Anna Rita Moraes de Souza Aguirre Mazo

**Avaliação dos efeitos do betabloqueador nebivolol sobre o
peritônio em modelo experimental murino de diálise
peritoneal**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Hugo Abensur

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mazo, Anna Rita Moraes de Souza Aguirre

Avaliação dos efeitos do betabloqueador nebivolol sobre o peritônio em modelo experimental murino de diálise peritoneal / Anna Rita Moraes de Souza Aguirre Mazo. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientador: Hugo Abensur.

Descritores: 1.Diálise peritoneal 2.Fibrose peritoneal 3.Neovascularização patológica 4.Soluções para diálise 5.Ultrafiltração 6.Transporte biológico 7.Antagonistas adrenérgicos 8.Modelos animais

USP/FM/DBD-302/11

Dedicatória

Para Tuchi, Beto, Gui e Daniel, meus exemplos de trabalho, esforço, honestidade e principalmente, de amor e dedicação incondicionais à família. Obrigada por tudo. Amo vocês também.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, que permitiu a presença constante dessas pessoas fantásticas no meu caminho, tornando-o mais belo e mais fácil de percorrer:

- Minha família, que principalmente através do exemplo cotidiano permitiu que valores morais sólidos fossem cunhados em minha personalidade e maneira de viver, tanto no âmbito pessoal quanto profissional.

- Meu marido, que me apoiou e, com muito amor, tolerou minha ausência durante os meses que passei na Espanha, além das minhas freqüentes ausências (de corpo presente) ao longo da confecção dessa tese, não me deixando desanimar (essa tarefa não foi fácil).

- Dr Hugo Abensur, exemplo de excelência médica e caráter que, sempre de bom humor, compartilha seus conhecimentos de maneira generosa com todos a seu redor, fazendo-se a melhor tradução das palavras “orientador” e “professor”.

- Dr Rui Toledo Barros e Dr João Egídio Romão Jr, que possibilitaram minha estadia na Espanha.

- Dr Antonio Carlos Seguro e todos os colegas do LIM-12, que generosamente me receberam em seu laboratório.

- Dra Maria Heloísa Massola Shimizu, que me acolheu de braços abertos e me apresentou ao mundo dos modelos experimentais, tornando-se minha amiga ao longo do tempo de convivência.

- Abelardo, Lupe, Luiz e Vanessa: agradeço infinitamente pela acolhida em seu laboratório, que permitiu a execução desse projeto. A generosa e espontânea doação de seu tempo, conhecimento, confiança e amizade foi espantosa e inesquecível. Vocês são amigos que trago no coração.

- Nivaldo, Pedro, Eliana, Ciça e Eloá: seu auxílio foi fundamental para o bom andamento desse trabalho.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Histórico	1
1.1.1. Os princípios da diálise - difusão e ultrafiltração	1
1.1.2. O peritônio e a diálise peritoneal.....	1
1.1.3. A diálise clínica	2
1.1.4. Diálise peritoneal prolongada	5
1.1.5. O cateter de Tenckhoff e outras evoluções técnicas	6
1.2. Epidemiologia da diálise peritoneal.....	7
1.3. Modelos de transporte através da membrana peritoneal	9
1.4. Avaliação clínica do transporte de fluidos e solutos pela membrana peritoneal	17
1.4.1. O teste de equilíbrio peritoneal (Peritoneal Equilibration Test, PET)	18
1.5. Falência de ultrafiltração	24
1.5.1. Definições, aspectos epidemiológicos e clínicos.....	24
1.5.2. Fisiopatologia da UFF	27
1.5.3. Causas de lesão peritoneal e falência de ultrafiltração	28
1.5.4. Neoangiogênese.....	30
1.5.5. Fibrose e transição epitélio-mesenquimal.....	33
1.6. Estratégias farmacológicas de proteção à membrana peritoneal.....	37
1.7. β -bloqueadores, doença cardiovascular e diálise peritoneal.....	38
1.8. Nebivolol.....	40
2. Objetivos	43
2.1. Objetivos principais.....	43
2.2. Objetivos secundários.....	43
3. Métodos	44
3.1. Avaliação do transporte de solutos	45
3.2. Avaliação do transporte de fluidos	45
3.3. Coleta de material para análise histológica.....	46
3.4. Análise da espessura da membrana peritoneal	46
3.5. Imunohistoquímica (pan-citoqueratina, CD-31, podoplanina).....	46
3.6. ELISA [dosagem das interleucinas (ILs) 6 e 10]	47
3.7. Análise estatística	47
4. Resultados.....	48

4.1. Volume de ultrafiltração – NUF	48
4.2. Transporte de solutos	48
4.3. Espessura da membrana peritoneal	49
4.4. Pan-citoqueratina	51
4.5. CD-31.....	52
4.6. Podoplanina	53
4.7. Dosagem de IL-6 e IL-10 no dialisato	54
5. Discussão e conclusões	55
6. Referências.....	62

Resumo

Mazo ARMSA. Avaliação dos efeitos do betabloqueador nebivolol sobre o peritônio em modelo experimental murino de diálise peritoneal. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

A falência de ultrafiltração (UFF) é uma causa importante de interrupção da diálise peritoneal (DP) enquanto terapia renal substitutiva. Além da inflamação crônica e aguda causadas à membrana peritoneal (MP) pelos produtos de degradação da glicose, produtos avançados da glicosilação, pH ácido das soluções e infecções, β -bloqueadores (BB) também foram implicados na gênese da UFF. A vasoconstrição arteriolar esplâncnica é considerada a causa provável da UFF por BB. O nebivolol (NV), um bloqueador β 1-adrenérgico altamente seletivo que, diferente de outros BB, possui efeito vasodilatador por aumento de óxido nítrico (NO) por ativar a via L-arginina-NO, foi testado em pacientes idosos com ICC e levou à redução na mortalidade. O objetivo desse estudo é analisar os efeitos do NV sobre a ultrafiltração (UF), MP e características do efluente em um modelo animal de DP, através do estudo de fenômenos envolvidos na degeneração da MP e UFF, como transição epitélio mesenquimal (EMT) e fibrose, além de parâmetros humorais e celulares de inflamação. 21 camundongos C57BL/6 fêmeas, não urêmicos, com 12 a 14 semanas, foram submetidos à colocação de cateter peritoneal. Após uma semana, foram divididos em 3 grupos de 7 animais: grupo controle (observação 30 dias), grupo SDP (2 mL/dia de solução glicosada de diálise peritoneal a 4,25% através do cateter, por 30 dias) e grupo NV (além da infusão, receberam 8 mg/kg/dia de NV por gavagem, por 30 dias). Após 30 dias, comparou-se espessura submesotelial, volume de UF, velocidades de transporte de pequenos solutos, marcação submesotelial de pan-citoqueratina, para quantificar EMT, contagem de vasos, linfangiogênese diafragmática e concentração de IL-6 e IL-10 no efluente. A espessura da MP foi de 23,14 μ m no grupo controle, no grupo SDP foi de 102,4 μ m e no grupo NV, 29,04 μ m, com $p < 0,05$. O volume de UF foi 1,94 mL para o grupo controle, para o grupo SDP, 1,56 mL e, para o grupo NV, 2,05 mL, também com $p < 0,05$. Houve menor EMT, menor angiogênese e tendência a transporte mais lento de solutos no grupo tratado, assim como menor concentração de IL-6 e proporções de populações de linfócitos semelhantes às do grupo controle. Concluímos que a droga impediu o desenvolvimento de UFF, através do bloqueio de fenômenos como EMT, espessamento da MP e neoangiogênese, além de preservar características de imunidade celular e humoral locais, merecendo ser estudada em pacientes submetidos à DP.

Descritores: Diálise peritoneal; Fibrose peritoneal; Neovascularização patológica; Soluções para diálise; Ultrafiltração; Transporte biológico; Antagonistas adrenérgicos; Modelos animais

Abstract

Mazo ARMSA. *Assessment of the effects of beta-blocker nebivolol on the peritoneum in an experimental murine model of peritoneal dialysis*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Ultrafiltration failure (UFF) is a major cause of peritoneal dialysis (PD) discontinuation. Besides peritoneal membrane (PM) acute and chronic inflammation caused by glucose degradation products, advanced glycation end-products, acidic pH of the solutions and peritoneal infections, also β -blockers (BBs) have been implicated in UFF genesis. Splanchnic arteriolar vasoconstriction has been considered the probable cause of UFF induced by BBs. Nebivolol (NV), a highly selective β ₁-adrenergic blocker, unlike other BBs, has a vasodilatory effect caused by its ability to increase nitric oxide (NO) through L-arginine-NO pathway activation. NV has been tested in elderly patients with congestive heart failure and led to mortality reduction. The aim of this work is to analyze the effects of NV over ultrafiltration (UF), PM and effluent characteristics in an animal model of PD. For that end, phenomena known to be involved in PM degeneration and UFF, such as epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), fibrosis, as well as cellular and humoral parameters of inflammation have been studied. 21 C57BL/6 female non uremic mice, ageing 12 to 14 weeks, underwent peritoneal catheter placement. One week later, they were divided into 3 groups of 7 animals: control group (observation for 30 day), PDF group (2 mL/ day of 4.25% dextrose peritoneal dialysis fluid injected through the catheter for 30 days) and NV group (besides the PDF infusion, this group received 8 mg/ kg/ day of NV by gavage, for 30 days). After 30 days, submesotelial thickness, UF volume, small solute transport speed, submesotelial pan-cytokeratin staining (EMT quantification), vessel count, diaphragmatic lymphangiogenesis and IL-6 and IL-10 concentrations in the effluent were compared. PM thickness was 23.14 μ m in the control group, 102.4 μ m in the PDF group and 29.04 μ m in the NV group, $p < 0.05$. UF volume was 1.94 mL in the control group, 1.56 mL in the SDP group, and in the NV group, 2.05 mL, $p < 0.05$. There was less EMT, less angiogenesis and a tendency to a slower solute transport in the treated group. Lower levels of IL-6 and similar lymphocyte populations' proportions to the control group were also found. We conclude that the drug can prevent UFF development, through blockade of phenomena such as EMT, PM thickening and neoangiogenesis, while characteristics of local cellular and humoral immunity were preserved. These results warrant a clinical study of the drug in PD patients.

Descriptors: Peritoneal Dialysis; Peritoneal Fibrosis; Pathologic Neovascularization; Dialysis Solutions; Ultrafiltration; Biological Transport; Adrenergic Antagonists; Animal Models

1. Introdução

1.1. Histórico

1.1.1. Os princípios da diálise - difusão e ultrafiltração

René Henri Joachim Dutrochet (1776–1846) e Thomas Graham (1805–1869) são considerados por alguns autores o “avô” e o “pai” da diálise moderna.¹

Dutrochet foi o responsável pela introdução do termo *osmose*. Utilizou-o para designar o movimento da água através de membranas que permitem sua passagem seguindo um gradiente de concentração, ao mesmo tempo em que dificultam o trânsito de solutos. Descreveu, portanto, o princípio da ultrafiltração.

Graham definiu as leis que regem a difusão dos gases (“a taxa de difusão de um gás é inversamente proporcional à raiz quadrada de seu peso molecular”), estudou a força osmótica, a separação de líquidos biológicos por diálise e deu ao termo *diálise* sua conotação atual, definindo-a como a difusão de solutos através de um material gelatinoso. Introduziu também o conceito de membrana semipermeável e distinguiu cristalóides de colóides, baseado em sua capacidade de atravessar tal membrana e de se cristalizar. Por fim, demonstrou que a uréia, presente na urina, pode ser transportada através de uma membrana semipermeável por diálise, o que tornou seu trabalho a base teórica da diálise clínica.

1.1.2. O peritônio e a diálise peritoneal

O primeiro relato médico da cavidade peritoneal está no papiro Egípcio de Ebers, datado de 1500 AC, como uma “entidade definida na qual as vísceras estão suspensas

de alguma forma”. Nos tempos do império Romano, descrições completas da cavidade peritoneal e do peritônio foram feitas pelo médico grego Galeno, que o estudou nas lesões abdominais dos gladiadores que tratava.² Já na segunda metade do século XIX, von Recklinghausen³ fez uma exposição minuciosa da cavidade, incluindo seu revestimento por células mesoteliais e sua drenagem linfática.

Em 1877, Georg Wegner publicou os primeiros resultados de experimentos em coelhos, nos quais injetava soluções hipertônicas de açúcar, sal ou glicerina pela via intraperitoneal (IP) e notava aumento do volume de fluido intracavitário. Com soluções hipotônicas, notava redução do volume.⁴

No fim do mesmo século, Beck, Kolossow,⁵ os fisiologistas Starling e Tubby⁶ acrescentaram mais dados sobre o mesotélio, os linfáticos e o transporte de fluidos e solutos através da membrana peritoneal. Naquele momento, concluiu-se que a troca de solutos se dava basicamente entre a solução infundida na cavidade e o sangue e que os linfáticos teriam menor importância sobre o transporte.

No início do século XX, Cuningham estudou a absorção de glicose da cavidade peritoneal⁷ e Putnam descreveu o peritônio do cão como uma membrana semipermeável, com base nos princípios de osmose e difusão. Seu trabalho já incluía observações sobre o tempo de permanência das soluções na cavidade, taxas de fluxo, remoção de fluido e troca de vários solutos.⁸

1.1.3. A diálise clínica

Em 1913–1914, Abel, Rowntree e Turner já trabalhavam com objetivo específico de substituir os rins na eliminação de toxinas urêmicas, desenvolvendo um “rim artificial”

com membranas de colódio.⁹ Apenas estudos em animais haviam sido realizados até 1914, quando a 1ª guerra mundial os interrompeu.

Dez anos depois, Georg Haas⁵ foi responsável pela primeira hemodiálise (HD) em humanos, na Alemanha, onde também Heinrich Necheles pesquisava membranas para diálise extracorpórea.¹⁰ Necheles iniciou trabalhos com boudruche (membrana preparada com peritônio visceral de ovelhas, utilizada em mineração e em instrumentos musicais) e, nesse contexto, Ganter encontrou substrato para realizar a primeira diálise peritoneal (DP) em humanos, em 1923.¹¹

Antes da DP, Ganter submeteu um paciente à “diálise pleural”, com infusão e drenagem de 750 mL de solução fisiológica na cavidade torácica. Após realizar testes em modelos experimentais de uremia, iniciou DP em humanos. Em sua primeira paciente, usou solução fisiológica e reconheceu rapidamente que eram necessários grandes volumes para boa eficiência, que o tempo de permanência influenciava as trocas e que solução hiperosmótica deveria ser utilizada para promover balanço negativo. Registrou também a necessidade de uma via de acesso adequada para garantir os fluxos e que a infecção era a principal complicação. Interrompeu seus experimentos e, nos 25 anos que se seguiram, apenas 101 pacientes receberam tratamento com lavagem peritoneal, com variações nos volumes, soluções utilizadas, posologias e vias de acesso.

