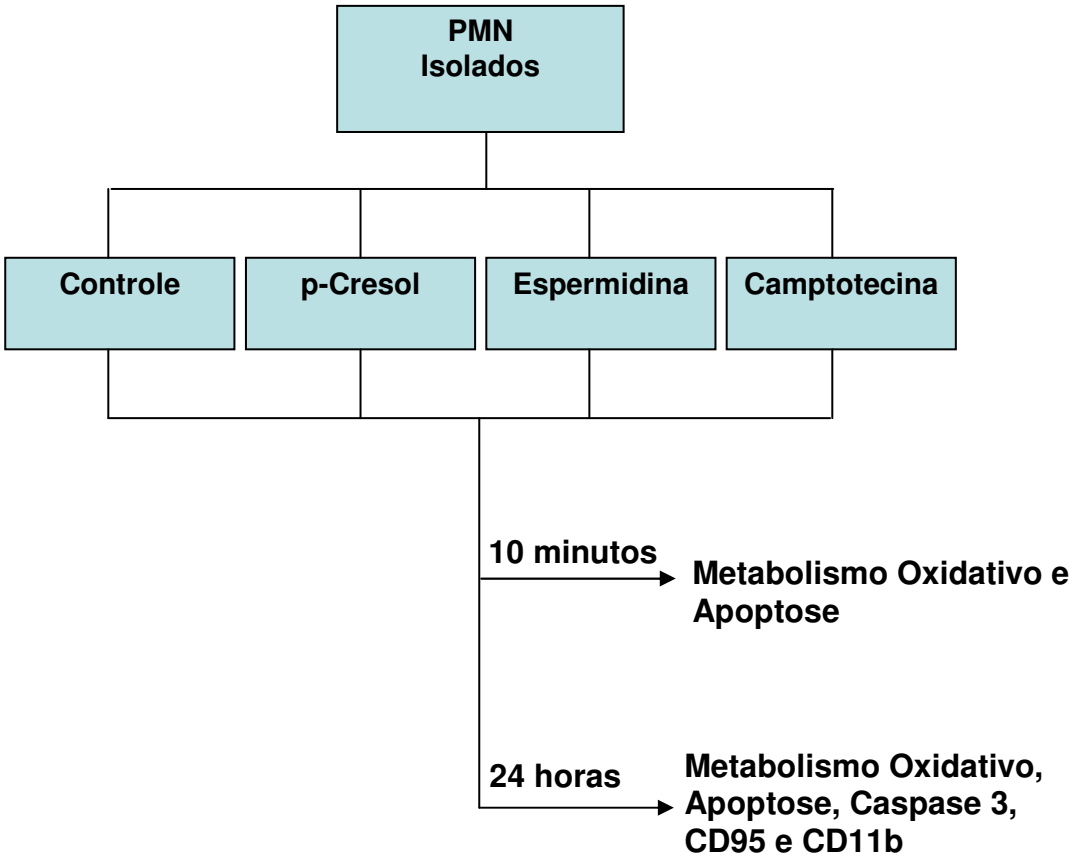
QUADRO 1: Incubação das toxinas com PMN

TUBO	PMN	RPMI	SORO	P-cresol	Espermidina	Camptotecin
1	5 x 10^6	500 µL	500 µL	---	---	---
2	5 x 10^6	450 µL	450 µL	100 µL	---	---
3	5 x 10^6	450 µL	450 µL	---	100 µL	---
4	5 x 10^6	450 µL	450 µL	---	---	100 µL

Foram adicionados 100 µL das soluções estoques dez vezes concentrada (p-cresol – 407,0 mg/mL, espermidina – 1,9 mg/mL e Camptotecina - 200 µM)

As toxinas e camptotecina foram compradas da marca Sigma (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Após 10 minutos de incubação, uma alíquota de cada condição foi retirada, centrifugada por 10 minutos a 500 g, com temperatura de 4ºC. Em seguida, foram lavadas por duas vezes com PBS e foram realizados os ensaios de apoptose e metabolismo oxidativo. Os tubos remanescentes permaneceram incubados por 24 horas e foram processados da mesma forma que as alíquotas de 10 minutos de incubação. Acrescentando-se para cada condição a expressão de CD95, CD11b e detecção de Caspase-3 (Figura 1).

FIGURA 1: Desenho do estudo



Apoptose de PMN

A taxa de apoptose para cada condição descrita acima foi realizada através do Kit Anexina V-FITC (Kit I Annexin V-FITC Apoptosis Detection, Pharmingem, Bencton Dickinson Company) (Quadro 2).

QUADRO 2

TUBO	CÉLULAS	ANEXINA V	IODETO DE PROPÍDEO	TAMPÃO DE ANEXINA
Controle	$2x10^5$	--	--	400 µl
Controle	$2x10^5$	5 µl	--	400 µl
Controle	$2x10^5$	--	5 µl	400 µl
Controle	$2x10^5$	5 µl	5 µl	400 µl
P-cresol	$2x10^5$	5 µl	5 µl	400 µl
Espermidina	$2x10^5$	5 µl	5 µl	400 µl
Camptotecina	$2x10^5$	5 µl	5 µl	400 µl

Os tubos foram incubados por 20 minutos no escuro e imediatamente após a incubação foi realizada a leitura em Citômetro de Fluxo Multiparâmetros (BD FACSCanto, San Jose, CA, USA), onde foram adquiridos 10.000 eventos num gráfico de *dot plot* para cada situação. Utilizamos os canais de fluorescência FL-1 para a anexina V-FITC, e FL-2 para o iodeto de propídeo (IP). Antes de iniciar a leitura das amostras, foi realizada uma compensação dos comprimentos de ondas dos diferentes detectores de cores com amostras não marcadas, amostras marcadas com IP, que correspondiam as células apoptóticas com membrana celular intacta; outras positivas para os dois marcadores (IP e Anexina), sendo estas as células em apoptose tardia e com a integridade da membrana celular perdida; as células coradas apenas com IP foram consideradas necróticas e aquelas que não foram marcadas pela

anexina e nem pelo IP eram as células viáveis. Os resultados foram apresentados em porcentagem de células viáveis, células em apoptose e células em necrose.

Metabolismo Oxidativo de PMN

O metabolismo oxidativo foi estudado através da produção das espécies reativas de oxigênio (ERO). Para isso, utilizamos o reagente 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA, Sigma, St. Louis, MO, USA). Esse reagente possui a propriedade de penetrar rapidamente nas células por difusão. Uma vez no espaço intracelular, reage com ERO gerado pelo metabolismo oxidativo intracelular formando o DCFH (2', 7'-diclorofluoresceína), que é um componente fluorescente e impermeável à membrana celular. No citômetro de fluxo, a luz emitida por esse composto é captada pelo canal de fluorescência respectivo ao comprimento de onda de 525 a 550 nm. Nos ensaios, foram medidas a produção de ERO espontânea (sem estímulo) e após estímulo por 4-forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma, St. Louis, MO, USA) e *S. aureus* (Cepa ATCC-25923, Difco, Detroit, MI). As amostras foram preparadas conforme o Quadro 3, e sua detecção foi realizada em Citômetro de Fluxo Multiparâmetros através do *software* Facs Diva, da mesma forma foram adquiridos 10.000 eventos após a construção de histogramas onde a produção de ERO foram medidas através da média geométrica de intensidade de fluorescência em FL-1 para todos os tubos estimulados por *S. aureus*, PMA com e sem p-cresol e espermidina subtraída do tubo de produção de ERO do metabolismo oxidativo espontâneo.

QUADRO 3

TUBO	CÉLULAS	DCFH-DA	*S. aureus*	PMA	PBS
Controle					
Espontâneo	5×10^5	200 µL	---	---	800 µL
Estimulado por *S. aureus*	5×10^5	200 µL	100 µL	---	700 µL
Estimulado por PMA	5×10^5	200 µL	100 µL	100 µL	700 µL
p-cresol					
Espontâneo	5×10^5	200 µL	---	---	800 µL
Estimulado por *S. aureus*	5×10^5	200 µL	100 µL	---	700 µL
Estimulado por PMA	5×10^5	200 µL	100 µL	100 µL	700 µL
Espermidina					
Espontâneo	5×10^5	200 µL	---	---	800 µL
Estimulado por *S. aureus*	5×10^5	200 µL	100 µL	---	700 µL
Estimulado por PMA	5×10^5	200 µL	100 µL	100 µL	700 µL

Os tubos foram incubados por 30 minutos, em banho-maria com agitação, à 37ºC. Em seguida foi adicionado a cada tubo, 1 mL de EDTA 3 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA) para parar a reação. Os tubos foram centrifugados novamente, por 10 minutos, a 500 g e com a temperatura de 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 500 µL de EDTA e levado para leitura no citômetro de fluxo.

Expressão de CD95 e CD11b de PMN

Foram retiradas alíquotas de PMN de cada condição de incubação (Controle, P-cresol, Espermidina e Camptotecina) para realização da expressão de CD95 e CD11b. Essas foram incubadas com 10 µL de anticorpo monoclonal CD95 FITC (Pharmingem, Becton Dickinson Company, BD, CA,

USA) e 10 µL CD11b PE (Pharmingem, Becton Dickinson Company, BD, CA, USA) no escuro por 15 minutos sob temperatura ambiente (QUADRO 4). As alíquotas foram lavadas com PBS, centrifugadas, e ressuspensas em 300 µL de Azida+PBS. (Sigma, St. Louis, MO, USA) As detecções da expressão destes anticorpos foram quantificadas por Citometria de Fluxo Multiparâmetros, onde foram adquiridos 10.000 eventos num gráfico de *dot plot* para cada situação. Utilizamos os canais de fluorescência FL-1 para a CD95-FITC, e FL-2 para o CD11b-PE. Antes de iniciar a leitura das amostras, foi realizada uma compensação dos comprimentos de ondas dos diferentes detectores de cores com amostras não marcadas, amostras marcadas com CD95-FITC , CD11b-PE. Os resultados foram apresentados através da média geométrica de intensidade de fluorescência em FL-1 e FL-2 para todos os respectivos tubos e subtraída do tubo não marcado.

QUADRO 4

TUBO	CELS	Anti-CD95-FITC	Anti-CD11b-PE	Tampão
Controle	5×10^5			300µL
Controle	5×10^5	10µL		300µL
Controle	5×10^5		10µL	300µL
Controle	5×10^5	10µL	10µL	300µL
P-cresol	5×10^5	10µL	10µL	300µL
Espermidina	5×10^5	10µL	10µL	300µL
Camptotecina	5×10^5	10µL	10µL	300µL

Expressão intracelular de Caspase-3 de PMN

Para detecção de Caspase-3 foi utilizado o Kit Caspase-3-PE Detection (Pharmingem, Becton Dickinson Company, BD, CA, USA). Os PMN foram lavados por duas vezes com PBS gelado e foi adicionado 500 µL do reagente Cytofix/Cytoperm; estas células foram incubadas por 20 minutos no gelo. Foram centrifugadas e o sobrenadante foi aspirado. Os PMN foram lavados com 1 mL do reagente Perm/Wash (10x diluído) e os anticorpos foram acrescentados segundo o quadro abaixo (QUADRO 5).

QUADRO 5

TUBO	CELS	Anti Caspase3-PE	Tampão
Controle	1 x10^6		100µL
Controle	1 x10^6	10µL	100µL
P-cresol	1 x10^6	10µL	100µL
Espermidina	1 x10^6	10µL	100µL
Camptotecina	1 x10^6	10µL	100µL

Os tubos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, centrifugados e lavados com 1,0 mL de Perm/Wash, em seguida centrifugados novamente e os PMN foram ressuspensos em 500 µL de Perm/Wash e analisados imediantamente no citômetro de fluxo. As detecções da expressão destes anticorpos foram quantificadas pelo software Facs Diva, onde foram adquiridos 10.000 eventos num gráfico de Histograma para cada situação. Utilizamos os canais de fluorescência e FL-2 para o Anti Caspase3-PE. Os resultados foram apresentados através da média geométrica de intensidade de

fluorescência de FL-2 para todos os respectivos tubos e subtraída do tubo não marcado.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *SPSS for Windows*, versão 16.0. Os resultados foram apresentados em porcentagem ou mediana e extremos. Foi utilizada análise de variância não paramétrica Kruskall-Wallis para as comparações entre os grupos. Quando o Kruskall-Wallis demonstrou diferença entre os grupos, o teste Mann Whitney foi aplicado para determinar qual grupo ou grupos eram diferentes dos demais. Foram consideradas significantes as diferenças que resultaram em $p<0,05$.

RESULTADOS

Na população de doadores sadios analisada houve uma discreta prevalência do sexo feminino (14 mulheres e 11 homens), com uma idade média de 29+7 anos de idade. Com respeito à população de pacientes, houve uma discreta prevalência do sexo feminino (3 mulheres e 2 homens), com uma idade média de 59+9 anos de idade.

Quando os PMN de indivíduos sadios foram incubados com as toxinas, não observamos diferenças significantes sobre viabilidade, apoptose e apoptose tardia comparado ao grupo controle após 10 minutos e 24 horas de incubação (Tabela 1). Em relação ao metabolismo oxidativo, somente após 10 minutos, observamos que a Espermidina diminuiu a produção de ERO espontânea e estimulada por *S. aureus* e PMA comparado ao grupo controle. Além disso, o p-cresol diminuiu de forma significante a produção de ERO estimulada por PMA comparado ao grupo controle (Tabela 2). Esses efeitos não foram observados após 24 horas de incubação (Tabela 3).

Observamos que a produção de ERO de PMN de indivíduos sadios foi menor para todas as condições na incubação de 24 horas comparada ao tempo de 10 minutos (Tabela 2 e 3).

A expressão de CD95 e Caspase-3 não foi diferente entre os grupos (Tabela 4). P-cresol e Espermidina diminuíram significantemente a expressão de CD11b comparada ao grupo controle (Tabela 4).

Quando incubamos os PMN de pacientes com as toxinas descritas acima, não observamos efeito dessas toxinas sobre apoptose, viabilidade, apoptose tardia (Tabela 5), produção de ERO espontânea e estimulada por *S. aureus* e PMA (Tabela 6 e 7) e expressão de CD95, CD11b e Caspase 3 (Tabela 8).

Por outro lado, PMN de pacientes incubados por 10 minutos e 24 horas com e sem p-cresol ou espermidina, apresentaram maiores taxas de apoptose quando comparados aos de indivíduos sadios (Tabela 9 e 10).

Observamos que os PMN de pacientes incubados por 10 minutos com e sem toxinas, apresentaram menor produção de ERO quando estimulados por *S. aureus* e PMA comparado aos PMN de indíviduos sadios. (Tabela 11). No tempo de incubação de 24 horas, os PMN dos pacientes apresentaram menor produção de ERO somente com o estímulo por PMA (Tabela 12).

PMN de pacientes apresentaram maior expressão de CD95, CD11b e caspase 3 com e sem toxinas comparados aos PMN de indivíduos sadios (Tabela 13).

Discussão

Pacientes com doença renal crônica apresentam infecções bacterianas como importante causa de morbidade e mortalidade (3;4). É possível que fatores solúveis presentes no plasma de pacientes urêmicos induzam à apoptose e disfunção de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), que por sua vez contribuam para o padrão de imunossupressão observado na uremia (17). De fato, o estudo da imunodeficiência na uremia tem levado em conta basicamente dois fatores: a bioincompatibilidade das membranas de diálise (15;21) e a toxicidade de solutos urêmicos (51;52). A partir da hipótese de que esses fatores participam da fisiopatologia da imunodeficiência na uremia, iniciaram-se novos estudos com o propósito de investigar a sua associação com desencadeamento do processo de morte celular programada ou apoptose de PMN (21;53-55).

Em estudo anterior realizado por nosso grupo (50), investigamos 13 toxinas urêmicas (Uréia, Creatinina, p-Cresol, Fenol, Ácido Hipúrico, Indoxil Sulfato, Ubiquitina, Espermina, Espermidina, PTH, Angiogenina, Fator D do Complemento e a β2 – Microglobulina) descritas como possíveis responsáveis pela disfunção de PMN na uremia. Nossa hipótese era que algumas dessas toxinas poderiam induzir apoptose acelerada, que por sua vez, seria responsável pela disfunção dos PMN. As toxinas que apresentaram maior efeito sobre os PMN foram a espermina e a espermidina, levando a um aumento na taxa de apoptose dessas células. O p-cresol levou a uma diminuição da taxa de viabilidade e o fenol alterou a fagocitose e o metabolismo oxidativo. O presente estudo avaliou o efeito das toxinas urêmicas espermidina e p-cresol sobre PMN de indivíduos sadios e PMN de pacientes com DRC em relação a apoptose e seus mecanismos (CD95 e Caspase 3),

expressão de integrinas (CD11b) e metabolismo oxidativo (produção espontânea e estimulada de ERO).

Não observamos efeito significante da espermidina e p-cresol sobre a taxa de apoptose, viabilidade e sobre o mecanismo de apoptose em PMN de indivíduos sadios. Cabe aqui ressaltar que utilizamos espermidina na concentração de 0.19 µg/mL e o p-cresol na concentação de 40.70 µg/mL, ou seja, a concentração urêmica recomendada atualmente pelo Eutox (56). Embora nossos resultados atuais sejam consistentes com a literatura, outros estudos observaram efeitos pró-apoptoticos quando essas toxinas foram empregadas em doses mais elevadas, como relatado em nosso estudo anterior, no qual utilizamos para espermidina a concentração de 100 µg/mL, o que equivale a uma concentração 526 vezes maior do que a dose urêmica utilizada no presente estudo (0.19 µg/mL), e para o p-cresol uma concentração de 30 µg/mL, que é 1,35 vezes menor que a concentração utilizada no presente estudo (40.70 µg/mL) (57-59). De fato, Stefanelli *et al* observaram que a espermina em altas concentrações (10-100 µM) induziu a ativação da caspase 3 em células leucêmicas, mas esses efeitos foram observados com doses acima daquelas encontradas no soro de paciente urêmico. Cabe ressaltar que nosso estudo é o primeiro a investigar o efeito de uma poliamina (espermidina) em nível urêmico sobre a apoptose de PMN de sangue periférico (58).

Neste estudo, PMN de sangue periférico não apresentaram aumento da apoptose ou perda da viabilidade quando incubadas com p-cresol em níveis urêmicos. Dou *et al* observaram que a incubação por 24 horas com p-cresol na dose urêmica não induziu apoptose em células endoteliais *in vitro* (40). Embora não tenhamos observado efeito *in vitro* da espermidina e do p-cresol sobre

PMN, não podemos descartar a hipótese de que essas toxinas apresentem efeito sobre a apoptose *in vivo.* É possível que no ambiente urêmico, essas toxinas interajam com outras toxinas, com efeitos aditivos ou antagônicos, resultando no fenótipo observado de apoptose acelerada de PMN nos pacientes urêmicos. De fato, no presente estudo observamos que PMN de pacientes com DRC apresentaram maiores taxas de apoptose, apoptose tardia, queda na viabilidade, maior expressão de CD95 e caspase 3, comparado às PMN de indivíduos sadios. Esses resultados são consistentes com o estudo de Cendoroglo *et al.*, que apresentaram evidências de que PMN de pacientes urêmicos estão em processo acelerado de apoptose, assim como PMN de indivíduos sadios incubados com plasma urêmico, o que poderia contribuir para a disfunção dessas células (17). Além disso, outros estudos demonstraram que os PMN na uremia são altamente suscetíveis a morte celular, pela expressão do receptor CD95, acompanhado pela expressão de caspases reguladoras (8,9 e 10) e efetoras (caspase 3, 6 e 7), sugerindo que esse processo pode ser o principal regulador da apoptose nessas células (60-63).

Estudos relatam que após estímulo (toxinas urêmicas e bioincompatibilidade na uremia) a produção de ERO pode induzir à apoptose (64). O mecanismo pelo qual ocorre esse processo está associado à oxidação da cardiolipina, um fosfolipideo de membrana mitocôndrial interna, que em condições normais ancora o citocromo c na membrana interna mitocondrial (65). Quando a cardiolipina é oxidada pela produção de ERO, o citocromo c é liberado no espaço mitocondrial. Porém, para a migração do citocromo c para o citoplasma é necessário a permeabilização da membrana mitocôndrial pela Bax, um membro pró-apoptótico da família da Bcl-2 (65-67). Uma vez que o

citocromo c migra para o citoplasma, este se complexa com a Apaf-1, uma proteína citosólica. Esse complexo recruta a caspase 9, que por sua vez, recruta a caspase 3 desencadeando o processo apoptótico (66,68,69). Assim, é possível que o estresse oxidativo seja um dos fatores associados à apoptose acelerada de PMN na uremia (64).

Vários estudos relatam que a uremia também é acompanhada pela disfunção de leucócitos na produção de ERO, apresentando menor resposta a estímulos como PMA ou fMLP comparado a PMN de indivíduos sadios (53,64,70). No presente estudo, observamos que os PMN de indivíduos sadios expostos à espermidina com e sem estímulo, e com p-cresol estimulado por PMA apresentaram redução na produção de ERO após 10 minutos de incubação. Nossos resultados sugerem que há um comprometimento na ativação da Proteína Kinase C (PKC) desde que houve inibição na resposta ao PMA. Embora também tenha havido inibição da resposta ao *S. aureus* (com espermidina), não é possível afirmar que houve comprometimento da ativação de receptores de membrana, uma vez que a via da PKC estava sabidamente comprometida (46). Consistente com nossos resultados, Ogata *et al* observaram *in vitro* que a produção de superóxido em PMN após estímulo por fMLP também estava deprimida quando essas células foram incubadas com a espermidina por 10 minutos (45). Shepers *et al* também observaram uma redução no metabolismo oxidativo estimulado com PMA, fMLP e *E. coli* de PMN incubados com p-cresol por 10 minutos, mas não sobre a produção espontânea de ERO (47). Esses resultados sugerem que essas toxinas podem atuar sobre a via da PKC ou da NADPH oxidase, inibindo sua ativação e resultando na diminuição na produção de ERO (46). De fato, Ogata *et al*, em

outro estudo, observaram que a espermina inibiu a atividade da NADPH oxidase em PMN de indivíduos sadios (44).