Vazamentos, contaminações, obstruções e perfurações de vísceras foram freqüentes nesse período, com alta mortalidade dentre os pacientes tratados, mas havia então uma nova possibilidade terapêutica na insuficiência renal aguda grave de causa reversível. Depleção protéica, distúrbios no equilíbrio hídrico e ácido-básico também

eram descritas, levando pesquisadores como Odel a advogar que a composição do fluido era essencial para o sucesso do tratamento.¹² Ele idealizava uma solução que ao mesmo tempo permitiria a difusão máxima das escórias, traria leve desidratação, mas não causaria irritação no peritônio e não mudaria a composição eletrolítica do plasma.

Após a 2ª Guerra, Howard Frank, Arnold Seligman e Jacob Fine, de Boston, iniciaram trabalhos com cães ¹³ e, em 1945, iniciaram DP em pacientes com insuficiência renal aguda.¹⁴ Utilizavam um grande sistema fechado de “irrigação contínua intermitente”, no qual a solução ficava em garrafas Pyrex de 20 L. Rapidamente seus intentos obtiveram fama, apesar de Wear, Sisk e Trinkle terem sido os primeiros a tratar um paciente com insuficiência renal aguda obstrutiva com DP com sucesso.¹⁵ A peritonite se mantinha como o principal risco da técnica, sendo que dos 18 pacientes tratados pelo grupo de Fine, apenas 4 sobreviveram.

A partir daí, diversos grupos passaram a testar diferentes soluções, sistemas manuais, sistemas automáticos e diferentes vias de acesso, mas não se conseguia diminuir significativamente a incidência de peritonites, que limitavam o uso da terapia.

Nessa fase de pesquisas, destacaram-se Arthur Grollman,¹⁶ pelo desenvolvimento de protocolos de antissepsia e novos modelos de cateter e Morton Maxwell, pelos aprimoramentos adicionais nas vias de acesso à cavidade, nas soluções de diálise e por possibilitar a disponibilização comercial do aparato para DP.¹⁷ Suas contribuições permitiram a aceitação disseminada da modalidade na terapêutica da insuficiência renal aguda, no início dos anos 60.

1.1.4. Diálise peritoneal prolongada

Mae Stewart, de 33 anos, foi a primeira paciente com doença renal crônica a ser tratada com DP, em 1959, em São Francisco.¹⁸ Era internada semanalmente para o tratamento e ocasionalmente recebia antibióticos profiláticos para evitar infecções. Já no início da década de 60, vários centros começavam a oferecer o tratamento para doença renal crônica em estágio final, com resultados ainda desapontadores e com sobrevida limitada a poucos meses, ainda devido às freqüentes peritonites.¹⁹

Scribner, Quinton e Boen, em Seattle,²⁰ Merrill, em Boston e Garrett,²¹ em Nova York lançaram no início de 1962 programas de DP crônica, com punção da cavidade a cada sessão. O grupo de Seattle foi também responsável pelo primeiro equipamento automático de DP, baseado no sistema fechado desenvolvido previamente por Frank, Seligman e Fine, que visava minimizar o risco de contaminação a cada troca e a necessidade do auxílio contínuo de uma enfermeira.²² A solução estéril voltou para os grandes tanques, de onde era bombeada para um reservatório elevado, e era infundida por gravidade. O influxo, permanência e drenagem eram monitorados por cronômetros e pinças automáticas, com permanências de 30 minutos. Novamente, era inconveniente o tamanho do equipamento, que dificultava o manejo e requeria locais especiais para seu preparo e esterilização.

Após tentativas de utilizar, sem sucesso, um conduto intraperitoneal permanente, pelo qual se introduzisse o cateter a cada sessão de modo a evitar paracenteses freqüentes,²³ Boen se convenceu, em 1964, que deveria voltar às punções repetidas.²⁴ Seu próximo paciente dialisava uma vez por semana, por 14 a 22 horas, e mantinha boa qualidade de vida e não teve peritonites por 8 meses.

1.1.5. O cateter de Tenckhoff e outras evoluções técnicas

Em 1965, quando se tornava consenso realizar DP pelo menos duas vezes por semana, Henry Tenckhoff, um médico alemão que trabalhava com Boen, reconheceu que, apesar da experiência prévia negativa, um acesso permanente seguro era crucial para tornar a DP domiciliar viável, pois até então, cada sessão de diálise era iniciada pelo médico no domicílio do paciente logo após a punção da cavidade.²⁵ Trabalhou sobre o cateter de Palmer–Quinton, que acreditava ser o mais apropriado.²⁶ Com o acréscimo de dois coxins de Dacron, entre outras modificações, levou seu modelo a ser o mais utilizado até hoje.²⁷ Um dos coxins era locado na cavidade, em contato com o peritônio parietal e o outro no subcutâneo. A barreira fibrosa formada ao redor do Dacron permitiu melhor fixação do dispositivo e diminuiu as contaminações, sendo a maior inovação na técnica até então e o fator que mais promoveu sua disseminação.

Considerando a taxa de geração diária de uréia, Moncrief e o engenheiro biomédico Popovich realizaram a primeira “diálise peritoneal portátil de equilíbrio”, posteriormente chamada de “diálise peritoneal ambulatorial contínua-DPAC”, em 1975, no Texas. Realizavam, por dia, 5 infusões de 2 litros, com permanências de pelo menos 3 horas, almejando atingir a cada troca o equilíbrio entre dialisato e plasma. Tiveram excelentes resultados.²⁸

Oreopoulos, em Toronto, após converter todos seus pacientes a essa modalidade, passou a acondicionar a solução em sacos plásticos, diminuindo o aparato e facilitando a logística da DP. Através de melhorias dos equipos e conexões, obteve a mais baixa taxa de peritonites até então: um episódio a cada 10 meses.²⁹

A próxima inovação mais relevante foi trazida por Umberto Buoncristiani, na Itália: o conector em Y, que dispensava que o paciente carregasse a bolsa vazia entre infusão e drenagem da solução.³⁰

Simplificada, a DPAC passou a ter adeptos em todo o mundo e, hoje, a diálise peritoneal se mantém, do ponto de vista mecânico, semelhante ao início da década de 1980.

No Brasil, o nefrologista Emil Sabagga, após treinamento com Merrill, em Boston, foi o responsável pela realização da primeira DP do país, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em 1962, mantendo o paciente em questão em DP por 5 meses. Dezoito anos depois, em 1980, Miguel Riella, iniciou o primeiro programa de DP crônica na cidade de Curitiba, Paraná.³¹ No HCFMUSP, o programa crônico de DP foi iniciado no ano de 1984 por João Egídio Romão Jr. e, de 1992 até o presente está sob responsabilidade do Prof. Dr. Hugo Abensur.

1.2. Epidemiologia da diálise peritoneal

De acordo com o último censo divulgado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), com dados de janeiro de 2009, há uma prevalência estimada de 405 pacientes por milhão de habitantes em terapia renal substitutiva (TRS) no Brasil.³² Para a mesma data, o IBGE considerou a população brasileira como de 191.480.630, o que leva a um total estimado de 77500 pacientes em TRS.

Dentre esses 77500 pacientes, a SBN estima que cerca de 90% estão em esquema de HD e 10% em DP. Destes, 5,8% estão em diálise peritoneal automática (DPA), 4,5% em

diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC) e 0,2% em diálise peritoneal intermitente (DPI).

Dados de 2008, que não incluem a estatística brasileira, mostram que 8% dos pacientes em TRS no mundo estavam em DP, sendo que 69% se encontravam em HD e 23% em acompanhamento por transplante renal. Quando se consideraram apenas as modalidades dialíticas, tem-se que 10,4% dos pacientes estavam em DP. No entanto, existe uma variabilidade regional muito grande. Hong-Kong reportou em 2006 uma prevalência de DP de 88%, o México, 70%, a Nova Zelândia, 39%, Suécia e Holanda 22 e 23%, Estados Unidos, 7% e Argentina, 4%.³³

Nos Estados Unidos, notou-se queda da indicação da DP como terapia inicial, apesar de a morbimortalidade relacionada a essa modalidade ter diminuído nas últimas décadas, mostrando melhoria da técnica. Trata-se de um país que sempre teve baixa incidência e prevalência de DP. Esse dado tem sido atribuído à educação formal insuficiente dos nefrologistas e, portanto, pequena oferta da técnica aos pacientes portadores de DRC V, que poderiam optar por ela. Nota-se também que, dentre os pacientes em DP, houve aumento da proporção que utiliza a DPA, com 58% do total em 2004, mesmo na ausência de evidências de sua superioridade. Pelo contrário, existem indícios de que haja menor remoção de sódio e maior perda de aminoácidos com a DPA.³⁴

Em relação aos dados brasileiros, os números não podem ser considerados a expressão da verdade, devido à baixa taxa de resposta ao censo nacional por parte dos centros de diálise. Existem tentativas de criação de bancos de dados particulares, estimulados pela indústria. O dado que obtivemos, apesar disso, está de acordo com a prevalência média mundial, em torno de 10% dos pacientes em diálise.

1.3. Modelos de transporte através da membrana peritoneal³⁵

A barreira peritoneal foi inicialmente descrita por Karl Nolph como um complexo sistema de resistências à passagem de moléculas: o lúmen capilar, os intervalos intercelulares, uma camada resistiva abaixo desses intervalos, o interstício, o mesotélio e camadas de fluido em estase na face serosa do mesotélio.³⁶

Esse conceito sofreu simplificações, através da sugestão, por Flessner e cols, do modelo distribuído (MD) de transporte na DP. Neste, são consideradas como barreiras potenciais apenas o peritônio anatômico, a interação matriz intersticial-celular ao redor dos vasos e o endotélio capilar.³⁷

Dentre os três componentes, o peritônio mostrou ter resistência insignificante ao fluxo hídrico e à difusão de solutos. Já os capilares mostraram ser a principal resistência à ultrafiltração.³⁸

Considerando a parede desses capilares como a principal barreira determinante do transporte de moléculas entre o plasma e a cavidade, foi desenvolvido o modelo de três poros (MTP), por Rippe e cols. Esse modelo foi elaborado para reproduzir matematicamente o comportamento da membrana peritoneal em relação à passagem de fluidos e solutos na DP.

O MTP nasceu como o “Modelo de poros”, que descrevia na membrana poros pequenos e grandes, com raios de 43 e 250 Å, respectivamente.

De acordo com o modelo, 99,7% da difusão de pequenos solutos e 90% do coeficiente de ultrafiltração peritoneal (L_pS) se devem aos poros pequenos.

A minoria dos poros, com menos de 0,01% de sua população, tem cerca de 250 Å de raio. Através desses, proteínas passam praticamente sem barreiras do plasma para o peritônio.

O MTP se baseia nos coeficientes de *sieving* e de reflexão dos diferentes poros, que determinam a intensidade do transporte por difusão ou por convecção através do peritônio. O coeficiente de *sieving* (S) descreve o transporte de um soluto por convecção (ou arraste) através da membrana enquanto o coeficiente de reflexão (σ) descreve a efetividade osmótica desse soluto sobre a membrana.

O MTP prediz coeficientes de reflexão menores que 0,1 para pequenos solutos na membrana, enquanto os coeficientes de *sieving* são da ordem de 0,5 a 0,6. Em uma membrana com poros homogêneos, espera-se que $S=1-\sigma$, ou seja, que o total da massa de soluto se divida entre a fração que atravessa a membrana e a que é refletida gerando gradiente osmótico no compartimento de origem. Nota-se que, no peritônio, há uma discrepância de valores: a soma de S e σ não se iguala à unidade, quando se consideram apenas dois tamanhos de poros. Quando se adiciona uma terceira categoria de poro no modelo, o ultraporo ou poro ultrapequeno, com 3 a 5 Å, pelos quais apenas água livre de soluto seria capaz de passar, esse desajuste fica compensado. Esses poros são responsáveis por 1,5 a 2% do L_pS e por cerca de 40% da osmose gerada pelo gradiente de glicose nas primeiras quatro horas de permanência de solução glicosada hipertônica na cavidade.

Morfológicamente, os poros pequenos seriam representados pelas fendas intercelulares do endotélio,^{39, 40} dado que ainda não foi totalmente aceito.⁴¹

Quanto aos poros grandes, seu representante no peritônio também não está estabelecido, mas uma das vias já consideradas foi o transporte ativo através de vesículas. Essa possibilidade perdeu força após experimentos que paralisavam o metabolismo das células endoteliais⁴² ou o transporte transcelular, nos quais não houve comprometimento do transporte de proteínas. Organelas vesiculares vacuolares (VVO) têm também sido apontadas como possíveis representantes dos grandes poros. São agrupamentos de vesículas e vacúolos citoplasmáticos em cachos de uva, que se comunicam por fenestras com abertura e fechamento regulados por diafragmas.⁴³ Tais estruturas foram evidenciadas em células tumorais e estão relacionadas com a permeabilidade vascular de tumores. Outros possíveis candidatos são os intervalos intercelulares, 3 a 4 vezes maiores que as fendas intercelulares comuns.⁴⁴

Quanto ao ultraporo, sua representação morfológica no peritônio se dá pelas aquaporinas (AQPs). A aquaporina-1 (AQP-1), que aparece nas células do túbulo proximal e já foi evidenciada em vários epitélios não fenestrados, é encontrada, tanto como RNAm quanto proteína, nas células endoteliais dos capilares peritoneais.⁴⁵

Na existência de gradiente osmótico, ocorre transferência de água livre entre plasma e solução de diálise através desses canais. A diluição inicial de solutos como Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} nas primeiras horas de permanência da solução, momento em que o gradiente osmótico é maior, deve-se à intensa passagem de água livre de íons à cavidade através da AQP-1.

Atualmente, porém, questiona-se se a AQP-1 seria o único representante dos ultraporos na membrana peritoneal.⁴⁶ O fluxo típico da difusão de água através de tecido biológico de mamíferos, sob um gradiente osmótico de 500 mosm/kg, é de 1

$\mu\text{L}/\text{min}/\text{cm}^2$. Cálculos mostraram que os vasos próximos ao peritônio não têm fluxo sanguíneo suficiente para manter o fluxo de fluido nessa intensidade. Assim, outros transportadores têm sido avaliados como participantes da ultrafiltração.

Têm-se considerado como possível via os feixes musculares submesoteliais. As células musculares são relativamente grandes e estão expostas a diferentes concentrações de solutos em suas faces opostas, já que a concentração do agente osmótico é decrescente no tecido quanto maior a distância da cavidade. Essas células expressam AQP-4 em suas membranas, que permite o fluxo de líquido a favor do gradiente osmótico que existe em cada face da membrana, de maneira que pode se estabelecer um fluxo contínuo de água, em direção à cavidade, através dos feixes musculares. Na medida em que a célula perde água ao interstício na sua face peritoneal e aumenta sua osmolaridade citoplasmática, há entrada de água na outra face, onde o interstício se tornou hipotônico, enquanto houver gradiente osmótico. Esse processo ainda é baseado em trabalhos teóricos^{47,48} e faltam provas consistentes.

Esse modelo de transporte também considera essencial a ação das forças de Starling sobre a dinâmica dos fluidos através da membrana, enquanto a drenagem linfática teria um papel pequeno.