Em relação à incubação por 24 horas, não observamos efeito das toxinas sobre a produção de ERO de PMN. No entanto, observamos que os PMN após 24 horas apresentaram menor capacidade em produzir ERO frente a um segundo estímulo comparados à incubação de 10 minutos. Dentre os leucócitos, demonstra-se *in vivo* e *in vitro* que os PMN maduros são os que têm menor tempo de vida média (12 horas) (60). Assim, ao se iniciar o processo de apoptose, os PMN apresentam um declínio de suas funções (71-74). De fato, observamos que houve queda na viabilidade e aumento na apoptose tardia em PMN incubados por 24 horas comparado a 10 minutos, independente do efeito das toxinas, o que pode justificar a menor produção de ERO na incubação de 24 horas em todas as condições.

Outro aspecto do comprometimento imunológico relatado na uremia é a diminuição na capacidade de migração celular para os sítios de infecção (51,75). Em nosso estudo, observamos que a espermidina e o p-cresol diminuíram a expressão de CD11b em PMN de indivíduos sadios após 24 horas de incubação. De fato, há vários trabalhos na literatura que observaram a diminuição da expressão de V-CAM-1 e I-CAM em cultura de células endoteliais expostas ao p-cresol após 24 horas (6,40). Quando estudamos a expressão de CD11b em PMN de pacientes com DRC, observamos maior expressão comparada a PMN de indivíduos sadios. Consistente com nossos resultados, há trabalhos na literatura que também demonstraram que PMN de pacientes com DRC apresentaram maior expressão de CD11b comparado a indivíduos sadios (76). Dessa forma, observamos *in vitro* que essas toxinas

inibiram a expressão de CD11b, porém observamos que ocorre maior expressão desta molécula na uremia. É importante ressaltar que o soro urêmico é formado por um grande número de toxinas urêmicas. Assim, é possível que ocorra uma interação entre várias toxinas na uremia, resultando no fenótipo de maior expressão de CD11b *in vivo*, embora o p-cresol e a espermidina isoladamente tenham inibido a expressão dessa molécula de adesão.

Poucos trabalhos descreveram a influência de toxinas urêmicas sobre leucócitos de indivíduos com DRC em tratamento conservador, hemodiálise (HD) ou diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC). Em nosso estudo, não observamos efeito da adição de espermidina e do p-cresol sobre PMN de pacientes urêmicos, embora tenhamos observado efeitos dessas toxinas sobre a expressão de CD11b e no metabolismo oxidativo de PMN de indivíduos sadios. É possível que a exposição contínua dos PMN ao plasma urêmico possa causar inibição na expressão de receptores e mecanismos intracelulares que essas toxinas podem atuar, resultando na sobrevida ou seleção de populações de células com fenótipo de resistência ao efeito dessas toxinas. Consistente com a idéia de resistência induzida, Cohen *et al* observaram que o ácido hipurico diminuiu a apoptose de PMN de indivíduos sadios, porém não observaram efeito dessa toxina sobre PMN de pacientes com DRC em HD (52).

Há trabalhos na literatura que relatam o desenvolvimento de mecanismos de proteção ou adaptação celular em linhagens celulares da medula renal interna (77,78). Em um desses estudos, foi relatado que as *heat shock proteins* (HSP) aumentam a sobrevida dessas células durante situação de estresse e

permitem a recuperação celular (78). No entanto, não há relatos na literatura sobre a expressão de HSP em leucócitos na uremia. Assim, é possível que PMN de pacientes urêmicos também apresentem mecanismos de proteção e ou adaptação celular (HSP) durante uma situação de estresse como ocorre em relação à toxicidade de solutos urêmicos e bioincompatibilidade de membranas de diálise. Baseados nisso, novos estudos devem ser conduzidos para investigar a resistência e adaptação celular na uremia.

Em resumo, observamos que a espermidina e o p-cresol diminuíram a expressão de CD11b e o metabolismo oxidativo de PMN de indivíduos sadios. É possível que essas toxinas, principalmente a espermidina, possuam efeitos deletérios sobre a imunidade inata na uremia, o que pode contribuir para as maiores taxas de infecções bacterianas nessa população. Baseados nisso, novos estudos devem ser conduzidos para elucidar uma forma de bloquear o efeito desses compostos, seja através do uso de quelantes que atuam sequestrando toxinas e seus precursores no intestino ou por meio de novas terapias de diálise com melhor capacidade de remoção de toxinas urêmicas.

Tabela 1: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a viabilidade, apoptose e apoptose tardia em PMN de indivíduos sadios após 10 minutos e 24 horas de incubação (n = 25)

	Tempo	Controle	P-cresol	Espermidina	camptotecina	p*	p†
Viabilidade (%)	*10 min*	80 (76 - 87)	80 (55 - 88)	81 (75 - 89)	54* (39 - 69)	0,02	-
	24 hs	54† (40,8 - 75,1)	48† (27,6 - 81,8)	55† (20,1 - 79)	3,6*† (1 - 18)	0,001	<0,001
Apoptose (%)	*10 min*	15 (11 - 20)	17 (11 - 31)	15 (10 - 22)	36 (12 - 54)	0,04	-
	24 hs	19 (8 - 32)	24 (9 - 33)	21 (9 - 28)	48*† (26 - 71)	0,009	0,01
A. Tardia (%)	*10 min*	2,4 (0,8 - 3)	2,4 (0,7 - 3)	2,9 (0,6 - 4)	12,3* (7 - 31)	0,002	-
	24 hs	25† (6 - 31,6)	21† (6 - 33)	15 † (6 - 42)	89*† (18 - 98)	0,001	<0,001

* = diferente dos demais grupos no mesmo tempo de incubação.
† = diferente comparado ao tempo de 10 minutos
N.S = Não significante
\- = Não se aplica

Tabela 2: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a produção de ERO espontânea e estimulada por *S.aureus* e PMA em PMN de indivíduos sadios após 10 minutos (n = 25)

	Controle	P-cresol	Espermidina	p†	p•	p*
Produção de ERO (MIF)						
Espontânea	1135 (769 - 2400)	1009 (489 - 2855)	679† (210 - 1580)	0,001	-	-
Estimulado por						
S. aureus	5357• (2397 - 8417)	5222• (1567 - 7062)	3168†• (2198 - 5758)	0,01	<0,001	-
Razão *S. aureus* / espontâneo	4,7 (1,1 – 7,3)	5,1 (1,9 – 9,3)	4,7 (1,1 – 6,1)	N.S	-	-
PMA	8723• (3900 - 9922)	6124*• (2073 - 9382)	6384*• (1002 - 9237)	-	<0,001	0,007
Razão PMA/ espontâneo	7,7 (3,1 – 12)	6 (1,5 – 12)	9,4† (3 – 15)	0,01	-	-

† = Diferente dos demais grupos
• = Diferente da produção de ERO Espontâneo
* = Diferente do controle
MIF = Média da Intensidade de Fluorescência
N.S = Não Significante
- = Não se Aplica

Tabela 3: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a produção de ERO espontânea e estimulada por *S.aureus* e PMA em PMN de indivíduos sadios após 24 horas (n = 25)

	Controle	P-cresol	Espermidina	p•
Produção de ERO (MIF)				
Espontânea	952 (370 - 1609)	840 (332 - 2765	966 (291 - 2565)	-
Estimulado por				
S. aureus	1998• (532 - 5034)	1795• (526 - 6628)	2022• (513 - 4805)	<0,001
Razão *S. aureus* / espontâneo	2 (1,1 – 5,8)	2,1 (0,9 – 5,9)	2,1 (1,1 – 6,1)	N.S
PMA	2150• (400 - 6331)	2139• (635 - 6978)	2368• (362 - 7263)	<0,001
Razão PMA/ espontâneo	2,25 (1 – 5,7)	2,5 (1 – 5,4)	2,5 (1 – 7,6)	N.S

• = Diferente da produção de ERO Espontâneo
MIF = Média da Intensidade de Fluorescência
N.S = Não Significante
- = Não se Aplica

Tabela 4: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a expressão de CD95, CD11b (n = 25) e Caspase 3 (n = 25) em PMN de indivíduos sadios

	Controle	P-cresol	Espermidina	Camptotecin	p*	p•
CD95 (MIF)	196 (64 -388)	221 (69 - 456)	194 (93 - 426)	1035* (1205 - 3900)	0,001	-
CD11b (MIF)	5143 (3178 -7689)	3760• (1459 - 6359)	3435• (2386 - 6089)	-	-	0,04
Caspase 3 (MIF)	116 (92 - 139)	112 (81 - 147)	112 (80 - 140)	190* (94 - 334)	0,01	-

* = diferente dos demais grupos
• = diferente do grupo controle
MIF = Média da Intensidade de Fluorescência
- .= Não se Aplica

Tabela 5: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a viabilidade, apoptose e apoptose tardia em PMN de Pacientes com DRC em tratamento conservador após 10 minutos e 24 horas de incubação (n = 5)

	Tempo	Controle	P-cresol	Espermidina	p	p†
Viabilidade (%)	*10 min*	73 (66 – 76)	75 (28 – 85)	73 (33 – 79)	N.S.	-
	24 hs	44† (33 – 46)	37† (34 – 63)	44† (26 – 64)	N.S.	0,03
Apoptose (%)	*10 min*	24 (15 – 28)	22 (15 – 38)	24 (19 – 40)	N.S.	-
	24 hs	31 (19 – 36)	42 (25 – 57)	38 (26 – 42)	N.S.	N.S.
A. Tardia (%)	*10 min*	2,5 (1,3 – 4)	2,3 (1,2 – 3,4)	2,1 (1,1 – 3,3)	N.S.	-
	24 hs	23† (12 – 36)	18† (15 – 23)	21† (16 – 43)	N.S.	0,03

N.S. = Não Significante
† = diferente comparado ao tempo de 10 minutos

Tabela 6: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a produção de ERO espontânea e estimulada por *S.aureus* e PMA em PMN de Pacientes com DRC em tratamento conservador após 10 minutos de incubação (n = 5)

	Controle	P-cresol	Espermidina	p
Produção de ERO (MIF)				
Espontânea	898 (500 – 1210)	810 (570 – 1240)	650 (390 – 1290)	N.S.
Estimulado por:				
S. aureus	4270 (1870 – 4660)	3430 (1190 – 4400)	2520 (1320 – 3040)	N.S.
Razão *S. aureus* / espontâneo	4,7 (2,4 - 5,6)	4,2 (1,7 - 6,2)	3,8 (2,3 - 5,2)	N.S.
PMA	5570 (4160 – 6370)	4560 (1070 – 6270)	5750 (990 - 6560)	N.S.
Razão *PMA*/ espontâneo	6,2 (3,4 - 8,2)	5,6 (3,5 - 7)	8,8† (5 - 9,1)	0,05

† = Diferente dos demais grupos
MIF = Média da Intensidade de Fluorescência
N.S = Não Significante

Tabela 7: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a produção de ERO espontânea e estimulada por *S.aureus* e PMA em PMN de Pacientes com DRC em tratamento conservador após 24 horas de incubação (n = 5)

	Controle	P-cresol	Espermidina	p
Produção de ERO (MIF)				
Espontânea	1160 (590 – 1910)	1480 (560 – 1880)	1200 (380 – 1500)	N.S.
Estimulado por:				
S. aureus	2230 (1800 – 3280)	1770 (1340 – 3100)	2460 (1410 – 3030)	N.S.
Razão *S. aureus* / espontâneo	1,9 (1,7 – 3,1)	1,5 (1 – 2,5)	2 (1,7 – 5,7)	N.S.
PMA	3160 (1990 - 4890)	2310 (1480 – 6050)	2920 (1130 - 5790)	N.S.
Razão PMA/ espontâneo	2,7 (1,5 – 4,6)	1,8 (0,9 - 3)	2,4 (1,6 – 5)	N.S

MIF = Média da Intensidade de Fluorescência
N.S = Não Significante

Tabela 8: Efeito do P-cresol e Espermidina sobre a expressão de CD95, CD11b e Caspase 3 em PMN de pacientes com DRC em tratamento conservador (n = 5)

	Controle	P-cresol	Espermidina	p
CD95 (MIF)	416 (380 – 504)	406 (300 – 432)	436 (292 – 505)	N.S.
CD11b (MIF)	7044 (6690 – 9730)	6349 (4260 – 7340)	6645 (5290 - 7590)	N.S.
Caspase 3 (MIF)	136 (118 - 168)	138 (117 - 188)	127 (118 - 130)	N.S.

MIF = Média da Intensidade de Fluorescência
N.S.= Não Significante

Tabela 9: Comparação da Viabilidade, Apoptose e Apoptose Tardia entre PMN de indivíduos sadios e pacientes (10 minutos)

		Sadio	Paciente	p
Viabilidade (%)				
	RPMI	85 (80 – 86)	73 (66 – 76)	0,21
	P-cresol	83 (54 – 88)	75 (48 – 85)	0,40
	Espermidina	86 (76 – 89)	73 (43 – 79)	0,25
Apoptose (%)				
	RPMI	12 (10 – 14)	24 (15 – 28)	0,02
	P-cresol	14 (11 – 16)	22 (15 – 38)	0,02
	Espermidina	12 (10 – 17)	24 (19 – 40	0,01
A. Tardia (%)				
	RPMI	1,5 (0,8 – 2,2)	2,5 (1,3 – 4)	0,25
	P-cresol	1,8 (0,7 – 2,9)	2,3 (1,2 – 3,4)	0,38
	Espermidina	1,5 (0,6 – 2,2)	2,1 (1,1 – 3,3)	0,25

Tabela 10: Comparação da Viabilidade, Apoptose e Apoptose Tardia entre PMN de indivíduos sadios e pacientes (24 horas)

		Sadio	Paciente	p
Viabilidade (%)				
	RPMI	60 (48 – 70)	44 (33 – 46)	0,02
	P-cresol	66 (30 – 77)	37 (34 – 63)	0,03
	Espermidina	62 (40 – 79)	44 (26 – 64)	0,04
Apoptose (%)				
	RPMI	20 (13 – 29)	31 (19 – 36)	0,02
	P-cresol	22 (11 – 33)	42 (25 – 57)	0,04
	Espermidina	20 (12 – 32)	38 (26 – 42)	0,04
A. Tardia (%)				
	RPMI	14 (6 – 16)	23 (12 – 36)	0,02
	P-cresol	10 (8 – 14)	18 (15 – 23)	0,04
	Espermidina	10 (7 – 13)	21 (16 – 43)	0,03

Tabela 11: Comparação da produção de ERO espontânea e estimulada por *S.aureus* e PMA entre PMN de indivíduos sadios e pacientes (10 minutos)

	Sadio	Paciente	p
Produção de ERO			
Espontânea (MIF)			
RPMI	850 (760 – 1100)	898 (500 – 1210	0,70
P-cresol	730 (600 – 1300)	810 (570 – 1240)	0,90
Espermidina	380 (300 – 730)	650 (390 – 1290)	0,04
Estimulado por *S. aureus* (MIF)			
RPMI	5700 (2400 – 7100)	4270 (1870 – 4660)	0,02
P-cresol	5110 (2500 – 6900)	3430 (1190 – 4400)	0,02
Espermidina	2800 (1100 – 5300)	2520 (1320 – 3040)	0,25
Estimulado por PMA (MIF)			
RPMI	9100 (7250 – 9550)	5570 (4160 – 6370)	0,02
P-cresol	7150 (3700 – 8400)	4560 (1070 – 6270)	0,04
Espermidina	7190 (4170 – 7900)	5750 (990 - 6560)	0,02

MIF = Média da Intensidade de Fluorescência

Tabela 12: Comparação da produção de ERO espontânea e estimulada por *S.aureus* e PMA entre PMN de indivíduos sadios e pacientes (24 horas)

	Sadio	Paciente	p
Produção de ERO			
Espontânea (MIF)			
RPMI	1170 (990 – 1600)	1160 (590 – 1910)	0,7
P-cresol	1890 (1050 – 2750)	1480 (560 – 1880)	0,4
Espermidina	1340 (890 – 2300)	1200 (380 – 1500)	0,56
Estimulado por *S. aureus* (MIF)			
RPMI	2400 (1630 – 3300)	2230 (1800 – 3280)	0,7
P-cresol	2050 (1350 – 3950)	1770 (1340 – 3100)	0,56
Espermidina	2600 (1870 – 5050)	2460 (1410 – 3030)	0,56
Estimulado por PMA (MIF)			
RPMI	5800 (3500 – 6340)	3160 (1990 – 4890)	0,04
P-cresol	5780 (3100 – 6130)	1990 (1480 – 6050)	0,03
Espermidina	5500 (3000 – 7260)	2920 (1130 - 5790)	0,05

MIF = Média da Intensidade de Fluorescência

Tabela 13: Comparação da expressão de CD95, CD11b e Caspase 3 entre PMN de indivíduos sadios e pacientes

		Sadio	Paciente	p
CD95 (MIF)				
	RPMI	225 (214 – 250)	416 (380 – 504)	0,001
	P-cresol	218 (217 – 260)	406 (300 – 432)	0,008
	Espermidina	190 (170 – 265)	436 (292 – 505)	<0,001
CD11b (MIF)				
	RPMI	5040 (3730 – 7690)	7044 (6690 – 9730)	0,02
	P-cresol	3760 (1459 - 6359)	6349 (4260 – 7340)	0,04
	Espermidina	3435 (2386 - 6089)	6645 (5290 - 7590)	0,03
Caspase 3 (MIF)				
	RPMI	105 (92 – 116)	136 (118 - 168)	0,02
	P-cresol	100 (81 – 112)	138 (117 - 188	0,02
	Espermidina	90 (78 - 112)	127 (118 - 130)	0,03

MIF = Média da Intensidade de Fluorescência

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Chonchol M. Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. Semin Dial 2006 Jul;19(4):291-6.

(2) Cohen G, Haag-Weber M, Horl WH. Immune dysfunction in uremia. Kidney Int Suppl 1997 Nov;62:S79-S82.

(3) Vanholder R, Van Biesen W. Incidence of infectious morbidity and mortality in dialysis patients. Blood Purif 2002;20(5):477-80.

(4) Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Bucharles S, Aita C, Yuzawa Y, *et al*. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. Perit Dial Int 2008 Jun;28 Suppl 3:S183-S187.

(5) Saigo K, Takenokuchi M, Imoto S. [Neutrophil function tests and oxidative stress detection as clinical examinations]. Rinsho Byori 2008 Sep;56(9):791-801.

(6) Dou L, Cerini C, Brunet P, Guilianelli C, Moal V, Grau G, *et al*. P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. Kidney Int 2002 Dec;62(6):1999-2009.

(7) Cerini C, Dou L, Anfosso F, Sabatier F, Moal V, Glorieux G, *et al*. P-cresol, a uremic retention solute, alters the endothelial barrier function in vitro. Thromb Haemost 2004 Jul;92(1):140-50.

(8) Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. Oxidative stress and reactive oxygen species. Contrib Nephrol 2005;149:240-60.

(9) El KD, Jozsef L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. Circ Res 2008 Aug 15;103(4):352-9.

(10) Kennedy AD, Deleo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. Immunol Res 2008 Dec 9.

(11) Hofmann TG, Will H. Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. Cell Death Differ 2003 Dec;10(12):1290-9.

(12) Cho SG, Choi EJ. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. J Biochem Mol Biol 2002 Jan 31;35(1):24-7.

(13) Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005 Nov;37(11):719-27.

(14) Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. Haematologica 2003 Feb;88(2):212-8.

(15) Majewska E, Baj Z, Sulowska Z, Rysz J, Luciak M. Effects of uraemia and haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. Nephrol Dial Transplant 2003 Dec;18(12):2582-8.

(16) Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ. Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia. Kidney Int Suppl 2001 Feb;78:S197-S205.

(17) Cendoroglo M, Jaber BL, Balakrishnan VS, Perianayagam M, King AJ, Pereira BJ. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. J Am Soc Nephrol 1999 Jan;10(1):93-100.

(18) Horl WH. Neutrophil function in renal failure. Adv Nephrol Necker Hosp 2001;31:173-92.

(19) Horl WH. Neutrophil function and infections in uremia. Am J Kidney Dis 1999 Feb;33(2):xlv-xlviii.

(20) Mahajan S, Kalra OP, Asit KT, Ahuja G, Kalra V. Phagocytic polymorphonuclear function in patients with progressive uremia and the effect of acute hemodialysis. Ren Fail 2005;27(4):357-60.

(21) Andreoli MC, Dalboni MA, Watanabe R, Manfredi SR, Canziani ME, Kallas EG, *et al*. Impact of dialyzer membrane on apoptosis and function of polymorphonuclear cells and cytokine synthesis by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients. Artif Organs 2007 Dec;31(12):887-92.

(22) Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G. Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. Clin Chem Lab Med 2002 Oct;40(10):1009-13.

(23) Vigano SM, Di FS, Manzoni C, Locatelli F. Membrane characteristics. Contrib Nephrol 2008;161:162-7.

(24) Rao M, Guo D, Jaber BL, Sundaram S, Cendoroglo M, King AJ, *et al*. Dialyzer membrane type and reuse practice influence polymorphonuclear leukocyte function in hemodialysis patients. Kidney Int 2004 Feb;65(2):682-91.