De acordo com o princípio clássico de Starling, na situação fisiológica, o gradiente hidrostático transcapilar (ΔP), que favorece o fluxo de fluido dos microvasos para o interstício, é quase completamente equilibrado pelo gradiente coloidosmótico gerado pelas proteínas plasmáticas ($\sigma\Delta\pi_{\text{prot}}$), que favorece o fluxo em direção contrária. Nessa situação, existe um fluxo de equilíbrio através dos poros pequenos e grandes, pelos quais se mantém a passagem de proteínas, já que não há restrição por tamanho nessas

estruturas. Assim forma-se o ultrafiltrado intersticial (linfa), sendo 50 % dele oriundos dos grandes e 50 % dos pequenos poros.

Em condições normais (sem DP), o ΔP através dos capilares peritoneais é estimado em 18 mmHg e a pressão intersticial em -2 mmHg. O $\sigma\Delta\pi_{\text{prot}}$ efetivo contrário é de cerca de 17 mmHg, para uma pressão coloidosmótica de 27 mmHg no plasma e 8 mmHg no fluido intersticial.^{49,50} Isso leva a um desequilíbrio das forças de Starling da ordem de 1 mmHg, em direção ao interstício. Para um L_pS da membrana peritoneal de 0,08 ml/min/mmHg,⁵¹ assume-se uma UF total de 0,1 mL/min, que gera um fluxo linfático da mesma magnitude.

Durante a DP, a infusão de grandes volumes de solução glicosada na cavidade muda drasticamente a dinâmica das forças de Starling.

Primeiramente, a pressão hidrostática na cavidade se torna positiva, em torno de 5 a 6 mmHg.⁵² A pressão hidrostática capilar (P_c) também aumenta, podendo chegar até 18 mmHg, secundariamente a compressão do volume abdominal sobre a veia cava (cerca de 80% dessa pressão é transmitida retrogradamente até o nível capilar). O ΔP cai então para cerca de 12 mmHg.

A pressão coloidosmótica na cavidade também diminui logo após a infusão do primeiro banho e, após algumas trocas, fica entre 0 e 2 mmHg. O gradiente efetivo de pressão coloidosmótica aumenta para 23,4 mmHg.

Nessa nova situação, há um gradiente pressórico de 11,4 mmHg a favor da reabsorção de fluido do peritônio ao plasma, da ordem de 0,9 mL/min (L_pS 0,08). Há também aumento da reabsorção linfática para 0,2 a 0,3 mL/min,⁵³ levando a uma reabsorção

total de líquido da ordem de 1,1 a 1,2 mL/ min. Utiliza-se então um agente osmótico na DP, geralmente glicose, para obter um fluxo de líquido em direção contrária, possibilitando atingir um balanço negativo para o paciente.

O fluxo total de fluido (J_v) através da membrana peritoneal poderia ser descrito pela seguinte equação:

$$dV/dt = J_v = L_p S (\Delta P - \sigma_{prot} \Delta \pi_{prot} - \sigma_g \Delta \pi_g - \sum_{i=1}^n \sigma_i \Delta \pi_i) - L,^{35}$$

Onde V é o volume IP, t é o tempo de permanência e $L_p S$ (coeficiente de ultrafiltração), σ_{prot} (coeficiente de reflexão de proteínas) e $\Delta \pi_{prot}$ (gradiente de pressão coloidosmótica) definem as forças de Starling, conforme discutido. σ_g refere-se ao coeficiente de reflexão da glicose e $\Delta \pi_g$ é a diferença de pressão osmótica ideal para a glicose através da membrana (considerando σ de 1). O quarto termo no parêntese denota a soma de todos os outros agentes osmóticos efetivos. L se refere ao fluxo linfático.

Juntamente com os outros parâmetros do MTP, utiliza-se essa equação para construir curvas de volume por tempo $[V(t)]$ de acordo com diferentes concentrações de glicose, volumes infundidos, áreas de superfície vascular, $L_p S$, PS (coeficiente de permeabilidade ao soluto x área da superfície de troca, ou coeficiente da área de transferência de massa, MTAC) para glicose, volumes residuais e fluxos linfáticos. Também pode ser utilizada na avaliação do *sieving* de Na^+ e Ca^{2+} (refletido na queda brusca das concentrações desses íons nas primeiras 1 a 2 horas da permanência).⁵⁴ Nas análises da curva $V(t)$, nota-se que sua amplitude é diretamente relacionada à concentração de glicose, volume intraperitoneal (IPV) de fluido e coeficiente de UF

(L_pS) da membrana, e é inversamente proporcional ao MTAC (PS) da glicose.⁵⁵ Além disso, nota-se que maiores volumes IP levam à maior UF após 4 horas.

A elevação da pressão intraperitoneal (IPP) pode ter várias conseqüências no transporte peritoneal de fluidos, por causar drástica mudança nas forças de Starling, aumentar a superfície de contato e trocas entre solução de diálise e peritônio e pela possibilidade de levar a edema nos tecidos ao redor da cavidade peritoneal, antes de sua remoção total pelos capilares. Todas essas alterações contribuem para aumento da UF. De acordo com Abensur, há aumento de 5 mL/h na perda de fluidos a cada cmH₂O de aumento na IPP.⁵⁶ No entanto, uma parte desse aumento da pressão recairá sobre a veia cava e será retransmitida aos capilares do peritônio, com aumento do ΔP menor que o aumento inicial na IPP.

Cada trecho da curva $V(t)$ traz informações a respeito de diferentes parâmetros envolvidos no transporte através da membrana peritoneal. Quando se utilizam dados obtidos de duas permanências de 60 minutos, 1 com solução glicosada a 1,36% e outro a 3,86%, pode-se estudar porção inicial da curva e obter a condutância osmótica à glicose ($L_pS \cdot \sigma_g$).

Para um paciente mediano, o volume de UF (o volume drenado que excede o volume infundido) após 1 hora é aproximadamente 350 a 400 mL para a solução a 3,86% e 50 a 60 mL para 1,36%.⁵⁷ Com o auxílio de equações, obtém-se uma $L_pS \cdot \sigma_g$ da ordem de 3-4 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mmHg}$. Do ponto de vista prático, mais que 250 mL de diferença entre as UFs obtidas com as duas soluções representam uma condutância osmótica normal, enquanto valores menores que 200 mL podem indicar a presença de uma $L_pS \cdot \sigma_g$ diminuída. Esse teste pode auxiliar a avaliação clínica da UFF.⁵⁸

A fase tardia da curva pode fornecer informações sobre o *status* das forças de Starling nos capilares e sobre o fluxo linfático. Nessa fase, a curva é dependente da soma da reabsorção de fluido promovida por esses dois fatores. Para estudar esse período, permanências longas são necessárias, como durante a noite e há poucos dados de literatura a seu respeito. A inclinação da curva $V(t)$ nessa fase também é influenciada pelo coeficiente de UF da membrana (L_pS). Para um aumento da área da superfície vascular efetiva, há um aumento do L_pS (via S) e aumento da taxa de reabsorção de fluido.

Recentemente, o MTP tem sido considerado insuficiente para explicar a natureza das alterações fisiopatológicas da membrana peritoneal,⁵⁹ por tratar os capilares como isolados de qualquer influência do interstício, comportando-se da mesma forma que um hemodialisador. O MD, em contrapartida, tenta simular a barreira exercida pelo tecido poroso submesotelial e permite simular expansões nesse espaço, além de calcular a intensidade da difusão e convecção através dele.⁴⁸

Esse modelo mais recente recai, porém, no mesmo problema do MTP quando utiliza um sistema rígido de poros nas simulações de transporte transcapilar e ao não contemplar alterações patológicas vasculares. Sugeriu-se então a inserção no modelo da influência do glicocálice endotelial, uma matriz composta de fibras, inserida no interior dos poros. Isso melhoraria a capacidade do MD de simular de forma realista os processos fisiopatológicos.⁶⁰

O glicocálice, em outros leitos vasculares, limita por tamanho e carga elétrica a permeabilidade a dextrans e perturbações nesse componente resultam em aumento da permeabilidade vascular.⁶¹ Mostrou-se também que microvasos formados por

neoangiogênese têm glicocálice menos abundante e são significativamente mais permeáveis.⁶² Esses estudos ainda não foram reproduzidos em peritônio, mas alguns autores supõem a presença de processos semelhantes na neoangiogênese peritoneal e sobre o glicocálice dos neovasos, tanto no aumento transitório do transporte de pequenos solutos durante peritonites quanto na inflamação crônica vista após longo tempo em diálise peritoneal.

A inclusão do glicocálice nos modelos de estudo altera também a interpretação das forças de Starling sobre a membrana, por incluir um compartimento intermediário de contato e trocas de forças entre a cavidade e o interstício: o espaço entre o glicocálice e a membrana basal epitelial.

Os modelos atuais para estudo indireto do transporte pela membrana ainda são incapazes de contemplar de forma completa as alterações patológicas que se instalam com a DP e suas complicações, ainda demandando esforços para seu esclarecimento.

1.4. Avaliação clínica do transporte de fluidos e solutos pela membrana peritoneal

Enquanto membranas artificiais de HD têm características de transporte bem definidas e reprodutíveis, a membrana biológica da DP, o peritônio, é uma combinação de tecidos vivos, metabolicamente ativos, com características de transporte variáveis tanto entre indivíduos quanto ao longo do tempo num mesmo indivíduo. Essas variações afetam a cinética da DP, assim como sua eficiência, além de se relacionarem com a evolução clínica dos pacientes.⁶³

A importância das avaliações do transporte peritoneal se dá por trazerem informações que orientam a prescrição do esquema de DP, por medirem alterações do transporte

ao longo do tempo e por ajudarem na identificação e quantificação da gravidade da falência da membrana.⁶⁴

Vários testes clínicos servem a esse propósito. Eles permitem avaliação da curva $V(t)$, da taxa de absorção de fluido e de mudanças nas concentrações de diversos solutos ao longo do tempo, possibilitando calcular diversos coeficientes de transporte. Testes padronizados como o *Peritoneal Equilibration Test* (PET), o Fast-PET e o *Personal Dialysis Capacity test* (PDC) foram desenvolvidos com objetivo de inserir a análise do transporte na rotina clínica. Há também programas de computador baseados nesses testes, que oferecem alguns parâmetros calculados a partir dos dados inseridos, que permitem até mesmo simulações das respostas às mudanças no tratamento.

Alguns dos parâmetros que podem ser estimados através desses testes são o transporte de solutos de diferentes pesos moleculares, o coeficiente de restrição peritoneal, o transporte de fluidos, a Net UF (NUF, a diferença entre volume drenado e infundido), a UF transcapilar (TCUF, volume que passa dos capilares à cavidade peritoneal), o transporte de água pelos diferentes tamanhos de poros e a reabsorção linfática de fluidos.

1.4.1. O teste de equilíbrio peritoneal (Peritoneal Equilibration Test, PET)

Esse teste foi proposto por Twardowski et al. em 1987⁶⁵ e tem sido o mais utilizado na avaliação das características de transporte em pacientes pediátricos⁶⁶ e adultos⁶⁷ sob DPAC.

O teste prevê a infusão de solução de glicose a 2.27%, que permanece na cavidade por 4 horas. São colhidas amostras antes do teste, após 0, 10, 30, 60, 120 e 180 minutos da

infusão e logo após a drenagem. Coleta-se sangue ao final do teste e dosam-se solutos de baixo peso molecular (sódio, potássio, uréia, creatinina e glicose) e proteínas.

O transporte peritoneal de solutos é calculado pela razão das concentrações no dialisato e no plasma (razão D/P) de sódio, potássio, uréia, creatinina e proteína total. Para glicose, utiliza-se a razão de sua concentração no dialisato após 4 horas pela concentração inicial (G_4/G_0 ou D_4/D_{0gli}). O volume residual na cavidade pode ser calculado através da diluição inicial dos solutos e a NUF pela diferença entre volume drenado e infundido, podendo ser corrigida para o volume residual.

De acordo com a D/P_{Cr} , os pacientes podem ser classificados em 4 grupos de transporte de solutos: baixo, médio-baixo, médio-alto e alto.

O alto transportador foi definido ou como um paciente com D/P_{Cr} maior que a média mais 1 desvio-padrão ou D/D_0 menor que a média menos 1 desvio-padrão. Um médio-alto transportador tem um D/P_{Cr} entre a média e a média mais 1 desvio-padrão ou D/D_0 entre a média e a média menos 1 desvio-padrão. De forma análoga, definiram-se os outros dois grupos. Isso equivale a D/P_{Cr} maior que 0,81 para o alto transportador, entre 0,65 e 0,81 para o médio alto, entre 0,5 e 0,65 para o médio baixo e menor que 0,5 para o baixo.

No entanto, mesmo com razão D/P_{Cr} normal, pode-se ter um *clearance* peritoneal diminuído, se houver baixo volume de UF. Isso porque a massa removida de soluto depende do volume de UF e as razões D/P de pequenos solutos refletem mais a área de superfície da membrana peritoneal que a taxa de remoção de soluto. Portanto, uma mudança na nomenclatura das categorias foi proposta: nomeá-las de acordo com

tamanhos da área da superfície da membrana (pequena, média-pequena, média-grande, grande) ou de acordo com a velocidade do transporte (muito rápido, rápido, lento e muito lento).⁶⁸

A partir dessa classificação, foram desenvolvidas recomendações clínicas quanto a prescrição de DP,⁶⁹ adaptando-a às características de transporte.

Em relação à razão D/P de sódio, a velocidade de sua queda fornece dados a respeito do transporte de água livre.⁷⁰

Algumas desvantagens do teste são: informa somente a NUF, mas não a TCUF ou a reabsorção de fluidos; estimativas incorretas da NUF podem decorrer da falta de ajuste para superenchimento da cavidade,⁷¹ para a variação do volume residual inicial e final.⁷²

O PET pode ser enriquecido através de correção para a queda inicial da difusão de sódio⁷³ ou por medida do volume intraperitoneal após 1 hora de permanência, seguida de reinfusão da solução, que permite cálculo do transporte de água pelo método de La Milia sem influenciar os resultados do transporte de solutos e NUF.⁷⁴

Para diminuir custos e tempo com o teste, o próprio Twardowski⁷⁵ desenvolveu o PET rápido (Fast PET), que demonstrou boa correlação com PET original.⁷⁶ Nesta variante, colhem-se dialisato e sangue somente ao final do teste, para cálculo da D/P_{Ur} e D/P_{Cr} e verifica-se a NUF pela diferença entre volume drenado e infundido. Assim, também é possível categorizar os pacientes de acordo com o transporte de solutos nos 4 referidos grupos.

La Milia propôs outra variação do teste,⁷⁴ assumindo que o transporte de água com solução de glicose a 3,86% é máximo na primeira hora, enquanto o transporte difusivo de sódio é mínimo, devido ao baixo gradiente de concentração. O chamado “Mini-PET” é finalizado após 1 hora de permanência de solução a 3,86%.