(25) Cohen G, Rudnicki M, Deicher R, Horl WH. Immunoglobulin light chains modulate polymorphonuclear leucocyte apoptosis. Eur J Clin Invest 2003 Aug;33(8):669-76.

(26) Cohen G, Rudnicki M, Horl WH. Uremic toxins modulate the spontaneous apoptotic cell death and essential functions of neutrophils. Kidney Int Suppl 2001 Feb;78:S48-S52.

(27) Cohen G. Immunoglobulin light chains in uremia. Kidney Int Suppl 2003 May;(84):S15-S18.

(28) Cohen G, Rudnicki M, Horl WH. Isolation of modified ubiquitin as a neutrophil chemotaxis inhibitor from uremic patients. J Am Soc Nephrol 1998 Mar;9(3):451-6.

(29) Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'intini V, Ratanarat R, De Cal M, *et al*. Uremic toxins: a new focus on an old subject. Semin Dial 2005 May;18(3):203-11.

(30) Vanholder R, Meert N, Schepers E, Glorieux G, Argiles A, Brunet P, *et al*. Review on uraemic solutes II--variability in reported concentrations: causes and consequences. Nephrol Dial Transplant 2007 Nov;22(11):3115-21.

(31) Vanholder R, Glorieux G, De Smet R, Lameire N. New insights in uremic toxins. Kidney Int Suppl 2003 May;(84):S6-10.

(32) Raff AC, Meyer TW, Hostetter TH. New insights into uremic toxicity. Curr Opin Nephrol Hypertens 2008 Nov;17(6):560-5.

(33) Vanholder R, Meert N, Schepers E, Glorieux G. Uremic toxins: do we know enough to explain uremia? Blood Purif 2008;26(1):77-81.

(34) Igarashi K. [Physiological functions of polyamines and regulation of polyamine content in cells]. Yakugaku Zasshi 2006 Jul;126(7):455-71.

(35) Seiler N. Catabolism of polyamines. Amino Acids 2004 Jun;26(3):217-33.

(36) Igarashi K, Ueda S, Yoshida K, Kashiwagi K. Polyamines in renal failure. Amino Acids 2006 Nov;31(4):477-83.

(37) Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr 2005 Apr;24(2):184-97.

(38) Curtius HC, Zagalak MJ, Baerlocher K, Schaub J, Leimbacher W, Redweik U. In vivo studies of the phenylalanine-4-hydroxylase system in hyperphenylalaninemics and phenylketonurics. Helv Paediatr Acta 1978 Feb;32(6):461-9.

(39) Fagugli RM, De Smet R, Buoncristiani U, Lameire N, Vanholder R. Behavior of non-protein-bound and protein-bound uremic solutes during daily hemodialysis. Am J Kidney Dis 2002 Aug;40(2):339-47.

(40) Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, *et al*. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. Kidney Int 2004 Feb;65(2):442-51.

(41) De Smet R, Glorieux G, Hsu C, Vanholder R. p-cresol and uric acid: two old uremic toxins revisited. Kidney Int Suppl 1997 Nov;62:S8-11.

(42) Martinez AW, Recht NS, Hostetter TH, Meyer TW. Removal of P-cresol sulfate by hemodialysis. J Am Soc Nephrol 2005 Nov;16(11):3430-6.

(43) de LH, Bammens B, Evenepoel P, De P, V, Verbeke K. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. Clin Chem 2005 Aug;51(8):1535-8.

(44) Ogata K, Nishimoto N, Uhlinger DJ, Igarashi K, Takeshita M, Tamura M. Spermine suppresses the activation of human neutrophil NADPH oxidase in cell-free and semi-recombinant systems. Biochem J 1996 Jan 15;313 (Pt 2):549-54.

(45) Ogata K, Tamura M, Takeshita M. Spermine down-regulates superoxide generation induced by fMet-Leu-Phe in electropermeabilized human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 1992 Jan 15;182(1):20-6.

(46) Vanholder R, De Smet R, Waterloos MA, Van Landschoot N, Vogeleere P, Hoste E, *et al*. Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. Kidney Int 1995 Feb;47(2):510-7.

(47) Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der EJ, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. Nephrol Dial Transplant 2007 Feb;22(2):592-6.

(48) De Smet R, Van Kaer J, Van Vlem B, De Cubber A, Brunet P, Lameire N, *et al*. Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. Clin Chem 2003 Mar;49(3):470-8.

(49) Bammens B, Evenepoel P, Keuleers H, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients. Kidney Int 2006 Mar;69(6):1081-7.

(50) Watanabe R. Efeito das Toxinas Urêmicas na Apoptose e Função dos Leucócitos Polimorfonucleares. Tese de Mestrado apresentada à UNIFESP-EPM 2001.

(51) Cohen G, Horl WH. Retinol binding protein isolated from acute renal failure patients inhibits polymorphonuclear leucocyte functions. Eur J Clin Invest 2004 Nov;34(11):774-81.

(52) Cohen G, Raupachova J, Wimmer T, Deicher R, Horl WH. The uraemic retention solute para-hydroxy-hippuric acid attenuates apoptosis of polymorphonuclear leukocytes from healthy subjects but not from haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2008 Aug;23(8):2512-9.

(53) Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MC, Watanabe R, Dalboni MA, Manfredi SR, *et al*. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. Nephrol Dial Transplant 2006 Jan;21(1):160-5.

(54) Sardenberg C, Suassuna P, Watanabe R, Cruz Andreoli MC, Aparecida DM, Faria S, V, *et al*. Balance between cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and reactive oxygen species production by monocytes in patients with chronic kidney disease. Ren Fail 2004 Nov;26(6):673-81.

(55) Watanabe R. Efeito das Toxinas Urêmicas na Apoptose e Função dos Leucócitos Polimorfonucleares. Tese de Mestrado apresentada à UNIFESP-EPM, 2001. 2001. Tese de Mestrado apresentada à UNIFESP-EPM, 2001.
Ref Type: Generic

(56) Cohen G, Glorieux G, Thornalley P, Schepers E, Meert N, Jankowski J, *et al*. Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro--towards a standardized approach for research on uraemia. Nephrol Dial Transplant 2007 Dec;22(12):3381-90.

(57) Stefanelli C, Stanic' I, Zini M, Bonavita F, Flamigni F, Zambonin L, *et al*. Polyamines directly induce release of cytochrome c from heart mitochondria. Biochem J 2000 May 1;347 Pt 3:875-80.

(58) Stefanelli C, Bonavita F, Stanic' I, Pignatti C, Flamigni F, Guarnieri C, *et al*. Spermine triggers the activation of caspase-3 in a cell-free model of apoptosis. FEBS Lett 1999 May 21;451(2):95-8.

(59) Stefanelli C, Bonavita F, Stanic' I, Mignani M, Facchini A, Pignatti C, *et al*. Spermine causes caspase activation in leukaemia cells. FEBS Lett 1998 Oct 23;437(3):233-6.

(60) Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ. Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia. Kidney Int Suppl 2001 Feb;78:S197-S205.

(61) Jaber BL, Perianayagam MC, Balakrishnan VS, King AJ, Pereira BJ. Mechanisms of neutrophil apoptosis in uremia and relevance of the Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand system. J Leukoc Biol 2001 Jun;69(6):1006-12.

(62) Perianayagam MC, Murray SL, Balakrishnan VS, Guo D, King AJ, Pereira BJ, *et al*. Serum soluble Fas (CD95) and Fas ligand profiles in chronic kidney failure. J Lab Clin Med 2000 Oct;136(4):320-7.

(63) Jaber BL, Balakrishnan VS, Cendoroglo MN, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ. Modulation of neutrophil apoptosis by uremic plasma during hemodialysis. Blood Purif 1998;16(6):325-35.

(64) Floccari F, Aloisi C, Crasci E, Sofi T, Campo S, Tripodo D, *et al*. Oxidative stress and uremia. Med Res Rev 2005 Jul;25(4):473-86.

(65) Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. Mol Interv 2005 Apr;5(2):94-111.

(66) Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ 2007 Jul;14(7):1243-7.

(67) Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. Drug Metab Rev 2007;39(2-3):443-55.

(68) Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis 2007 May;12(5):913-22.

(69) Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:143-83.

(70) Ward RA, McLeish KR. Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? Artif Organs 2003 Mar;27(3):230-6.

(71) Anwar S, Whyte MK. Neutrophil apoptosis in infectious disease. Exp Lung Res 2007 Dec;33(10):519-28.

(72) Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1994 Aug 30;345(1313):327-33.

(73) Whyte M, Renshaw S, Lawson R, Bingle C. Apoptosis and the regulation of neutrophil lifespan. Biochem Soc Trans 1999 Dec;27(6):802-7.

(74) Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. J Immunol 1993 Jun 1;150(11):5124-34.

(75) Cohen G, Ilic D, Raupachova J, Horl WH. Resistin inhibits essential functions of polymorphonuclear leukocytes. J Immunol 2008 Sep 15;181(6):3761-8.

(76) Dou L, Brunet P, gnat-George F, Sampol J, Berland Y. Effect of uremia and hemodialysis on soluble L-selectin and leukocyte surface CD11b and L-selectin. Am J Kidney Dis 1998 Jan;31(1):67-73.

(77) Cowley BD, Jr., Muessel MJ, Douglass D, Wilkins W. In vivo and in vitro osmotic regulation of HSP-70 and prostaglandin synthase gene expression in kidney cells. Am J Physiol 1995 Dec;269(6 Pt 2):F854-F862.

(78) Gonçalves R. Hiperosmolaridade como modelo de tolerância ao estresse celular. Tese de Mestrado apresentada à UNIFESP-EPM, 2005.

ANEXOS: ARTIGO SUBMETIDO

Effects of spermidine and p-cresol on polymorphonuclear cell apoptosis and function

Carvalho JTG[1], Dalboni MA[1], Watanabe R[1], Peres AT. [1], Goes MA[1], Manfredi SR[1], Canziani ME[1], Cendoroglo GS[1], Guimarães N[1], Batista MC[1], Cendoroglo M[1, 2]. Federal University of Sao Paulo, Brazil.

1. Department of Internal Medicine, Division of Nephrology, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

2. Department of Medicine, Division of Nephrology, Tufts University School of Medicine, Boston, MA.

Address for correspondence:
Maria Aparecida Dalboni, PhD
Division of Nephrology, São Paulo Federal University – UNIFESP
Ed. Horácio Kneese de Melo
Rua Pedro de Toledo 781, 14o. Andar
ZIP CODE – 04038-002
Fax: 55-11-5571-9039
e-mail: dalboni@nefro.epm.br / cendoroglo@einstein.br

Abstract

Background: In Chronic Kidney Disease (CKD) patients, bacterial infections are the first cause of hospitalization and the second cause of mortality. PMN isolated from CKD patients display accelerated apoptosis and dysfunction, which may predispose the CKD patients to infections. Some uremic toxins have been associated with PMN dysfunction. In this study, we investigated the effect of spermidine and p-cresol on apoptosis and function on PMN from healthy subjects and PMN from CKD patients.