Com ele, é possível calcular o transporte de água através dos poros pequenos, através da razão da massa removida de sódio pela concentração aquosa de sódio no plasma. Subtraindo-se esse valor da NUF, obtêm-se o transporte de água livre.

O Mini-Pet permite a classificação dos indivíduos de acordo com a velocidade do transporte, apesar de a concordância com a classificação pelo PET ser de apenas 80%. Permite também avaliar mudanças no transporte por poros pequenos e aquaporinas. No entanto, como é feito em uma hora, não é possível estabelecer o diagnóstico de falência de UF de acordo com a definição internacional, que será exposta a seguir.

O APEX (*Accelerated Peritoneal Examination*) é um teste francês, que através de um único número, transmite informação a respeito da velocidade do transporte.⁷⁷ O valor se refere ao ponto no tempo em que a concentração de glicose na solução de diálise (em porcentagem do valor inicial) se iguala à concentração de uréia (em porcentagem da concentração sérica), ou seja, onde as curvas da uréia e glicose se cruzam, chamado de ponto ótimo. Quanto menor o valor, menor o tempo do APEX e maior é a superfície vascular peritoneal. Não há estudos de comparação com outros testes.

Outro teste, o SPA (Análise da permeabilidade peritoneal padrão) ou PET modificado, permite a utilização do dextran 70 como marcador de volume, para trazer dados da cinética de fluidos.⁷⁸

O transporte peritoneal de solutos de baixa massa molecular (uréia, creatinina, ácido úrico e glicose) é calculado pelo SPA como coeficiente da área de transferência de massa (MTAC), que representa a área de superfície vascular peritoneal. O transporte de macromoléculas (β 2-microglobulina, albumina, IgG, α 2-macroglobulina) é calculado como *clearance* e a permeabilidade intrínseca da membrana à macromoléculas é caracterizada como coeficiente de restrição peritoneal (relação entre *clearance* peritoneal e tamanho da molécula em questão). A TCUF, a reabsorção linfática, o volume IP e NUF são calculados através da diluição e desaparecimento do marcador de volume.⁷⁹ Assim como no Mini-PET, TCUF pode ser separada em transporte de água transcelular e através de poros pequenos.

Outra opção de avaliação é o Teste de Adequação e Transporte em Diálise⁸⁰ (*Dialysis Adequacy and Transport Test - DATT*), que pode ser feito num dia de prescrição normal de CAPD. Coleta-se o volume total drenado, para aferição do volume e dosagem da creatinina, que possibilitam calcular a razão D/P_{Cr} e a remoção de fluido em 24 horas. É restrito à análise do transporte de soluto. Possui correlação de 0.81 com o PET.

Atualmente, os principais programas de computador disponíveis para avaliar o transporte de fluidos e solutos são o PD Adequest (Baxter Healthcare Corporation), o *Personal Dialysis Capacity Test* (PDC) (Gambro) e o *Patient On Line* (POL) (Fresenius Medical Care). Esses testes usam modelos matemáticos diferentes assim como procedimentos diferentes para coleta de dados.

O PD Adequest usa o modelo Pyle-Popovich, bicompartimental, e assume a membrana como homópóra.⁸¹ Alguns aspectos chave do MTP também foram incorporados. Ele

oferece MTACs, D/P_{Ur} , D/P_{Cr} , D_4/D_{0gli} , NUF, reabsorção de fluido e permeabilidade hidráulica.

Já o PDC é baseado no MTP de Rippe⁸² e estuda 5 banhos consecutivos, de durações e concentrações de glicose diferentes. Os próprios pacientes podem colher amostras de todas as bolsas drenadas e anotar os pesos das bolsas antes e após as trocas, assim como os tempos de infusão de drenagem. Amostras de sangue são colhidas no início e no fim do teste para determinação de sódio, uréia, creatinina, glicose e albumina.

Ele oferece um parâmetro da área de superfície peritoneal ($A_0/\Delta X$), proporcional ao MTAC, a taxa de absorção de fluido quando o gradiente de glicose já está dissipado (J_{VAR}), equivalente à taxa de reabsorção linfática somada à reabsorção proporcionada pela pressão coloidosmótica, e o fluxo pelos grandes poros (J_{VL}).

O software POL utiliza um modelo cinético de volume variável.⁸³ É feito durante 24 horas e também são anotados volumes de enchimento, tempos de permanência e concentrações de glicose para cada bolsa. Dialisato é colhido para uréia, creatinina e glicose. Ele calcula o PT50 (tempo requerido para alcançar 50% do equilíbrio do soluto), que representa a área de superfície vascular peritoneal, e as razões D/P. Também categoriza os pacientes quanto ao transporte.

Um problema em relação à utilização dos programas é que cada um deles oferece parâmetros exclusivos, impedindo comparação com dados de literatura ou de populações que utilizam programas diferentes. Além disso, não permitem separar o transporte de água pelos diferentes poros.⁶⁸

Muitos aspectos do transporte peritoneal podem ser medidos através dos testes clínicos. Dependendo da questão, como estudo do transporte de solutos pequenos, transporte de macromoléculas ou transporte de água pelas aquaporinas, um teste em especial pode ser escolhido, permitindo também quantificar os efeitos das soluções de diálise sobre a membrana e na monitorizar a evolução das alterações das características da membrana de um paciente específico.

1.5. Falência de ultrafiltração

1.5.1. Definições, aspectos epidemiológicos e clínicos.

A falência de ultrafiltração (UFF) é uma importante complicação da DP, que algumas vezes pode tornar inviável a manutenção desta modalidade terapêutica. Mais freqüentemente, quadros mais leves se manifestam e levam à prescrição de restrição hídrica, soluções com maiores concentrações de glicose ou de icodextrina, ciclos mais curtos e, eventualmente, ultrafiltração com um hemodialisador.

Apesar de ocorrer em qualquer estágio da DP, é mais comum uma instalação gradual da UFF ao longo do tempo de tratamento, sendo especialmente importante em pacientes tratados por longos períodos.^{84,85} Pode ser interpretada como uma categoria adicional na classificação quanto à velocidade do transporte de pequenos solutos, na qual ele seria mais intenso que no rápido transportador.

A definição de UFF foi muito discutida nas últimas décadas. Alguns autores utilizaram critérios clínicos para o diagnóstico, como a impossibilidade de manter o peso seco estimado ou a necessidade de usar mais de duas bolsas hipertônicas ao dia.⁸⁶ As definições clínicas, no entanto, estão sujeitas a vieses, já que sobrecarga de volume e

dificuldade de manter o peso seco podem também decorrer de ingestão excessiva de líquidos ou redução do débito urinário.⁵²

Visando uma padronização, outros autores utilizaram uma definição baseada no PET. Atualmente, pode-se considerar falência absoluta de UF a situação na qual o volume drenado é igual ou menor que o volume infundido na cavidade, após PET de 2 ou 4 horas com solução de glicose a 3,86% (UF total zero ou negativa, o que indica reabsorção de fluido). Já a falência relativa de UF pode ser definida como menos que 400 mL de UF total após o PET.⁴⁶ A solução de glicose a 3,86% é preferida em relação às menos concentradas, pois permite menor interferência das pressões hidráulicas na cavidade e de drenagens incompletas, além de permitir melhor estimativa do *sieving* de sódio.^{52,87}

Um estudo que utilizou os sinais clínicos para diagnóstico de UFF relatou prevalência de 31% nos pacientes tratados com DP há mais de 6 anos.⁸⁸ Outro trabalho obteve 51% de prevalência no mesmo tempo de acompanhamento, porém quando considerou a população total em DP, independente do tempo em tratamento, a prevalência de UFF com necessidade de mudança de modalidade terapêutica foi de 24%.⁸⁹

Considerando a definição baseada no PET, um trabalho mostrou prevalência de 36% em pacientes com tempo mediano em DP de 61 meses (48 a 144 meses)⁹⁰ e outro, 23% nos pacientes com tempo médio de 19 meses (0,3 a 178 meses).⁹¹

Na DPAC, assume-se que em cada permanência se atinge o equilíbrio entre as concentrações de pequenos solutos entre a solução de diálise peritoneal (SDP) e o

plasma. A massa depurada de solutos, portanto, é dependente do volume drenado a cada troca. Assim, além de levar a hipervolemia, a UFF diminui os *clearances* dos solutos de pequena massa molecular e a eficiência da diálise.⁹²

Deficiência no transporte de água e solutos foi relatada como causa de suspensão de DP em 16% dos pacientes em três populações com seguimento de 14, 15 e 24 meses.^{93,94,95} UFF foi descrita como causa da suspensão em metade desses pacientes e *clearances* inadequados de solutos na outra metade. Porém, com base nesse conceito de que a depuração de pequenos solutos é determinada pelo volume drenado, a UFF como causa principal foi provavelmente subestimada.

Do ponto de vista clínico, a UFF pode facilmente levar à sobrecarga hídrica e hipertensão, com desenvolvimento de hipertrofia de ventrículo esquerdo e aumento das concentrações séricas de peptídeos natriuréticos produzidos pelo miocárdio (peptídeo natriurético atrial - ANP e peptídeo natriurético cerebral - BNP). Em portadores de doença renal crônica estágio V (DRC V), esses peptídeos se mostraram bons marcadores prognósticos de mortalidade geral.⁹⁶ Da mesma forma, em DP mostraram ter valor prognóstico, estando associados com aumento de 8 vezes na mortalidade, para elevação de cada marcador isolado.⁹⁷ Baixo volume de UF foi também associado com mortalidade em pacientes anúricos^{98,99} e, mesmo em pacientes com UF aceitável, a não adaptação do volume de líquido ingerido com o volume de UF aumenta o risco de eventos cardiovasculares. Como se espera que o volume de UF decline com o tempo em DP, espera-se também aumento do risco. A limitada capacidade de excretar sódio na DP também contribui à hipervolemia,¹⁰⁰ que é provavelmente o mais importante fator de risco cardiovascular específico à DP.¹⁰¹

1.5.2. Fisiopatologia da UFF

Há várias possíveis causas para a perda de capacidade de UF: aumento significativo da superfície vascular, ou seja, da área de transferência de solutos e, portanto, dissipação precoce do gradiente osmótico; alto transporte de fluidos da cavidade ao plasma pelos linfáticos, maior que a passagem de fluidos, por osmose, à cavidade e redução da superfície peritoneal por fibrose e aderências. Além disso, combinações dessas causas podem ocorrer, como grande superfície vascular e diminuição da condutância osmótica.⁴⁶

No caso da fibrose, o tecido acelular e avascular favorece o rápido transporte de solutos, mas dificulta muito a passagem de fluidos para a cavidade peritoneal, por diminuição da matriz intersticial e aumento da distância entre a cavidade e os capilares.⁴⁶ Isso caracteriza a diminuição da condutância osmótica do peritônio, ou seja, da capacidade do gradiente osmótico promover a passagem de fluido através dessa membrana.

Alguns autores propõem a categorização da UFF em 2 tipos: tipo 1, em que o transporte peritoneal de solutos está preservado ou aumentado e o tipo 2, mais raro, em que o transporte de solutos está diminuído, como na presença de tecido cicatricial e aderências abundantes na cavidade.¹⁰²

O foco deste trabalho está nas alterações do transporte relacionadas à diminuição da condutância osmótica da membrana, no aumento da área de superfície vascular, no transporte linfático e fibrose submesotelial.

1.5.3. Causas de lesão peritoneal e falência de ultrafiltração

Ao longo do tempo, o peritônio de pacientes submetidos à DP é exposto a diversos potenciais agressores. Antes mesmo do início do tratamento, já estão ativos mecanismos de lesão e reparação, em intensidade variável.

Pacientes diabéticos, sem compensação metabólica adequada, têm seu peritônio exposto a um ambiente hiperglicêmico antes de utilizarem soluções à base de glicose hipertônica. Além da glicose, seus produtos de degradação (GDPs) e produtos finais de glicosilação (AGEs) também ativam vias que levam à transcrição de genes envolvidos na progressão da fibrose e angiogênese, conforme será descrito.

A própria síndrome urêmica é também considerada um fator agressor à membrana. Quando se compararam biópsias peritoneais obtidas de pacientes urêmicos e de controles, notou-se grande diferença em relação à espessura submesotelial. A espessura média do peritônio dos indivíduos controles foi de 50 μm , enquanto dos portadores de uremia foi de 140 μm . Também graus variáveis de vasculopatia, desde hialinização subendotelial até obliteração luminal, foram identificados em 28% dos pacientes urêmicos antes do início da diálise.¹⁰³ O mecanismo através do qual a uremia induz alterações peritoneais não está esclarecido, mas pode ser relacionado à inflamação crônica ou AGEs,¹⁰⁴ ambos presentes nos estágios avançados da insuficiência renal.

Outro fator em intensa discussão é a bioincompatibilidade das soluções de diálise atualmente disponíveis, que encerra em si múltiplos componentes agressores. Seu pH ácido, a presença de GDPs e AGEs nas bolsas e a glicose elevada são também gatilhos

para os processos de transição epitélio mesenquimal (EMT), neoangiogênese e perda da capacidade funcional.¹⁰⁵ Os GDPs, como metilglioxal, glioxal e 3-desoxiglicossone, compostos carbonil produzidos durante a esterilização das bolsas,¹⁰⁶ podem interferir na função e proliferação celulares¹⁰⁷ e mostraram ser indutores mais potentes dos AGEs que a própria glicose.¹⁰⁸

Os AGEs, como a pentosidina e a carboximetilisina, são proteínas irreversivelmente alteradas, que podem, no peritônio, estimular a expressão de colágeno e TGF- β (*Transforming Growth Factor* - β).¹⁰⁹ Sua presença foi evidenciada no efluente peritoneal,^{110,111} associada ao uso de soluções com glicose¹¹² e com intensidade variável de acordo com o tempo em diálise. As biópsias de membrana de pacientes em DP confirmaram a presença de AGEs,¹¹³ que se correlacionaram, quando no interstício e paredes vasculares, com a intensidade da fibrose,¹¹⁴ transporte de soluto e disfunção de UF.¹¹⁵ Aparentemente, além da produção local, a produção sistêmica também é significativa. Sua marcação foi colocalizada com o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) nos vasos.¹¹⁶

Os episódios de peritonite também já foram claramente associados à degeneração do método, por aumentarem as chances dos indivíduos acometidos tornarem-se rápidos transportadores e progredirem para falência de ultrafiltração. Tanto aumento da área da superfície vascular quanto à presença de aderências podem estar presentes, em proporções variáveis. A resposta à inflamação aguda envolve as células mesoteliais e macrófagos, que iniciam o recrutamento de outros componentes do processo inflamatório, como linfócitos e neutrófilos.¹¹⁷ Estimuladas pelas toxinas bacterianas, podem iniciar a produção de mediadores inflamatórios como IL-6 e prostaglandinas,

citocinas como IL-8, RANTES (*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*, ou CCL5), MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*),¹¹⁸ IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor- α* - TNF- α). Há um aumento da expressão de moléculas de adesão vascular no endotélio e aumento da permeabilidade. Também o TGF- β e o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF)-2^{119,120} se mostraram aumentados após peritonites.