Methods: Using a flow-cytometric we have measured the effect of spermidine and p-cresol on apoptosis, ROS production unstimulated and stimulated (*S.aureus* and PMA) and expression of CD95, Caspase 3 and CD11b on PMN from healthy subjects and PMN from CKD patients.

Results: After incubation with p-cresol and spermidine, we did not observe any changes in apoptosis, viability or expression of caspase 3 and CD95 in PMN from healthy subjects. PMN from healthy subjects incubated for 10 minutes with spermidine demonstrated a significant reduction in spontaneous, *S. aureus* and PMA-stimulated ROS production. p-cresol induced a decrease in PMA-stimulated ROS production. Spermidine and p-cresol also induced a decrease in the expression of CD11b on PMN from healthy subjects. When these toxins were incubated with PMN from CKD patients no changes were observed between the groups regarding all parameters investigated. On the other hand, PMN from CKD patient displayed decreased viability and ROS production, compared to PMN from healthy subjects.

Conclusion: spermidine and p-cresol decreased the expression of CD11b and oxidative burst of PMN from healthy subjects and had no effect on PMN apoptosis and viability. PMN from healthy volunteers were more susceptible than PMN from CKD patients to spermidine and p-cresol-induced changes in ROS production and CD11b expression.

Key-words: uremic toxins, apoptosis, ROS production, CD11b, CD95

Short Summary

PMN isolated from CKD patients display accelerated apoptosis and dysfunction, which may predispose the CKD patients to infections. Some uremic toxins have been associated with PMN dysfunction.

In this study we observed that spermidine reduced ROS production in PMN from healthy subjects. Besides, spermidine and p-cresol also decreased the expression of CD11b.

It is possible that these toxins, especially spermidine, have deleterious effects on the innate immunity in uremia, which consequently might contribute to the greater bacterial infection rates of CKD patients.

Introduction

In Chronic Kidney Disease (CKD) patients, bacterial infections are the first cause of hospitalization and the second cause of mortality [1-4]. The immunologic alterations described in patients with CKD may predispose them to these infections [2;4]. Polymorphonuclear leukocytes (PMN), are essential elements of the first line defense against fungal and bacterial infections [1]. During an infection process, PMN migrate from the circulation to the site of injury by chemotaxis, a process mediated by the interaction of receptors on the surface of PMN with receptors on the surface of endothelial cells [1;5]. Following phagocytic particle ingestion, the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase system is activated, and transforms oxygen into superoxide free radical. This is further transformed into other compounds that are also toxic to bacteria and are directly involved in the killing of microorganisms present in the phagossome, including hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and hypochlorite [6]. After the resolution of inflammation, PMN undergo apoptosis and are removed by tissue phagocytes [7;8] .

The apoptosis process is thought to be initiated through two major pathways, the extrinsic and intrinsic mitochondrial pathways [9;10]. In the intrinsic pathway, a lack of anti-apoptotic signals, ROS, or DNA damage leads to loss of mitochondrial membrane integrity and release of pro-apoptotic factors that result in the activation of caspases 9 and 3 (the putative enzyme associated with DNA fragmentation and apoptotic cell death). The extrinsic pathway involves the active induction of apoptosis through ligation of members of the death receptor family, such as Fas and TNF, and involves caspases 8, 10 and 3 [7;9;10].

PMN isolated from CKD patients display accelerated apoptosis and functional changes, such as reduced migration capacity, lower cellular response to phagocytic stimuli and decreased ability to generate reactive oxygen species (ROS) in response to bacterial challenges, which leads to inefficient intracellular killing of pathogens [11]. The factors related to PMN dysfunction are not completely understood and have been ascribed to malnutrition, iron overload, elevated levels of intracellular calcium, zinc deficiency, dialysis therapy *per se* and uraemic toxins [2;3].

We have recently performed a triage study of 13 uremic toxins, known to affect PMN function [12]. The most important results were obtained when cells were incubated with spermidine and p-cresol, but in concentrations different from those currently indicated by the European Uremic Toxin Work Group (EuTox) [13]. We observed that these toxins induced an increase in apoptosis, and a decrease in ROS production.

Spermidine and other polyamines (spermine, cadaverine and putrescine) are organic cations, originated from the bacterial metabolism of ornithine and methionine[14]. They are also generated endogenously in cell metabolism and are important regulators of the cell cycle. They have been found to increase or decrease apoptosis depending on dose and cell type [14;15]. Ferrante, described the inhibition of chemotaxis in PMN from healthy donors, after 2 hours incubation with polyamines [16]. Others groups have shown decreased ROS production induced by polyamines due to a suppression of NADPH oxidase activity [17].

P-Cresol is produced by intestinal bacteria as a result of tyrosine metabolism, phenylacetic acid and phenylalanine. P-Cresol is characterized by

a strong protein binding, and, therefore, difficult to remove by most of the currently available dialysis techniques, including high-flux dialysis [18]. In vitro, p-cresol depresses phagocyte functional capacity [19;20] and suppressed the migration capacity of PMN [5;21]. De Smet *et al*. also showed a link between high concentrations of plasma-free p-cresol and hospitalization rates for infectious diseases in CKD patients [22].

In this study, we investigated the effect of p-cresol and spermidine on PMN spontaneous apoptosis, apoptosis pathway (caspase 3 and CD95) and function (CD11b and ROS production). We performed our experiments with PMN isolated from healthy donors and CKD patients.

Subjects and Methods

Blood samples were collected from 25 healthy subjects and 5 pre-dialysis patients with chronic kidney disease (CKD group), with creatinine clearance between 30 and 48 ml/min/1.73m2. All patients and volunteers were recruited at the Hospital do Rim e Hipertensão – Escola Paulista de Medicina – Federal University of São Paulo, UNIFESP.

Patients with acute infection or blood transfusion in the past month, chronic infections (hepatitis B, hepatitis C, HIV, osteomyelitis), active immunologic disease (systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis), immunosuppressive therapy, previous transplantation, or a history of malignancy were excluded from the study. The study was approved by the Ethics Committee on Research at the Federal University of São Paulo. Only patients who signed an informed consent were enrolled in the study.

PMN isolation: In brief, leukocyte preparations containing 95–98% PMN were isolated by Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, NY, USA) density gradient centrifugation and dextran sedimentation. Residual erythrocytes were lysed with hypotonic saline solution and the PMN pellets were resuspended in phosphate buffered saline (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA) to reach a concentration of 5 x 10^6cells/ml.

Incubation of PMN with uremic toxins: A 1 ml suspension of PMN (5 x 10^6 cells/ml) was aliquoted into four tubes (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) and each tube was supplemented with 50% autologous plasma and 50% culture medium with or without uremic toxins, or with camptothecin (Sigma, St Louis, MO, USA), a substance able to induce PMN apoptosis. The suspension was then incubated for 10 minutes or 24 hours at 37ºC in 5% CO_2. For each toxin was prepared a stock solution 10 times higher than uremic concentration. Then was added 1 volume of stock solution for 9 volumes of assay suspension (medium culture and serum 50%/50%) to reach the uremic concentration. P-cresol was diluted in methanol and spermidine was diluted in 0,9% saline solution. We performed our experiments with p-cresol at a final concentration of 40.7 mg/l and spermidine at a final concentration of 0,19 mg/l [13]. The toxins and reagents were purchased from Sigma Laboratories. After the incubation period, the cells were centrifuged at 500 X g for 10 minutes at 4℃. The cell pellets were resuspended in PBS, and samples then processed for quantification of apoptosis, ROS production, expression of CD95 and CD11b and detection of caspase 3.

Apoptosis assay: Cells were washed in PBS. 5 x 10^6 cells/mL from each incubation condition were transferred to each tube, then 5 μL annexin V-FITC

(Kit I Annexin V-FITC Apoptosis Detection, Pharmingen, Becton Dickinson Company, USA) and 5 μL of propidium iodide (PI) was added, and the cells were incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. After that, 400 μL of binding buffer was added to each tube. The apoptotic degree of PMN was studied by flow cytometry (FACSCanto analyzer; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA). Cells staining positive for PI were considered as dead cells (necrosis or late apoptosis), cells staining positive only for annexin V were considered as apoptotic, and cells negative for both were considered as viable.

ROS production: It was assessed by analyzing the reaction of peroxide with DCFH-DA, spontaneously or after stimulation with 4-phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) and S. aureus (ATCC - 25923 strain, DIFCO). To study unstimulated and stimulated ROS production, a mixture of 100 μL of the solution (5 X 10^6 cells/mL) from each incubation condition, 200 μL of 0.3 mM of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma, St Louis, MO, USA) in PBS, 700 mL of PBS, and 100 μL of each stimulus (S.aureus and PMA) were prepared in separate tubes. To evaluate unstimulated ROS production, one of the tubes received no stimulus, and 800 μL of PBS was used. The tubes were incubated with agitation for 30 min at 37°C in a shaking water bath, and then 2 mL of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA, Sigma, St Louis, MO, USA) were added in order to stop the reaction. After centrifugation, the leukocyte pellets were resuspended in 500 μL of 0.3 mM EDTA in PBS. Intracellular DCFH fluorescence of PMN was studied by flow cytometry (FACScanto analyzer; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA).

CD11b and CD95 expression: A hundred micro liters (100 µl) of the solution (5 x 10^6 cells/mL) from each incubation condition were transferred to tube, and cells were washed in PBS. They were stained with 10 µL anti-CD11b-PE (Pharmingen, Becton Dickinson Company, USA) and 10 µL anti-CD95-FITC (Pharmingen, Becton Dickinson Company, USA) for 15 minutes at room temperature. The cells were washed in 1.0 mL PBS, then resuspend in 300 µL Azide 5% in PBS. Cells were analyzed by flow cytometry (FACScanto analyzer; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA).

Caspase 3 detection: Intracellular detection of caspase 3 was measured by Caspase 3 Kit detection (PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit, Pharmingen, Becton Dickinson Company, USA). 200 µL of the solution (5 x 10^6 cells/mL) from each incubation condition were transferred to a tube, and cells were washed with cold PBS. The cells were permeabilized and fixed in 500 µL BD Cytofix/Cytoperm and were incubated for 20 min on ice. BD Cytofix/Cytoperm solution was discarded; the cell pellets were washed twice with 500 µL of BD Perm/Wash buffer at room temperature. The cells were stained with 10 µL anti-caspase 3-PE for 30 min at room temperature, washed in 1.0 ml BD Perm/Wash buffer, resuspended in 500 µL of BD Perm/Wash buffer and analyzed by flow cytometry (FACScanto analyzer; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS system for Windows, version 16.0. The results are presented as percentage or median and range. Comparisons between groups were made by Kruskall-Wallis as appropriate.

When Kruskall-Wallis showed a significant difference between the groups, a Mann Whitney test was performed in order to detect which group or groups were different from the others. Differences were considered statistically significant when two-tailed tests yielded $p<0.05$.