Já a inflamação sistêmica, por outro lado, tem sido um tópico controverso na doença renal crônica e na DP. Demonstrou-se associação de marcadores de desnutrição, inflamação e aterosclerose (síndrome MIA)¹²¹ com indicadores de inflamação e função da membrana peritoneal,¹²² mas sem uma conexão direta definida com a fibrose peritoneal.

1.5.4. Neoangiogênese

O aumento da superfície vascular peritoneal, seja por recrutamento de capilares previamente não perfundidos ou por formação de novos capilares, é uma das alterações patológicas vistas após ativação dos processos de lesão, inflamação e reparo locais, relacionados com a perda funcional da membrana.⁵²

Conforme citado anteriormente, a glicose elevada leva à maior expressão de RNAm do TGF- β ,¹²³ mas também da fibronectina,¹²⁴ além de aumentar de forma geral a síntese protéica nas células mesoteliais, favorecendo a produção de colágeno e a fibrose peritoneal. O TGF- β , por sua vez, é um estimulador da expressão do VEGF, e parece ser a conexão entre exposição à glicose, fibrose peritoneal e neoangiogênese.¹²⁵

A produção de VEGF no peritônio de pacientes em DP tratados com soluções glicosadas é significativamente maior que com soluções de icodextrina.¹²⁶ Sua concentração teve correlação positiva com o MTAC de creatinina e com a absorção de glicose, ambos relacionados à área de superfície vascular peritoneal, e correlação negativa com a UF.¹²⁷

Outro estudo mostrou que os transportadores rápidos e muito-rápidos, ou seja, com D/P_{creat} maior ou igual a 0,65, apresentam níveis de VEGF sérico e peritoneal significativamente maiores em relação aos transportadores lentos e muito lentos ($D/P_{creat} \leq 0,65$), sob tratamento com a mesma solução de diálise. O grupo com maiores níveis de VEGF era composto por uma porcentagem maior de diabéticos, o que se mostrou muito significativo (57% x 37%, $p < 0,01$) e reforça as evidências a respeito da influência do ambiente hiperglicêmico.¹²⁸

No entanto, resultados diferentes apareceram em trabalho que analisou os níveis peritoneais de VEGF e a D/P_{VEGF} em pacientes com diferentes características de transporte peritoneal. Nessa análise, o VEGF não se correlacionou com o MTAC de uréia e creatinina, dose acumulada de glicose ao longo do tratamento dialítico, tempo em diálise peritoneal, dias de peritonite ou idade. Correlacionou-se apenas com a duração da permanência do banho de diálise na cavidade peritoneal, com valores maiores nos banhos de 15 horas em comparação com 8 horas.¹²⁹ O ambiente hiperglicêmico também foi estudado como causa de neoangiogênese peritoneal em modelos animais de diabetes. Em um estudo, compararam-se peritônios de ratos Wistar com diabetes induzido por estreptozotocina a peritônios de ratos controle através de microscopia intravital, após infusão intracavitária de banho glicosado a

3,86%. Notou-se, na membrana dos diabéticos, a presença de uma rede vascular densa e irregular, ausente nos controles. No mesmo estudo, testou-se uma inativação do VEGF com anticorpos monoclonais específicos, que levou a aspecto normal da rede vascular peritoneal.¹³⁰

Também em ratos, a importância da interação AGE-RAGE (receptor para AGE) sobre neoangiogênese e fibrose foi determinada através da comparação de animais “knockout” para RAGE com animais selvagens, quando expostos a infusões peritoneais de SDP glicosada durante 12 semanas. Encontrou-se correlação positiva da presença de RAGE com a expressão do VEGF e vascularização, e com a expressão de TGF- β e fibrose. Possivelmente, o RAGE seria o gatilho para as complicações vasculares e fibróticas que levam à perda da capacidade de UF.¹³¹

Ao tentar bloqueio do RAGE por anticorpos específicos, outros autores não obtiveram os mesmos resultados. A inibição do RAGE se correlacionou com diminuição da expressão de TGF- β e menor fibrose, mas não se correlacionou com a densidade vascular. Houve diferença entre diabéticos e controles, porém não houve entre os tratados e os não tratados com anticorpo específico, questionando a conexão da hiperglicemia com a neoangiogênese¹³² através do RAGE.

Existem, portanto, evidências que conectam a glicose elevada das soluções para DP às alterações vasculares patológicas encontradas após tempo prolongado de tratamento, mas controvérsias persistem em relação aos mecanismos exatos envolvidos nesse processo, que continua sendo objeto de estudo de diversos grupos de pesquisadores.

1.5.5. Fibrose e transição epitélio-mesenquimal

Transição epitélio-mesenquimal (EMT) ou transição mesotélio-mesenquimal (MMT) são os termos utilizados atualmente para nomear a mudança fenotípica encontrada na histologia nas células epiteliais da membrana peritoneal que, assim como os outros achados citados, está relacionada com a perda de sua capacidade funcional como membrana de diálise ao longo do tratamento.

Trata-se de um processo de perda gradual das características de polaridade, adesão e imobilidade das células pertencentes à camada única que reveste o peritônio e aquisição das características de células mesenquimais, fibroblastos ou miofibroblastos, como ausência de polaridade, mobilidade no tecido e produção de matriz colágena.

A primeira descrição de sua ocorrência em nível celular foi na fase precoce da embriogênese. Nessa situação, a EMT permite às células do epitélio primitivo migrar como células mesenquimais para formar a mesoderme e às células do neuroepitélio primitivo migrar como células da crista neural, processos essenciais à existência de organismos complexos.¹³³

Em tecido, os primeiros trabalhos que descrevem a EMT foram realizados em epitélio tubular renal.¹³⁴ Posteriormente, foi também demonstrada em outros órgãos, como fígado, miocárdio¹³⁵ (transição endotélio-mesenquimal - EndMT) e intestino.¹³⁶ A EMT tem também sido descrita como o mecanismo que possibilita a invasão e metastatização de células tumorais.¹³⁷

Recentemente, para referência ao contexto em que ocorrem as variações de EMT, tem-se utilizado os termos tipo 1 para EMT envolvendo o epitélio embrionário, tipo 2

para EMT no adulto, envolvendo células epiteliais ou endoteliais e tipo 3 para o envolvimento de células tumorais metastáticas.¹³⁸

Existem divergências quanto à proporção da fibrose tecidual que se deve às células resultantes desse processo, diante de outros possíveis agentes causadores de fibrose, como os fibroblastos residentes no tecido e os fibroblastos provenientes da corrente sangüínea. Existem trabalhos que consideram as células resultantes da EMT como as principais causadoras da fibrose, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e do recrutamento de outros tipos celulares participantes da inflamação e reparação tecidual. Outros advogam que esse processo não tenha mais que 15 a 20% de participação na degeneração fibrosa epitelial.

Alguns consideram que a atribuição exata das proporções dos envolvidos seja muito difícil, pois em fases avançadas do processo não seria possível determinar a origem das células com fenótipo mesenquimal ou fibroblástico, já que no *continuum* do fenômeno de EMT ocorreria a perda gradual de todos os marcadores epiteliais e expressão crescente dos marcadores mesoteliais. Assim, a célula resultante do processo completo seria similar ao fibroblasto residente ou proveniente da medula óssea e, no caso de uma análise histológica tardia, o aspecto microscópico e a expressão de marcadores não seriam suficientes para esclarecer os processos que levaram à perda funcional.¹³⁹

Nas biópsias de peritônio de indivíduos com perfil de UF desfavorável, assim como em culturas de células de seu efluente peritoneal e em peritônio de animais cronicamente submetidos à infusão de SDP intraperitoneal, células com aspecto fibroblastóide à microscopia, inseridas em camadas submesoteliais, que expressavam marcadores

epiteliais e mesenquimais simultaneamente levaram ao desenvolvimento da teoria da EMT tipo 1 como importante processo patológico envolvido na UFF.^{140,141}

Assim como em outros tecidos, a evolução da EMT no peritônio pode ser dividida em quatro fases até o estabelecimento do fenótipo final. O processo se inicia com a perda das junções intercelulares, através de *downregulation* de moléculas de adesão como E-caderina, claudinas, ocludinas, zona ocludens-1 e desmoplaquina e segue com perda da polaridade apical-basal. A seguir, as células adotam uma polaridade ântero-posterior, devido à reorganização de seu citoesqueleto, adquirem mobilidade e passam a expressar α -SMA. Nos estágios finais, as células adquirem capacidade de degradar a membrana basal e de invadir o estroma, através da síntese e secreção das metaloproteinases de matriz (MMPs). Nessa fase, perde-se a expressão de citoqueratinas e há *upregulation* da expressão de vimentina, N-caderina, β -catenina e do fator de transcrição Snail, além de aumento da síntese de componentes da matriz extracelular.¹⁴²

As moléculas que são utilizadas para marcar essas etapas são mais que simples ferramentas de estudo. Estão envolvidas diretamente nos processos biológicos citados. O Snail, por exemplo, parece estar ativado em todas as formas descritas de EMT. É supressor da expressão de E-caderina e regula também a atenuação de outros marcadores epiteliais como as claudinas, ocludinas e citoqueratinas. Atua como estimulador da expressão de fibronectina e vitronectina, que são marcadores mesenquimais, leva a aumento da expressão das MMPs e leva à proteção contra a morte celular. Sua regulação se dá através do controle de sua localização. Quando é fosforilado, é expulso do núcleo e fica inativo como fator de transcrição no

citoplasma.¹⁴³ Da mesma forma, a β -catenina também está diretamente envolvida no controle da transcrição de genes envolvidos na EMT.

Entretanto, a molécula essencial à instalação e perpetuação desse distúrbio é o TGF- β . Já foi demonstrado que a transdução de TGF- β em peritônios de ratos por um vetor adenovírus reproduz as alterações estruturais e funcionais observadas nos pacientes em DP, como esclerose peritoneal e angiogênese, ambos seguidos por EMT.¹²⁵ O TGF- β tem expressão aumentada durante episódios de peritonite e isso está relacionado com pior evolução clínica dos pacientes em DPAC.¹¹⁹ A via Snail, por exemplo, é diretamente regulada pelo TGF- β .

Twist é outra proteína implicada na instalação da EMT. Ela parece agir, de maneira independente do Snail, como repressor da E-caderina e estimulador da fibronectina e N-caderina, e parece ser a conexão entre hipóxia e fibrose.¹⁴⁴ Assim como o Snail, também é sabidamente anti-apoptótica e impede a morte iminente das células envolvidas.¹⁴⁵

Clinicamente, a importância da EMT se revela por contribuir para pior qualidade da diálise, com menor remoção de solutos e excessos de fluidos. Assim, é um fator importante para o aumento da morbimortalidade cardiovascular por sobrecarga volêmica e estado de maior inflamação sistêmica.

Também o aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS) decorre da alta concentração de glicose. As ROS alteram os padrões de ativação de genes relacionados à fibrose, como o TGF- β e a fibronectina, através de influência sobre vias sinalizatórias

de proteínas cinases e fatores de transcrição como o NF κ -B (Nuclear Factor Kappa-B) nas células mesoteliais.¹⁴⁶

1.6. Estratégias farmacológicas de proteção à membrana peritoneal

Nos últimos anos, a angiotensina II (All) mostrou ser importante fator estimulatório da síntese de matriz extracelular, especialmente envolvida na gênese da fibrose renal, provavelmente mediada por TGF- β .¹⁴⁷ O uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (iECAs) e bloqueadores do receptor da angiotensina (BRAs) mostrou diminuir a progressão da fibrose renal em estágios iniciais^{148,149} e também em estágios avançados, protegendo inclusive pacientes já sob TRS da perda de função renal residual.¹⁵⁰

Quando se analisaram os efeitos dos iECA e BRA em pacientes em DP, notou-se, além dos benefícios sobre a função renal, efeito protetor sobre a membrana peritoneal, com prevenção do aumento do transporte de solutos, verificado pelo SPA.¹⁵¹

Outras possíveis estratégias terapêuticas têm sido avaliadas experimentalmente, com objetivo de interferir na progressão da fibrose e neoangiogênese, como anticorpos específicos anti-VEGF, que *in vitro* e *in vivo* preservaram a morfologia peritoneal. BMP-7 (*Bone Morphogenic Protein-7*), um antagonista do TGF- β produzido constitutivamente pelas células mesenquimais e inibido durante a EMT, foi oferecido IP a animais submetidos à infusão crônica da SDP glicosada e levou a menor fibrose, angiogênese e invasão das células mesoteliais, sem interferir em marcadores inflamatórios e respostas regenerativas.¹⁵²

Intervenções voltadas à diminuição do estresse oxidativo, como o uso da N-acetilcisteína, também tem sido avaliadas. Em estudo realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sua administração, por via oral, a ratos submetidos à infusão diária de SDP, levou a prevenção do espessamento da camada submesotelial no peritônio,¹⁵³ e encontra-se em estudo em humanos com essa finalidade.^{154,155}

Espironolactona,¹⁵⁶ que também diminuiu fibrose renal e miocárdica, tem sido estudada no peritônio, assim como inibidores da COX-2.¹⁵⁷

De maneira geral, as pesquisas de medidas protetoras da anatomia e funcionalidade da membrana visam à modulação de mecanismos inflamatórios, pró-fibróticos e pró-angiogênicos que em última instância levam à falência do método. Tenta-se também definir os mecanismos exatos envolvidos na lesão, de modo a expor novos pontos potenciais de intervenção.

1.7. β -bloqueadores, doença cardiovascular e diálise peritoneal

Na década de 90, os β -bloqueadores já eram amplamente utilizados no tratamento hipertensão arterial e das arritmias, e em menor proporção, em condições como enxaqueca e tremor essencial.

A existência de uma relação causal entre o uso de β -bloqueadores e a ocorrência de UFF em pacientes em DP foi publicada em 1997. Atenolol, propranolol, sotalol, pindolol e metoprolol foram implicados e, com sua interrupção, notava-se recuperação da capacidade de UF.¹⁵⁸

A reversibilidade da UFF causada por β -bloqueadores, juntamente com a escassez de relatos de casos de peritonite esclerosante secundária a seu uso,¹⁵⁹ levaram à hipótese de que outro mecanismo patogênico deveria ser investigado, diferente do implicado na instalação da peritonite esclerosante.

Um possível responsável pelo prejuízo no perfil de UF com os β -bloqueadores seria a vasoconstrição arteriolar esplâncnica, causada especialmente pelos agentes não-seletivos. A vasoconstrição esplâncnica diminui a pressão venosa portal e assim, a UF total. Essa propriedade hemodinâmica da droga é uma razão essencial para sua prescrição na prevenção de hemorragia digestiva alta por varizes esofágicas em cirróticos, uma condição em que há liberação aumentada de óxido nítrico (NO) no leito vascular esplâncnico, com aumento do fluxo sanguíneo portal.^{160,161,162} Outra possibilidade considerada foi a de β -bloqueadores acarretarem em maior absorção linfática de fluidos e solutos provenientes da cavidade peritoneal.