Results

We did not observe any changes in apoptosis, late apoptosis and viability in PMN from healthy subjects incubated for 10 minutes (Table 1) or 24 hours (Table 2) with p-cresol and spermidine compared to control.

PMN from healthy subjects incubated for 10 minutes with spermidine demonstrated a significant reduction in spontaneous ROS production as well as upon stimulation with *S. aureus* and PMA when compared with control. p-cresol also induced a decrease in PMA-stimulated ROS production. However, spontaneous ROS production as well as upon stimulation with *S. aureus* was not different (Table 1). Besides, no changes in spontaneous ROS production or stimulated with *S. Aureus* or PMA were observed in PMN incubated for 24 hours with p-cresol and spermidine (Table 2).

With respect to the caspase 3 and CD95 expression, we did not observed effects of spermidine and p-cresol on PMN from healthy subjects compared to the control. However, both uremic toxins decreased CD11b expression compared to the control (Table 2)

When toxins were incubated with PMN from CKD patients no changes were observed between the groups regarding apoptosis, late apoptosis, viability, spontaneous ROS production or stimulated with S. aureus or PMA, expression of caspase 3, CD95 and CD11b (Table 3 and 4).

PMN from CKD patients incubated for 10 minutes and 24 hours, with and without uremic toxins, showed significant higher rates of apoptosis when compared to healthy individuals. We also observed that PMN from CKD patients incubated for 10 minutes, with and without uremic toxins, had a significant lower production of ROS when stimulated by *S. aureus* and PMA in comparison to PMN from healthy subjects. After 24 hour incubation, PMN from CKD patients had a lower production of ROS compared to PMN from healthy subjects, only when stimulated with PMA. PMN from CKD patients also showed increased expression of CD95, CD11b and caspase 3 with and without uremic toxins when compared to PMN from healthy subjects (Table 5).

Discussion

In this study, we have exposed PMN from healthy subjects and CKD patients to spermidine and p-cresol, and evaluated the effect of these uremic toxins on apoptosis, spontaneous and stimulated reactive oxygen species production and expression of CD11b, CD95 and caspase 3.

We did not observe any effect of spermidine on apoptosis, late apoptosis and viability of PMN from healthy subjects. Recent evidence suggests that polyamines may induce apoptosis in different types of cells [23]. These substances may induce the release of cytochrome C from mithochondria into the cytosol, in a rapid and irreversible way [24]. However; these effects have only been found when concentrations of polyamines higher than those found in uremia were used.

Regarding p-cresol, we did not find any effect on PMN viability and apoptosis. Dou *et al* did not observed any effect on apoptosis of endothelial cells, when incubated with p-cresol in uremic concentration [25].

In spite of the absence of a pro-apoptotic effect of spermidine and p-cresol in our study, we may not reject the hypothesis that, *in vivo*, these toxins have an effect on PMN apoptosis. The uremic plasma contains a complex mixture of uremic solutes that may interact; resulting in a phenotype of accelerated apoptosis. In fact, in this study, we observed that PMN isolated from uremic patients exhibited a higher proportion of apoptosis and expression of CD95 and caspase 3 when compared to PMN isolated from healthy subjects. Cendoroglo *et al,* also found an increase in apoptosis rates when PMN from healthy subjects were incubated with uremic plasma [26]. Other studies showed that the expression of CD95, caspases 3, 8 and 10 was significantly higher among PMN from patients with chronic renal failure [11;27].

With respect to ROS production, many authors have reported that cells from uremic patients respond to stimuli in a different way, when compared to cells from healthy subjects. PMN from uremic patients produce less ROS in response to stimuli such as PMA or fMLP [28;29]. In this study, PMN from healthy subjects incubated with spermidine for 10 minutes demonstrated a significant reduction in spontaneous ROS production, as well as upon stimulation with *S. aureus* and PMA. PMN from healthy subjects incubated for 10 minutes with p-cresol also displayed a decrease in PMA-stimulated ROS production, but not in spontaneous and *S. aureus*-stimulated ROS production. Our results suggest that there was an inhibition of protein kinase C (PKC), as there was a decrease in oxidative burst upon stimulation with PMA [19]. In spite of the significant drop in *S. aureus*-stimulated ROS production after the exposition of PMN to spermidine, it is not possible to confirm that the activation of the membrane receptors was compromised, as PKC was also inhibited. Our

results are in accordance with Ogata *et al,* who showed *in vitro* that fMLP-stimulated superoxide production, decreased after PMN incubation with spermidine for 10 minutes [30]. Shepers *et al* also showed that p-cresol decreased PMA-stimulated ROS production for 10 minutes, but had no effect on spontaneous ROS production [20]. These results suggest that both toxins may inhibit the activation of either PKC or NADPH-oxidase, consequently leading to a decrease in ROS production. In fact, Ogata *et al* observed, in another study, that spermine inhibited the activation of NADPH-oxidase of PMN from healthy subjects [17].

When we incubated PMN for 24 hours with spermidine and p-cresol no changes were found regarding spontaneous, PMA or *S. aureus*-stimulated ROS production. However, the incubation for 24 hours led to a decrease in stimulated ROS production, with or without uremic toxins compared to 10 minutes. It is possible that the decrease in viability after PMN incubation for 24 hours have influenced these results. In fact, a reduction in the ability of ROS production, phagocytosis, migrate capacity in senescent normal PMN has been reported, suggesting that senescent PMN are functionally impaired [31].

There are several studies showing a decrease in the migration capacity of PMN in uremia [16]. In our study, we observed a decrease in CD11b expression in PMN from healthy subjects incubated with spermidine and p-cresol. Other authors have shown that p-cresol inhibit the expression of V-CAM-1 and I-CAM in endothelial cells [21;25]. With respect to expression of CD11b in uremia, we demonstrated that PMN from uremic patients had higher CD11b expression, compared to PMN from healthy subjects. The observation of an inhibitory effect of these toxins on CD11b expression as opposed to the higher

CD11b expression in CKD patients, suggests an interaction of uremic toxins *in vivo*, resulting in a phenotype of higher CD11b expression in uremia.

Whereas several previous studies reported the use of cells from healthy subjects to investigate the effect of uremic toxicity on PMN apoptosis and ROS production, we studied PMN from healthy subjects and PMN from uremic patients as well. We observed differences after incubation of PMN from healthy with spermidine and p-cresol on expression of CD11b and ROS production, but not from uremic patients. This suggests that the continuous exposure to the uremic toxins, may have led to a resistance of these cells to the uremic environment [32]. That hypothesis merits further investigation.

In summary, we observed that the uremic toxins spermidine and p-cresol decreased the expression of CD11b and the oxidative burst of PMN from healthy subjects and had no effect on PMN apoptosis and viability. PMN from healthy volunteers were more susceptible than PMN from CKD patients to spermidine and p-cresol-induced changes in ROS production and CD11b expression. It is possible that these toxins, especially spermidine, have deleterious effects on the innate immunity in uremia, which consequently might contribute to the greater bacterial infection rates of CKD patients.

Table 1: Effects of p-cresol and spermidine on apoptosis and ROS production of PMN from healthy subjects at 10 minutes (n=25).

	Control	p-cresol	spermidin	camptotecin	p
Viability (%)	80 (76 - 87)	80 (55 - 88)	81 (75 - 89)	54* (39 - 69)	0.02
Apoptosis (%)	15 (11 - 20)	17 (11 - 31)	15 (10 - 22)	36* (12 - 54)	0.04
Late Apoptosis (%)	2.4 (0.8 - 3)	2.4 (0.7 - 3)	2.9 (0.6 - 4)	12.3* (7 - 31)	0.002
ROS production (MIF)					
Spontaneous	1135 (769 - 2400)	1009 (489 - 2855)	679* (210 - 1580)	-	0.01
Stimulated by					
S. aureus	5357 (2397 - 8417)	5222 (1567 - 7062)	3168* (2198 - 5758)	-	0.07
PMA	8723 (3900 - 9922)	6124† (2073 - 9382)	6384† (1002 - 9237)	-	0.01

Not Significant (N.S.)
Mean Fluorescence Intensity (MFI)
†Compared with the control group
*Compared with all the other groups

Table 2: Effects of p-cresol and spermidine on apoptosis and ROS production of PMN from healthy subjects at 24 hours (n=25).

	Control	p-cresol	spermidine	camptotecin	p
Viability (%)	54 (40.8 - 75)	48 (28 – 82)	55 (20 - 79)	3.6* (1 - 18)	0.001
Apoptosis (%)	19 (8 - 32)	24 (9 - 33)	21 (9 - 28)	48* (26 - 71)	0.009
Late Apoptosis (%)	25 (6 - 36)	21 (6 - 33)	15 (6 - 42)	89* (18 - 98)	0.001
CD95 (MIF)	196 (64 -388)	221 (69 - 456)	194 (93 - 426)	1035* (1205 - 3900)	0.001
Caspase 3 (MIF)	116 (92 - 139)	112 (81 - 147)	112 (80 - 140)	190* (94 - 334)	0.01
CD11b (MIF)	5143 (3178 -7689)	3760† (1459 - 6359)	3435† (2386 - 6089)	-	0.04
ROS production (MIF)					
Spontaneous	952 (370 - 1609)	840 (332 – 2765)	966 (291 - 2565)	-	N.S.
Stimulated by *S. aureus*	1998 (532 - 5034)	1795 (526 - 6628)	2022 (513 - 4805)	-	N.S.
PMA	2150 (400 - 6331)	2139 (635 - 6978)	2368 (362 - 7263)	-	N.S.

Not Significant (N.S.)
Mean Fluorescence Intensity (MFI)
†Compared with the control group
*Compared with all the other groups

Table 3: Effects of p-cresol and spermidine on apoptosis and ROS production of PMN from CKD patients at 10 minutes (n=5).

	Control	p-cresol	spermidine	p
Viability (%)	73 (66 – 76)	75 (28 – 85)	73 (33 – 79)	N.S.
Apoptosis (%)	24 (15 – 28)	22 (15 – 38)	24 (19 – 40)	N.S.
Late Apoptosis (%)	2,5 (1.3 – 4)	2,3 (1.2 – 3,4)	2,1 (1.1 – 3,3)	N.S.
ROS production (MIF)				
Spontaneous	898 (500 – 1210)	810 (570 – 1240)	650 (390 – 1290)	N.S.
Stimulated by				
S. aureus	4270 (1870 – 4660)	3430 (1190 – 4400)	2520 (1320 – 3040)	N.S.
PMA	5570 (4160 – 6370)	4560 (1070 – 6270)	5750 (990 - 6560)	N.S.

Not Significant (N.S.)
Mean Fluorescence Intensity (MFI)

Table 4: Effects of p-cresol and spermidine on apoptosis and ROS production of PMN from CKD patients at 24 hours (n=5).