Após a publicação desse trabalho, novas aplicações para os β -bloqueadores foram instituídas, como a insuficiência cardíaca congestiva (ICC), que se tornou uma indicação formal. Estudos com β -bloqueadores vinham sendo realizados desde a década de 70 em pacientes com ICC, mas na década de 90, publicações mais relevantes levaram à prescrição mais disseminada nessa condição.^{163,164,165}

Atualmente, bisoprolol, carvedilol ou succinato de metoprolol de liberação lenta são recomendados para todos os pacientes estáveis com sintomas atuais ou com antecedente de sintomas de ICC, com fração de ejeção de ventrículo esquerdo (FEVE) diminuída, exceto se houver contraindicação (nível de evidência A).¹⁶⁶ Devido aos efeitos favoráveis sobre a mortalidade e sobre a progressão da doença, o tratamento

deve ser iniciado logo que for feito o diagnóstico de disfunção de VE, mesmo que os sintomas sejam leves ou melhorem com outras drogas, de modo a evitar que se inicie seu uso apenas na instalação dos sintomas ou na progressão da doença. Mesmo em pacientes com FEVE preservada, o uso dessas drogas pode ser efetivo em minimizar os sintomas de ICC (nível de evidência IIB).¹⁶⁷

Entre os pacientes em TRS, a ICC é muito prevalente e, em geral, é relacionada com sobrecarga de volume, hipertensão e doença isquêmica do coração.¹⁶⁸ De acordo com os dados de 2009 da SBN, 34,9% dos óbitos de pacientes em diálise no Brasil foram atribuídos à doença cardiovascular, sendo a causa mais freqüente, e em segundo lugar aparece a doença cérebro-vascular, com 8,8%.³² Considerando essa importância, reduzir a mortalidade cardiovascular nesse grupo seria extremamente benéfico, e β -bloqueadores trazem benefício para outros grupos. No entanto, sua interferência no perfil de UF na DP poderia ter efeito contrário, com piora da condição cardiológica por UFF e sobrecarga de volume. Instala-se então um dilema clínico.

1.8. Nebivolol

O nebivolol é uma mistura racêmica. Enquanto seu isômero dextrógiro (d-nebivolol) é responsável por bloqueio seletivo β_1 -adrenérgico, tanto ele quanto o componente levógiro (l-nebivolol) levam à vasodilatação induzida por NO.¹⁶⁹ É considerado um bloqueador β_1 altamente seletivo, por ter afinidade β_1 321 vezes maior que pelos receptores cardíacos β_2 . É o agente mais seletivo de sua classe.¹⁷⁰

Há evidências de que a droga exerça atividade agonista sobre os receptores β_3 -adrenérgicos e que esse seja o mecanismo que leva à ativação da via L-arginina óxido-

nítrico e à redução da resistência vascular.^{171,172,173,174} Isso foi demonstrado através do uso concomitante de nebivolol com um bloqueador β_1 , β_2 e β_3 (bupranolol), ou com um bloqueador β_1 e β_2 (nadolol). O bupranolol suprimiu a liberação de NO e o nadolol permitiu que ela ocorresse. Outro mecanismo envolvido na elevação da biodisponibilidade do NO com a droga é a diminuição de sua inativação por ROS.¹⁷⁵ Além disso, outros efeitos descritos com o nebivolol são inibição da agregação plaquetária, da aterosclerose e de proliferação de células musculares lisas vasculares.¹⁷⁶

Em estudo prospectivo aleatorizado (SENIORS),¹⁷⁷ 2128 pacientes com mais de 70 anos receberam placebo ou nebivolol por um tempo mediano de 21 meses, com mínimo de 12 meses. Para inclusão no estudo, internação com diagnóstico de ICC na alta hospitalar ou FEVE $\leq 35\%$ documentada nos últimos 6 meses eram pré-requisitos. A proporção de óbitos ou admissão hospitalar por causa cardiovascular durante o acompanhamento foi 31,1% no grupo nebivolol e 35,3% no grupo placebo (risco relativo de 0,85; p 0,039). A redução absoluta do risco foi de 4,2%, com um número necessário para tratar (NNT) de 24 em 21 meses. O benefício apareceu após 6 meses e aumentou com o tempo de acompanhamento.

Num sub-estudo desse grupo, foram analisados os parâmetros ecocardiográficos de 104 pacientes, antes do início da droga e após 12 meses de uso. Destes, 43 pacientes tinham FEVE $\leq 35\%$ e 61 tinham FEVE $> 35\%$. O nebivolol mostrou efeito benéfico na remodelação reversa nos portadores de disfunção de VE, comparável ao de outros β -bloqueadores, como o carvedilol. Em pacientes com disfunção diastólica ou disfunção sistólica leve, não houve mudanças detectáveis nos índices do Doppler.¹⁷⁸

Outro trabalho (estudo ENECA) analisou 260 pacientes com mais de 65 anos e adicionou dados de segurança a respeito da medicação. Os eventos adversos graves durante o estudo, como piora da ICC, taquicardia ventricular e fibrilação atrial foram mais freqüentes no grupo placebo. Em relação aos efeitos relacionados à droga, houve 40 eventos no grupo nebivolol contra 14 no grupo placebo ($p < 0.0001$). Neste grupo foram reportadas bradicardia (nebivolol, 9 e placebo, 2), hipotensão (nebivolol, 8 e placebo, 4) e vertigem (nebivolol, 5 e placebo, 2). Esses dados refletem boa tolerabilidade da droga. Os efeitos sobre os índices ecocardiográficos foram similares aos do estudo SENIORS.¹⁷⁹

Considerando-se os possíveis efeitos desta droga no leito vascular esplâncnico, espera-se efeito semelhante ao encontrado nos portadores de cirrose hepática. Quando essa população foi estudada, em relação a seu comportamento em CAPD, apresentou maior UF total em comparação a indivíduos sem cirrose.¹⁸⁰ Esse benefício foi atribuído ao fato de esse grupo apresentar maior concentração de NO no leito vascular esplâncnico levando, portanto, à maior área de superfície vascular na cavidade peritoneal.

A expectativa é que a droga possa trazer proteção contra eventos cardiovasculares na população com disfunção ventricular esquerda em DP, com repercussão sobre o perfil de UF semelhante à trazida pela cirrose, caso a vasodilatação esplâncnica obtida seja significativa.

2. Objetivos

2.1. Objetivos principais

Avaliar os efeitos do nebivolol sobre a função peritoneal enquanto membrana de diálise, através do estudo do transporte de fluidos e pequenos solutos.

Estudar a repercussão da droga sobre a histologia da membrana peritoneal, em especial sobre sua espessura.

Avaliar a repercussão da droga sobre marcadores de EMT, angiogênese e linfáticos no peritônio.

2.2. Objetivos secundários

Aprimorar as técnicas experimentais previamente utilizadas nesta instituição para o estudo dos mecanismos de lesão e proteção da membrana peritoneal em DP.

3. Métodos

O estudo é uma análise prospectiva, aleatorizada, em um modelo animal de diálise peritoneal. Foi realizado na Unidade de Investigação do Hospital Universitário La Paz, vinculado à Universidade Autônoma de Madri. Os animais foram mantidos no biotério da Unidade de Cirurgia Experimental, recebendo dieta e cuidados padrão do laboratório, o que incluiu avaliação periódica de seu estado de saúde por um médico veterinário.

Um total de 21 camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade entre 12 e 14 semanas foram submetidos a implante, pela autora desta tese, de um cateter estéril, feito sob medida (Access Technologies), com múltiplos pequenos orifícios na extremidade intraperitoneal e porta de acesso dorsal subcutânea, sob anestesia com quetamina 100mg/kg e xilasida 10 mg/kg IP, conforme descrito previamente na literatura.¹⁸¹

Durante a semana que se seguiu ao implante do cateter, os animais receberam amoxicilina diluída na água do bebedouro a 0,34 mg/mL como profilaxia de infecções relacionadas ao ato cirúrgico, conforme protocolo do laboratório.

Após 7 dias, foram divididos em 3 grupos de 7 animais. Um deles (grupo controle) permaneceu sem outra intervenção além da colocação do cateter. Outro grupo (grupo SDP) recebeu 2 mL/dia de solução de diálise peritoneal (SDP) com glicose a 3,86% através do cateter, por trinta dias, sob anestesia inalatória em caixa anestésica saturada com isoflurano, oferecido a 3%, sob fluxo de oxigênio. O terceiro grupo (grupo nebivolol), além da SDP intraperitoneal sob anestesia inalatória, recebeu nebivolol 8 mg/kg/dia,^{182,183} por gavagem.

Após os 30 dias de intervenção, todos os animais foram submetidos aos experimentos descritos a seguir.

3.1. Avaliação do transporte de solutos

No trigésimo primeiro dia de observação, 2.5 mL de SDP foram infundidos através do cateter implantado. Esse volume foi determinado após experimentos que mostraram maior sucesso com esse valor na obtenção das amostras por punção da parede. Após 10, 20 e 40 minutos, 300 µl de dialisato foram aspirados por punção direta através da parede abdominal. Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário La Paz, para dosagem de uréia, creatinina e glicose. A dosagem de uréia foi feita por reação ultravioleta cinética pelo método da urease; a creatinina foi dosada por reação colorimétrica cinética pelo método de Jaffé e a glicose por reação ultravioleta enzimática pelo método da hexoquinase. As três dosagens foram feitas no analisador Olympus 5400.

3.2. Avaliação do transporte de fluidos

No dia seguinte, 2 mL de SDP foram infundidos na cavidade através do cateter. Após 20 minutos de permanência, os animais foram anestesiados (isoflurano inalatório) e sacrificados por deslocamento cervical. A seguir, foram submetidos à laparotomia e todo o líquido presente na cavidade foi coletado e pesado numa balança de precisão. O efluente coletado foi armazenado para dosagem das interleucinas a seguir especificadas.

3.3. Coleta de material para análise histológica

Após a coleta do dialisato, quatro fragmentos de peritônio, em faixas horizontais paralelas, foram retirados do lado esquerdo do abdome (lado contrário ao sítio de entrada do cateter na cavidade). Um segmento foi fixado em formalina tamponada a 10%, para posterior realização de imunohistoquímica, outro em Bouin, para coloração com tricrômico de Masson e outros dois congelados a -80° para possíveis análises futuras. Foi também colhida amostra de diafragma para marcação imunohistoquímica de podoplanina.

3.4. Análise da espessura da membrana peritoneal

Após permanência de 24 horas na solução de Bouin, os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados com espessura de 5 µm e corados com tricrômico de Masson. As lâminas foram analisadas em microscópio Leica CTR6000, com o programa LAS-AF6000. Foram realizadas medidas da espessura da membrana peritoneal a cada 60 µm, ao longo de todo o corte.

3.5. Imunohistoquímica (pan-citoqueratina, CD-31, podoplanina)

Cortes de 5 µm receberam soro bloqueador, posteriormente aspirado. Foram então incubados no anticorpo primário diluído por duas horas e lavados com PBS. A seguir, foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos e lavados. Na seqüência, foram incubados com o complexo HRP-estreptavidina por 30 minutos e lavados com PBS. Após revelação com a mistura de HRP por 30 segundos, foram lavados em água deionizada. Foram colocados então no substrato de peroxidase por 5 minutos. Feita desidratação das lâminas com álcool e xileno e cobertura dos cortes com meio

permanente e colocação de lamínula. Realizado o estudo das lâminas em microscópio óptico. A intensidade da expressão da pan-citoqueratina e da podoplanina está referida em RUs (*relative units*) da curva padrão. A marcação com CD-31 foi utilizada para contagem do número de vasos.

3.6. ELISA [dosagem das interleucinas (ILs) 6 e 10]

As placas de ELISA foram cobertas com a proteína alvo diluída em tampão carbonato com pH 9, a 1 pg/L e incubadas durante a noite. A solução foi então removida e tampão bloqueador foi adicionado e mantido por 1 hora, sendo então removido. As amostras e controles (50 µL) diluídos com tampão bloqueador foram colocados nos poços, sendo progressivamente diluídos a 50% e incubados por 1 hora. As placas foram então lavadas com PBS contendo Tween-20 a 0,05% e secas logo após. A seguir, os poços foram lavados com tampão dietanolamina. 50 µL de substrato diluídos na dietanolamina (1mg/mL) foram adicionados às placas, deixados 15 minutos para a reação, que foi interrompida com 0,1 M EDTA. Os resultados são dados em pg/mL.

3.7. Análise estatística

O volume do efluente peritoneal e as relações dialisato-plasma de uréia, creatinina e glicose, as espessuras das membranas peritoneais e a expressão de moléculas por imunohistoquímica serão comparadas entre os três grupos por one-way ANOVA ou Kruskal-Wallis, de acordo com o tipo de variável, paramétrica ao não-paramétrica. Os gráficos foram construídos com o programa GraphPad Prism 5.0.

4. Resultados

4.1. Volume de ultrafiltração – NUF

Após 20 da infusão de 2 mL na cavidade peritoneal através do cateter, o volume recuperado por laparotomia foi pesado em balança de precisão. O volume médio recuperado para o grupo controle foi de 1,94 mL, 1,56 mL para o grupo SDP e 2,05 mL para o grupo nebivolol, resultado significativo do ponto de vista estatístico, como visto na figura 1.

Figura 1. Volume de ultrafiltração após 20 minutos da infusão de SDP 3,86%.

4.2. Transporte de solutos

Com os resultados das dosagens de glicose, uréia e creatinina obtidos nas amostras de dialisato colhidas após 10, 20 e 40 minutos da infusão de 2,5 mL de SDP, foram construídas curvas de representação do comportamento das concentrações desses pequenos solutos na solução, ao longo do tempo de permanência, demonstradas na

figura 2. Os animais tratados com nebivolol tiveram o decaimento de glicose da solução mais lento dentre os três grupos, assim como o mais lento incremento de uréia. As áreas sob as curvas (AUCs) de incremento da creatinina foram de 20.53, 17 e 19 para o grupo controle, SDP e nebivolol, respectivamente. Para as curvas de uréia, foram de 1328, 1543 e 1101 e, para glicose, 85917, 75914 e 91590.

Não houve diferença estatística entre os grupos, o que pode ser reflexo do pequeno número de animais estudados.

Figura 2. Comportamento dos pequenos solutos após 10, 20 e 40 minutos da infusão de 2,5 mL de SDP 3,86% na cavidade. As concentrações são expressas em mg/dL. (CONT= grupo controle; PDF=grupo SDP; NEBI=grupo nebivolol)

4.3. Espessura da membrana peritoneal

A espessura da membrana de cada animal foi obtida através da mediana das medidas feitas a cada 60 μm , em seu corte correspondente. As espessuras submesoteliais mostraram-se aumentadas no grupo SDP, em comparação com o grupo controle, conforme descrição prévia da literatura.¹⁸⁴ O grupo nebivolol apresentou medidas semelhantes ao grupo controle. A média das espessuras entre os animais do grupo

controle foi de 23,14 μm , no grupo SDP, 102,4 μm e 29,04 μm no grupo neбиволol. A figura 3 mostra segmentos da membrana peritoneal de um espécime de cada grupo. No grupo controle é também possível observar a camada única de células mesoteliais revestindo o peritônio, característica perdida no grupo SDP e preservada no grupo neбиволol.

Figura 3. Espessuras da membrana peritoneal. O painel A é uma foto do peritônio de um animal controle, o painel B foi obtido de um animal do grupo SDP e o painel C de um representante do grupo neбиволol. Tricrômico de Masson 40X.

4.4. Pan-citoqueratina

A proteína pan-citoqueratina mostrou-se claramente presente na camada de células mesoteliais no peritônio dos animais do grupo controle. No grupo SDP, a marcação foi vista no citoplasma de células presentes em camadas mais profundas da zona submesotelial. Os animais do grupo neбиволol mostraram um padrão de marcação semelhante ao observado no grupo controle. A figura 4 ilustra esses achados.

Figura 4. Expressão de pan-citoqueratina na membrana peritoneal. Painel A: animal do grupo controle; painel B: animal do grupo SDP; painel C: animal tratado com neбиволol (aumento de 40X).

4.5. CD-31

A contagem de vasos, realizada após marcação do endotélio com CD-31 (PECAM-1) por imunohistoquímica, também foi menor no grupo nebivolol, em comparação com o grupo SDP, representando menor neoangiogênese naquele grupo. O número de vasos por campo foi semelhante entre grupo controle e grupo nebivolol, conforme mostrado na figura 5.

Figura 5. Expressão de CD-31 na membrana peritoneal. Painel A: animal controle; painel B: animal SDP; painel C: animal tratado com nebivolol (aumento de 40X).

4.6. Podoplanina

O resultado da marcação dos linfáticos, avaliada por imunohistoquímica em cortes de diafragma, mostrou-se com padrão bastante semelhante à marcação epitelial por pancitoqueratina no peritônio. Apresentou-se intensamente presente na zona submesotelial nos animais de grupo SDP e discretamente presente nos animais controles e nos tratados com nebivolol, estes dois últimos grupos com marcação igual do ponto de vista estatístico (figura 6).

Figura 6. Expressão de podoplanina na membrana peritoneal. Painel A: animal controle; painel B: animal SDP; painel C: animal tratado com nebivolol (aumento 40X).

4.7. Dosagem de IL-6 e IL-10 no dialisato

As dosagens de IL-6 e IL-10 no dialisato, realizadas por ELISA, foram expressas como medianas dos resultados dentro de cada grupo. Nos grupos controle, SDP e nebivolol foram obtidos valores de IL-6 de 468.7, 419 e 241 pg/mL, respectivamente. Os valores encontrados para IL-10 foram 110.3, 389.4 and 230 pg/mL. Não houve, no entanto, diferença significativa do ponto de vista estatístico.

Figura 7. Concentração de IL-6 e IL-10 no efluente peritoneal (pg/ mL).

5. Discussão e conclusões

Nos experimentos realizados, procuramos abordar, através de um modelo de infusão crônica, diversos aspectos envolvidos na deterioração e proteção da membrana peritoneal relacionadas à DP, tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Procuramos também encontrar subsídios para a elaboração de teorias sobre os possíveis mecanismos promotores dos processos de proteção da membrana promovidos pela droga em estudo, o nebivolol.

Inicialmente, os resultados obtidos nos experimentos que avaliaram o transporte de fluidos, através da quantificação do volume de ultrafiltração após permanência de 20 minutos, podem ser contemplados diante das informações providas pelo estudo da curva de volume intraperitoneal por tempo de permanência da solução [curva $V(t)$]. Em sua porção inicial, quando a solução acaba de ser infundida na cavidade, são fatores determinantes do transporte através da membrana os que interferem em sua condutância osmótica, tais como fibrose e espessura submesotelial. No modelo de lesão de membrana aqui empregado, no qual é infundida SDP hipertônica, observamos que o padrão de lesão tecidual obtido é o que, em pacientes, está relacionado à diminuição da condutância osmótica, ou seja, maior fibrose e espessura submesotelial. Em biópsias de peritônio, obtidas de indivíduos com doença renal crônica em DP, essas características se correlacionaram com UFF.¹⁰³

Além de levar à diminuição da condutância osmótica, outra repercussão funcional do tecido fibrótico no peritônio é favorecer o transporte rápido de pequenos solutos, tais como a glicose, agente osmótico empregado no modelo. Assim, em conjunto com o aumento da área de superfície vascular, consequência da neoangiogênese, a fibrose

facilita a rápida dissipação do gradiente osmótico.⁵⁹ Em pacientes, o que se nota é um acoplamento da aceleração do transporte de solutos promovida pelos neovasos à redução da ultrafiltração, resultado do transporte de água livre pela AQP-1. No entanto, há evidências de que esse acoplamento se torna menos aparente com maior tempo em DP, quando há queda desproporcional na UF, sugerindo que a condutância osmótica diminua em maior proporção do que o transporte de pequenos solutos aumenta.^{185,186}

Já na segunda fase da curva $V(t)$, quando o gradiente de concentração de glicose é menor e, portanto, tem menor influência sobre o transporte de fluidos, ficam mais evidentes os papéis das forças de Starling e da reabsorção linfática sobre a dinâmica dos fluidos através da membrana na DP. No modelo em questão, estudaram-se os linfáticos através da quantificação da marcação submesotelial para podoplanina. Notou-se, com utilização da SDP, marcação mais intensa por imunohistoquímica. Assim, espera-se, na segunda fase da curva $V(t)$, maior reabsorção de fluido em direção ao plasma.

Com o uso do nebivolol, encontramos preservação dos componentes morfológicos da membrana envolvidos nesses dois momentos da curva $V(t)$. Quanto aos componentes envolvidos na primeira fase, obtivemos preservação da espessura peritoneal e da rede vascular. Já em relação aos componentes envolvidos na segunda fase, a marcação para linfáticos nos animais tratados foi semelhante à do grupo controle.

No estudo dos parâmetros funcionais, notou-se que a quantificação do volume de ultrafiltrado, obtido por laparotomia, apresentou concordância com os resultados morfológicos. O grupo que apresentou o menor volume de ultrafiltração, o grupo SDP,

apresentou maior espessura peritoneal e maior conteúdo de colágeno na zona compacta submesotelial (análise visual, sem quantificação), além de maior vascularização, conforme avaliado por marcação imunohistoquímica para CD-31. O grupo tratado com nebivolol, que mostrou preservação estrutural, foi o que apresentou o maior de volume de ultrafiltração.

Já em relação ao transporte de pequenos solutos, outro aspecto funcional, avaliado através das curvas de concentração de glicose, uréia e creatinina no dialisato, também ocorreu o padrão de comportamento esperado para cada perfil morfológico: os animais com maior fibrose, EMT, angiogênese e espessura apresentaram o mais rápido transporte de solutos através do peritônio, e esse grupo corresponde aos animais SDP. Os animais tratados com nebivolol apresentaram padrão de transporte de solutos semelhante aos controles, menor espessura, EMT e angiogênese.

Além desses pontos, o perfil inflamatório, através da dosagem das interleucinas 6 e 10 foi também avaliado. Encontramos aumento de ambas com a infusão da SDP e expressão mais baixa com o uso do nebivolol. Ou seja, o nebivolol permitiu a manutenção de uma ambiente menos “inflamado”, mesmo em comparação com nosso grupo controle, composto de animais com um cateter instalado, que não receberam SDP IP.

Assim, sobre todos os efeitos deletérios da SDP estudados nesse projeto, notou-se efeito protetor exercido pelo nebivolol.

Surgem, então, duas hipóteses: houve interferência da droga sobre cada aspecto da degeneração da membrana, como angiogênese, fibrose e linfangiogênese ou ação

direta sobre mecanismos centrais com repercussão secundária sobre os outros aspectos envolvidos?

Ao se tentar englobar todos os efeitos benéficos obtidos com a droga nesse modelo sob um mesmo mecanismo de proteção, imediatamente considera-se como possibilidade a interferência sobre o TGF- β . O TGF- β medeia os vários processos que culminam com a deposição de colágeno. Interfere tanto com os fibroblastos residentes e provenientes da medula óssea quanto com os fibroblastos resultantes da EMT. Ainda nesses processos, tem influência sobre diferentes fases, desde sua iniciação até sua perpetuação. Além disso, aumenta diretamente a expressão de outros fatores de crescimento, como CTGF, MMPs e TIMPs. A expressão do VEGF e, portanto, a neoangiogênese, são também diretamente influenciadas pelo TGF- β .

Favorece a hipótese de ação central sobre o TGF- β o fato de outros modelos experimentais apresentarem os mesmos achados patológicos que obtivemos com infusão de SDP através da infusão exclusiva de TGF- β na cavidade ou por transfecção por vetor viral do gene do TGF- β .¹²⁵

Qual seria, diante da possibilidade de efeito predominante sobre o TGF- β , o ponto de conexão entre o nebivolol e a inibição desse fator de crescimento?

Os efeitos do nebivolol, especialmente de seu enantiômero dextrógiro, parecem diferir dos causados por outros beta-bloqueadores, por levar à maior biodisponibilidade de NO nos tecidos. Diversos trabalhos são capazes de demonstrar conexões entre NO, estresse oxidativo, TGF- β e fibrose, em diferentes órgãos e sistemas. No endotélio, o NO foi capaz de bloquear o TGF- β através de impedimento à translocação nuclear do

Smad-2 e de aumento de sua degradação.¹⁸⁷ Em culturas de células mesangiais, o doador de NO SNAP (S-nitroso-acetil-D,L-penicilamina) também inibiu o aumento do TGF- β promovido pela adição de glicose ao meio de cultura.¹⁸⁸

Outro mediador que pode estar envolvido nesse processo é o HIF. O fenômeno da pseudo-hipóxia, promovida pelo ambiente hiperglicêmico, tem sido estudado em modelos de diabetes. A pseudo-hipóxia hiperglicêmica é caracterizada pelo aumento da relação NADH/ NAD⁺, promovida por aumento da ação da sorbitol desidrogenase, de modo semelhante ao que ocorre nas situações de isquemia e hipóxia, tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias das células sob essa condição. Relata-se oxidação prejudicada do NADH a NAD⁺ pelas cadeias de transporte de elétrons mitocondriais, associada à vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Esses sistemas NAD(P)H oxidase são grandes fontes de ROS, que regulam, por mecanismos hipóxia-dependentes e independentes, a ativação do HIF-1 α .^{189,190}

Em estudos de retinas de animais diabéticos, alguns autores advogam que esse mecanismo é importante no desenvolvimento da retinopatia diabética,^{191,192} enquanto outros refutam a possibilidade do envolvimento de um desequilíbrio redox hipóxia-símile.¹⁹³

Atualmente, na teoria da patogênese peritoneal, tem-se também considerado a possível influência da pseudo-hipóxia.¹⁹⁴ Nesse contexto, o lactato presente nas SDPs poderia contribuir para a inibição da regeneração do NAD⁺ que ocorre na conversão do piruvato a lactato, com aumento da relação NADH/ NAD⁺ da mesma forma que na hipóxia, com aumento do HIF e, por consequência, elevação do VEGF.

Considerando-se como válida essa possibilidade de mecanismo fisiopatogênico também na DP, no qual as ROS promoveriam desacoplamento da eNOS e, portanto, suprimiriam sua atividade e reduziram a biodisponibilidade do NO, o nebivolol poderia, através da redução das ROS e aumento da oferta de NO tecidual, o que já se observou em tecido renal em modelo animal de ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona,¹⁹⁵ bloquear a elevação do HIF e, assim, a neoangiogênese pelo aumento do VEGF.

Há também indícios de ação da droga sobre os receptores de estrógeno, promovendo efeito estrogênico sobre as células endoteliais, com proteção de sua função. Em dois modelos de lesão neuronal in vitro, células de neuroepitelioma e neuroblastoma humanos apresentaram transcrição gênica estrógeno-dependente com o nebivolol, mesmo com baixas concentrações. Houve diminuição do estresse oxidativo e aumento da sobrevivência desses tipos celulares após exposição a paraquat e peróxido de hidrogênio.¹⁹⁶ Em tecido mamário, a ativação do receptor de estrógeno-alfa esteve relacionada com a inativação do Smad e diminuição da expressão do TGF- β .¹⁹⁷

Tomados juntos, os efeitos protetores promovidos pelo nebivolol em diferentes modelos contribuem para a hipótese de efeito central sobre o TGF- β , principalmente através de inibição do estresse oxidativo.

Neste modelo, o próximo passo, já em execução, é a mensuração do estresse oxidativo, através da quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, coloração para catalase e superóxido dismutase. Assim, procuramos obter dados concretos a respeito do efeito antioxidante da droga sobre as células mesoteliais, como os já disponíveis em outros tecidos.

Quanto aos aspectos clínicos, mesmo com a influência negativa dos beta-bloqueadores sobre o perfil de ultrafiltração verificada no estudo publicado por Stegmayr, não houve interrupção de seu uso, pois suas indicações são extremamente freqüentes nos pacientes sob DP. Também não foram feitos estudos clínicos prospectivos a respeito da influência dos beta-bloqueadores sobre o perfil de UF, nem de comparação entre os diferentes beta-bloqueadores. No entanto, dados de culturas de células mesoteliais peritoneais humanas (ainda não publicados) confirmam um perfil de citocinas e fatores de crescimento bastante desfavorável após a exposição ao atenolol, diferente do ocorrido com nebivolol. Esses dados reforçam o conceito trazido por Stegmayr.

A possibilidade de se prescrever um beta-bloqueador a esse grupo de pacientes, sem interferir negativamente sobre perfil de UF, é muito atrativa. Até o momento, com as drogas até então testadas, restava sempre a necessidade de vigilância sobre a funcionalidade peritoneal e o balanço hídrico. Como os estudos clínicos com nebivolol em indivíduos idosos evidenciaram perfil de benefício cardiovascular semelhante ao de outros betabloqueadores consagrados e o presente trabalho dá subsídios para utilização em pacientes com expectativa de efeitos positivos, trabalhos clínicos envolvendo o fármaco no contexto da DP devem ser o próximo passo a ser dado.

Além dos efeitos diretos sobre o peritônio, o nebivolol mostrou, em outros trabalhos, levar a um perfil metabólico mais favorável. Em pacientes, houve redução do HOMA (*homeostasis model assessment*) e da insulinemia com seu uso, sem alteração do nível de triglicérides, diferentemente do atenolol. Considerando o efeito desfavorável da DP sobre o metabolismo de carboidratos, essa seria outra vantagem da droga sobre as

outras de sua classe, como o atenolol, que leva a aumento do HOMA, da insulinemia e dos triglicérides.^{198,199,200}

Acreditamos estar trabalhando, portanto, com um potencial fármaco de primeira escolha, nos próximos tempos, para bloqueio beta adrenérgico na população portadora de doença renal crônica sob TRS através de DP.