	Control	p-cresol	spermidine	p
Viability (%)	44 (33 – 46)	37 (34 – 63)	44 (26 – 64)	N.S.
Apoptosis (%)	31 (19 – 36)	42 (25 – 57)	38 (26 – 42)	N.S.
Late Apoptosis (%)	23 (12 – 36)	18 (15 – 23)	21 (16 – 43)	N.S.
CD95 (MIF)	416 (380 – 504)	406 (300 – 432)	436 (292 – 505)	N.S.
Caspase 3 (MIF)	136 (118 - 168)	138 (117 - 188)	127 (118 - 130)	N.S.
CD11b (MIF)	7044 (6690 – 9730)	6349 (4260 – 7340)	6645 (5290 - 7590)	N.S.
ROS production (MIF)				
Spontaneous	1160 (590 – 1910)	1480 (560 – 1880)	1200 (380 – 1500)	N.S.
Stimulated by				
S. aureus	2230 (1800 – 3280)	1770 (1340 – 3100)	2460 (1410 – 3030)	N.S.
PMA	3160 (1990 - 4890)	2310 (1480 – 6050)	2920 (1130 - 5790)	N.S.

Not Significant (N.S.)
Mean Fluorescence Intensity (MFI)

Table 5: Comparison between the effects of p-cresol and spermidine on PMN from healthy subjects (n=25) and PMN from CKD patients (n=5).

	Healthy subjects	CKD patients	p
Apoptose Rate (%)for 10 min			
RPMI	12 (10 – 14)	24 (15 – 28)	0.02
P-cresol	14 (11 – 16)	22 (15 – 38)	0.02
Espermidina	12 (10 – 17)	24 (19 – 40	0.01
Apoptose Rate(%) for 24h			
RPMI	12 (10 – 14)	24 (15 – 28)	0.02
P-cresol	14 (11 – 16)	22 (15 – 38)	0.02
Espermidina	12 (10 – 17)	24 (19 – 40	0.01
ROS Production (MIF) Spontaneous:			
RPMI	850 (760 – 1100)	898 (500 – 1210	0.02
P-cresol	730 (600 – 1300)	810 (570 – 1240)	0.02
Espermidina	380 (300 – 730)	650 (390 – 1290)	0.25
Stimulated by *S. aureus:*			
RPMI	5700 (2400 – 7100)	4270 (1870 – 4660)	0.02
P-cresol	5110 (2500 – 6900)	3430 (1190 – 4400)	0.02
Espermidina	2800 (1100 – 5300)	2520 (1320 – 3040)	0.25
Stimulated by PMA :			
RPMI	9100 (7250 – 9550)	5570 (4160 – 6370)	0.02
P-cresol	7150 (3700 – 8400)	4560 (1070 – 6270)	0.04
Espermidina	7190 (4170 – 7900)	5750 (990 - 6560)	0.02
CD95 (MIF)			
RPMI	225 (214 – 250)	416 (380 – 504)	0.001
P-cresol	218 (217 – 260)	406 (300 – 432)	0.008
Espermidina	190 (170 – 265)	436 (292 – 505)	<0.001
CD11b (MIF)			
RPMI	5040 (3730 – 7690)	7044 (6690 – 9730)	0.02
P-cresol	3760 (1459 - 6359)	6349 (4260 – 7340)	0.04
Espermidina	3435 (2386 - 6089)	6645 (5290 - 7590)	0.03
Caspase 3 (MIF)			
RPMI	105 (92 – 116)	136 (118 - 168)	0.02
P-cresol	100 (81 – 112)	138 (117 - 188	0.02
Espermidina	90 (78 - 112)	127 (118 - 130)	0.03

References

1. Chonchol M: Neutrophil dysfunction and infection risk in end-stage renal disease. Semin Dial 2006;19:291-296.

2. Cohen G, Haag-Weber M, Horl WH: Immune dysfunction in uremia. Kidney Int Suppl 1997;62:S79-S82.

3. Vanholder R, Van Biesen W: Incidence of infectious morbidity and mortality in dialysis patients. Blood Purif 2002;20:477-480.

4. Hauser AB, Stinghen AE, Kato S, Bucharles S, Aita C, Yuzawa Y, Pecoits-Filho R: Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. Perit Dial Int 2008;28 Suppl 3:S183-S187.

5. Dou L, Cerini C, Brunet P, Guilianelli C, Moal V, Grau G, De Smet R, Vanholder R, Sampol J, Berland Y: P-cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. Kidney Int 2002;62:1999-2009.

6. Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A: Oxidative stress and reactive oxygen species. Contrib Nephrol 2005;149:240-260.

7. Hofmann TG, Will H: Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation. Cell Death Differ 2003;10:1290-1299.

8. Kennedy AD, Deleo FR: Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. Immunol Res 2008.

9. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J: Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2005;37:719-727.

10. Rossi D, Gaidano G: Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. Haematologica 2003;88:212-218.

11. Majewska E, Baj Z, Sulowska Z, Rysz J, Luciak M: Effects of uraemia and haemodialysis on neutrophil apoptosis and expression of apoptosis-related proteins. Nephrol Dial Transplant 2003;18:2582-2588.

12. Watanabe R, Andreoli MC Sardenberg C *et al*. The effects of uremic toxins on apoptosis and function of polymorphonuclear leukocytes. (submitted for publication),2009

13. Cohen G, Glorieux G, Thornalley P, Schepers E, Meert N, Jankowski J, Jankowski V, Argiles A, Anderstam B, Brunet P, Cerini C, Dou L, Deppisch R, Marescau B, Massy Z, Perna A, Raupachova J, Rodriguez M, Stegmayr B, Vanholder R, Horl WH: Review on uraemic toxins III:

recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro--towards a standardized approach for research on uraemia. Nephrol Dial Transplant 2007;22:3381-3390.

14. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP: Polyamines: metabolism and implications in human diseases. Clin Nutr 2005;24:184-197.

15. Igarashi K, Ueda S, Yoshida K, Kashiwagi K: Polyamines in renal failure. Amino Acids 2006;31:477-483.

16. Ferrante A: Inhibition of human neutrophil locomotion by the polyamine oxidase-polyamine system. Immunology 1985;54:785-790.

17. Ogata K, Nishimoto N, Uhlinger DJ, Igarashi K, Takeshita M, Tamura M: Spermine suppresses the activation of human neutrophil NADPH oxidase in cell-free and semi-recombinant systems. Biochem J 1996;313 (Pt 2):549-554.

18. Vanholder R, De Smet R, Lesaffer G: p-cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of uraemic toxicity. Nephrol Dial Transplant 1999;14:2813-2815.

19. Vanholder R, De Smet R, Waterloos MA, Van Landschoot N, Vogeleere P, Hoste E, Ringoir S: Mechanisms of uremic inhibition of phagocyte reactive species production: characterization of the role of p-cresol. Kidney Int 1995;47:510-517.

20. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der EJ, Vanholder R: P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. Nephrol Dial Transplant 2007;22:592-596.

21. Cerini C, Dou L, Anfosso F, Sabatier F, Moal V, Glorieux G, De Smet R, Vanholder R, Dignat-George F, Sampol J, Berland Y, Brunet P: P-cresol, a uremic retention solute, alters the endothelial barrier function in vitro. Thromb Haemost 2004;92:140-150.

22. De Smet R, Van Kaer J, Van Vlem B, De Cubber A, Brunet P, Lameire N, Vanholder R: Toxicity of free p-cresol: a prospective and cross-sectional analysis. Clin Chem 2003;49:470-478.

23. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic' I, Mignani M, Facchini A, Pignatti C, Flamigni F, Caldarera CM: Spermine causes caspase activation in leukaemia cells. FEBS Lett 1998;437:233-236.

24. Stefanelli C, Stanic' I, Zini M, Bonavita F, Flamigni F, Zambonin L, Landi L, Pignatti C, Guarnieri C, Caldarera CM: Polyamines directly induce release of cytochrome c from heart mitochondria. Biochem J 2000;347 Pt 3:875-880.

25. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P: The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. Kidney Int 2004;65:442-451.

26. Cendoroglo M, Jaber BL, Balakrishnan VS, Perianayagam M, King AJ, Pereira BJ: Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. J Am Soc Nephrol 1999;10:93-100.

27. Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ: Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia. Kidney Int Suppl 2001;78:S197-S205.

28. Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MC, Watanabe R, Dalboni MA, Manfredi SR, dos Santos OP, Kallas EG, Draibe SA, Cendoroglo M: Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. Nephrol Dial Transplant 2006;21:160-165.

29. Ward RA, McLeish KR: Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors? Artif Organs 2003;27:230-236.

30. Ogata K, Tamura M, Takeshita M: Spermine down-regulates superoxide generation induced by fMet-Leu-Phe in electropermeabilized human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun 1992;182:20-26.

31. Anwar S, Whyte MK: Neutrophil apoptosis in infectious disease. Exp Lung Res 2007;33:519-528.

32. Cohen G, Raupachova J, Wimmer T, Deicher R, Horl WH: The uraemic retention solute para-hydroxy-hippuric acid attenuates apoptosis of polymorphonuclear leukocytes from healthy subjects but not from haemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2008;23:2512-2519.

ANEXOS:

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIFESP PAULISTA ESCOLA MEDICINA

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 22 de dezembro de 2006
CEP 1712/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) JOSÉ TARCÍSIO GIFFONI DE CARVALHO JÚNIOR
Co-Investigadores: Miguel Cendoroglo Neto (orientador); Maria Aparecida Dalboni
Disciplina/Departamento: Nefrologia/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **"Efeito das toxinas urêmicas, P-cresol e espermidina no mecanismo de apoptose e função dos PMNs".**

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo clínico observacional caso e controle.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem risco, desconforto leve com coleta de sangue.
OBJETIVOS: Estudar a via de indução pela qual as toxinas urêmicas; poliaminas e p-cresol induzem a apoptose de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs)do sangue periférico.
RESUMO: Serão admitidos indivíduos acima de 18 anos que não estão em uso de qualquer tipo de medicação, sem história de infecção recente (menor 1 mês) e sem doenças de base e mulheres não grávidas Serão submetidos a coleta de sangue de 30 doadores saudáveis voluntários e os PMNs serão separados, incubadas com toxinas p-cresol e espermidina por 24 horas e após serão preparadas para o estudo de apoptose com anexina e realizada a leitura das amostras em citômetro de fluxo e será avaliado o papel do sistema Faz/ligante do faz, bcl-2, caspases e CD11b e resposta aos fatores de crescimento utilizando anticorpos monoclonais específicos.
FUNDAMENTOS E RACIONAL: A elucidação da via de ativaçãode apoptose de PMNs induzidas pelas principais toxinas urêmicas, no futuro podem contribuir para a escolha da melhor forma de bloquear este mecanismo nessas células e desta forma impedir a evolução das comorbidades que estão associadas a pacientes com IRCTerminal.
MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos laboratoriais que serão relizados por equipe especializada.
TCLE: adequado.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp R$ 6603,00.
CRONOGRAMA: 24 meses.
OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **22/12/07** e **21/12/08**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

UNIFESP
PAULISTA
ESCOLA MEDICINA

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162