6. Referências

¹ Cameron JS. *History of the Treatment of Renal Failure by Dialysis*. Oxford: Oxford University Press; 2002. The science of dialysis: osmosis, diffusion and semipermeable membranes. 24-31.

² McBride P. Taking the first steps in the development of peritoneal dialysis. *Perit Dial Bull*. 1982. 100–102. Available from <http://www.pdiconnect.com/cgi/reprint/2/2/100.pdf>

³ Recklinghausen TF. Die Lymphgefasse und ihre Beziehung zum Bindegewebe. Berlin: Hirschwald. 1862.

⁴ Wegner G. Chirurgische Bemerkungen uber die Peritonealhohle, mit besonderer Berücksichtigung der Ovariotomie. *Arch Klin Chir*. 1877;20: 51–145.

⁵ Negoj D, Nolph KD. History of Peritoneal Dialysis. In: Khanna R, Krediet RT. *Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis 3 ed*. New York: Springer. 2009. 1-18.

⁶ Starling EH, Tubby AH. The influence of mechanical factors on lymph production. *J Physiol*. 1894;16: 140–8.

⁷ Cunningham RS. Studies on absorption from serous cavities. III. The effect of dextrose upon the peritoneal mesothelium. *Am J Physiol*. 1920;53:488–94.

⁸ Putnam TJ. The living peritoneum as a dialyzing membrane. *Am J Physiol*. 1923;63: 548-65.

⁹ Abel JJ, Rowntree LG, Turner BB. On the removal of diffusible substances from the circulating blood of living animals by dialysis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1914; 5: 275–316.

-
- ¹⁰ Cameron JS. *History of the Treatment of Renal Failure by Dialysis*. Oxford: Oxford University Press. 2002. The search for better dialysis membranes: the peritoneum and the beginnings of peritoneal dialysis. 44–60.
- ¹¹ Ganter G. Über die Beseitigung giftiger Stoffe aus dem Blute durch Dialyse. *Munch Med Wochenschr*. 1923;70:1478–81.
- ¹² Odel HM, Ferris DO, Power MH. Peritoneal lavage as an effective means of extrarenal excretion. A clinical appraisal. *Am J Med*. 1950;9:63-77.
- ¹³ Seligman AM, Howard AF, Fine J. Treatment of experimental uremia by means of peritoneal irrigation. *J Clin Invest*. 1946;25: 211-9.
- ¹⁴ Frank HA, Seligman AM, Fine J. Treatment of uremia after acute renal failure by peritoneal irrigation. *JAMA*. 1946; 130: 703-5.
- ¹⁵ Wear JB, Sisk IR, Trinkle AJ. Peritoneal lavage in the treatment of uremia; an experimental and clinical study. *J Urol*. 1938;39:53-62.
- ¹⁶ Grollman A, Turner LB, McLean JA. Intermittent peritoneal lavage in nephrectomized dogs and its application to the human being. *Arch Int Med*. 1951;87:379–90.
- ¹⁷ Maxwell M, Rockney R, Kleeman CR. Peritoneal dialysis. *JAMA*. 1959; 8: 917-24.
- ¹⁸ McBride P. Paul Doolan and Richard Rubin: performed the first successful chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 1985; 5: 84-6. Available from <http://www.pdconnect.com/cgi/reprint/5/1/84.pdf>
- ¹⁹ Boen ST, Curtis FK, Tenckhoff H, Scribner BH. Chronic hemodialysis and peritoneal dialysis. *Proc Eur Dial Transplant Assoc*. 1964;1:221-3. 13.
- ²⁰ McBride P. Fred T S Boen MD. The man who brought science to the art of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, 2, 1982. 50-53. Available from: <http://www.pdconnect.com/cgi/reprint/2/1/50.pdf>
- ²¹ Kolff WJ, Waugh WH, Garrett J. Discussion at the Eighth Annual Meeting of the American Society for Artificial Internal organs, Atlantic City, New Jersey, April 13–14, 1962. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1962; 8: 263–265.
- ²² Boen ST, Mulinari AS, Dillard DH, Scribner BH. Periodic peritoneal dialysis in the management of chronic uremia. *ASAIO J*. [Internet]. 1962; 8(1). Available from: http://journals.lww.com/asaiojournal/Fulltext/1962/04000/Periodic_Peritoneal_Dialysis_in_the_Management_of.55.aspx

-
- ²³ Merrill JP, Sabbaga E, Henderson L, Welzant W, Crane C. The use of an inlying plastic conduit for chronic peritoneal irrigation. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1962;8:252-255.
- ²⁴ Boen ST, Mion CM, Curtis FK, Shilipetar G. Periodic peritoneal dialysis using the repeated puncture technique and an automatic cycling machine. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1964;10:409-414.
- ²⁵ Tenckhoff H, Shilipetar G, Boen ST. One year's experience with home peritoneal dialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1965;11:11-17.
- ²⁶ Tenckhoff H, Schechter H. A bacteriologically safe peritoneal access device. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1968;14:181-187.
- ²⁷ Negoï D, Prowant BF, Twardowski ZJ. Current trends in the use of peritoneal dialysis catheters. *Adv Perit Dial*. 2006;22:147-152.
- ²⁸ Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, Ghods AJ, Twardowski ZJ, Pyle WK. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. 1978. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1999 Apr;10(4):901-910.
- ²⁹ Oreopoulos DG, Robson M, Izatt S, Clayton S, deVeber GA. A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1978;24:484-489.
- ³⁰ Buoncristiani U. Birth and evolution of the "Y" set. *ASAIO J*. 1996 Feb;42(1):8-11.
- ³¹ Moraes TP, Pecoits-Filho R, Ribeiro SC, Rigo M, Silva MM, Teixeira PS, et al. Peritoneal dialysis in Brazil: twenty-five years of experience in a single center. *Perit Dial Int*. 2009 Oct;29(5):492-498.
- ³² Site da Sociedade Brasileira de Nefrologia-SBN (www.sbn.org.br)
- ³³ Lameire N, Van Biesen W. Epidemiology of peritoneal dialysis: a story of believers and nonbelievers. *Nat Rev Nephrol*. 2010 Feb;6(2):75-82.
- ³⁴ Mehrotra R. Changing patterns of peritoneal dialysis utilization in the United States. *Perit Dial Int*. 2007 Jun;27 Suppl 2:S51-52.
- ³⁵ Rippe B, Venturoli D, Simonsen O, de Arteaga J. Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. *Perit Dial Int*. 2004 Feb;24(1):10-27.
- ³⁶ Nolph KD, Miller F, Rubin J, Popovich R. New directions in peritoneal dialysis concepts and applications. *Kidney Int. Suppl*. 1980 Sep;10:S111-116.

-
- ³⁷ Flessner MF, Dedrick RL, Schultz JS. A distributed model of peritoneal-plasma transport: theoretical considerations. *Am. J. Physiol.* 1984 Apr;246(4 Pt 2):R597-607.
- ³⁸ Flessner MF, Henegar J, Bigler S, Genous L. Is the peritoneum a significant transport barrier in peritoneal dialysis? *Perit Dial Int.* 2003 Dec;23(6):542-549.
- ³⁹ Karnovsky MJ. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.* 1967 Oct;35(1):213-236.
- ⁴⁰ Rippe B., & Haraldson, B. How are macromolecules transported across the capillary wall? *News Physiol Sci.* 1987; 2, 135-138.
- ⁴¹ Krediet RT. The physiology of peritoneal solute, water, and lymphatic transport. In: Krediet RT, Khanna R. *Nolph and Gokal's Textbook of peritoneal dialysis*. New York: Springer. 2009. 137-172
- ⁴² Rippe B, Kamiya A, Folkow B. Transcapillary passage of albumin, effects of tissue cooling and of increases in filtration and plasma colloid osmotic pressure. *Acta Physiol. Scand.* 1979 Feb;105(2):171-187.
- ⁴³ Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999;237:97-132.
- ⁴⁴ Bundgaard M. Transport pathways in capillaries--in search of pores. *Annu. Rev. Physiol.* 1980;42:325-336.
- ⁴⁵ Pannekeet MM, Mulder JB, Weening JJ, Struijk DG, Zweers MM, Krediet RT. Demonstration of aquaporin-CHIP in peritoneal tissue of uremic and CAPD patients. *Perit Dial Int.* 1996;16 Suppl 1:S54-57.
- ⁴⁶ Flessner MF. Peritoneal ultrafiltration: physiology and failure. *Contrib Nephrol.* 2009;163:7-14.
- ⁴⁷ Frigeri A, Nicchia GP, Balena R, Nico B, Svelto M. Aquaporins in skeletal muscle: reassessment of the functional role of aquaporin-4. *FASEB J.* 2004 May;18(7):905-907.
- ⁴⁸ Waniewski J, Dutka V, Stachowska-Pietka J, Cherniha R. Distributed modeling of glucose-induced osmotic flow. *Adv Perit Dial.* 2007;23:2-6.
- ⁴⁹ Barber BJ, Schultz TJ, Randlett DL. Comparative analysis of protein content in rat mesenteric tissue, peritoneal fluid, and plasma. *Am. J. Physiol.* 1990 May;258(5 Pt 1):G714-718.

-
- ⁵⁰ Wiig H, Reed RK. Interstitial compliance and transcapillary Starling pressures in cat skin and skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 1985 May;248(5 Pt 2):H666-673.
- ⁵¹ Rippe B, Stelin G, Haraldsson B. Computer simulations of peritoneal fluid transport in CAPD. *Kidney Int.* 1991 Aug;40(2):315-325.
- ⁵² Krediet RT, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int.* 2000;20 Suppl 4:S22-42.
- ⁵³ Zhu Q, Carlsson O, Rippe B. Clearance of tracer albumin from peritoneal cavity to plasma at low intraperitoneal volumes and hydrostatic pressures. *Perit Dial Int.* 1998 Oct;18(5):497-504.
- ⁵⁴ Rippe B, Levin L. Computer simulations of ultrafiltration profiles for an icodextrin-based peritoneal fluid in CAPD. *Kidney Int.* 2000 Jun;57(6):2546-2556.
- ⁵⁵ Stelin G, Rippe B. A phenomenological interpretation of the variation in dialysate volume with dwell time in CAPD. *Kidney Int.* 1990 Sep;38(3):465-472.
- ⁵⁶ Abensur H, Romão Júnior JE, Prado EB, Kakehashi E, Sabbaga E, Marcondes M. Influence of the hydrostatic intraperitoneal pressure and the cardiac function on the lymphatic absorption rate of the peritoneal cavity in CAPD. *Adv Perit Dial.* 1993;9:41-45.
- ⁵⁷ Smit W, Langedijk MJ, Schouten N, van den Berg N, Struijk DG, Krediet RT. A comparison between 1.36% and 3.86% glucose dialysis solution for the assessment of peritoneal membrane function. *Perit Dial Int.* 2000 Dec;20(6):734-741.
- ⁵⁸ Waniewski J, Sobiecka D, Debowska M, Heimbürger O, Weryński A, Lindholm B. Fluid and solute transport in CAPD patients before and after permanent loss of ultrafiltration capacity. *Int J Artif Organs.* 2005 Oct;28(10):976-986.
- ⁵⁹ Flessner MF. The effect of fibrosis on peritoneal transport. *Contrib Nephrol.* 2006;150:174-180.
- ⁶⁰ Flessner MF. Endothelial glycocalyx and the peritoneal barrier. *Perit Dial Int.* 2008 Feb;28(1):6-12.
- ⁶¹ van den Berg B, Vink H. Glycocalyx perturbation: cause or consequence of damage to the vasculature? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006 Jun;290(6):H2174-2175.
- ⁶² Brown MD, Egginton S, Hudlicka O, Zhou AL. Appearance of the capillary endothelial glycocalyx in chronically stimulated rat skeletal muscles in relation to angiogenesis. *Exp. Physiol.* 1996 Nov;81(6):1043-1046.

-
- ⁶³ Heimbürger O. Peritoneal physiology. In: Pereira BJ, Sayegh MH, Blake P. *Chronic Kidney Disease, Dialysis and Transplantation: A Companion to Brenner and Rector's the Kidney (2 ed)*. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2005. 491-513.
- ⁶⁴ Krediet RT. Peritoneal Membrane Evaluation in Clinical Practice. 2009. Fonte: NDT Educational. Available from <http://www.ndt-educational.org/kredietslide2009txt.asp>
- ⁶⁵ Twardowski, Z. J., Nolph, K. D., Khanna, R., Prowant, B. F., Ryan, L. P., Moore, H. L., et al. (1987). Peritoneal equilibration test. *Perit Dial Bull*, 7, pp. 138-147.
- ⁶⁶ Warady BA, Alexander SR, Hossli S, Vonesh E, Geary D, Watkins S, et al. Peritoneal membrane transport function in children receiving long-term dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996 Nov;7(11):2385-2391.
- ⁶⁷ Davies SJ, Brown B, Bryan J, Russell GI. Clinical evaluation of the peritoneal equilibration test: a population-based study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1993;8(1):64-70.
- ⁶⁸ Struijk DG, Khanna R. Monitoring the functional status of the peritoneum. In: Khanna R, Krediet RT. *Nolph and Gokal's Textbook of Peritoneal Dialysis (3 ed)*. New York: Springer. 447-68
- ⁶⁹ Mujais S, Nolph K, Gokal R, Blake P, Burkart J, Coles G, et al. Evaluation and management of ultrafiltration problems in peritoneal dialysis. International Society for Peritoneal Dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis. *Perit Dial Int.* 2000;20 Suppl 4:S5-21.
- ⁷⁰ Monquil MC, Imholz AL, Struijk DG, Krediet RT. Does impaired transcellular water transport contribute to net ultrafiltration failure during CAPD? *Perit Dial Int.* 1995;15(1):42-48.
- ⁷¹ La Milia V, Pozzoni P, Crepaldi M, Locatelli F. Overfill of peritoneal dialysis bags as a cause of underestimation of ultrafiltration failure. *Perit Dial Int.* 2006 Aug;26(4):503-505.
- ⁷² Imholz AL, Koomen GC, Struijk DG, Arisz L, Krediet RT. Residual volume measurements in CAPD patients with exogenous and endogenous solutes. *Adv Perit Dial.* 1992;8:33-38.
- ⁷³ Westra WM, Smit W, Zweers MM, Struijk DG, Krediet RT. Diffusion correction of sodium sieving applicable in a peritoneal equilibration test. *Adv Perit Dial.* 2003;19:6-9.

-
- ⁷⁴ La Milia V, Di Filippo S, Crepaldi M, Del Vecchio L, Dell'Oro C, Andrulli S, et al. Mini-peritoneal equilibration test: A simple and fast method to assess free water and small solute transport across the peritoneal membrane. *Kidney Int.* 2005 Aug;68(2):840-846.
- ⁷⁵ Twardowski ZJ. PET--a simpler approach for determining prescriptions for adequate dialysis therapy. *Adv Perit Dial.* 1990;6:186-191.
- ⁷⁶ Adcock A, Fox K, Walker P, Raymond K. Clinical experience and comparative analysis of the standard and fast peritoneal equilibration tests (PET). *Adv Perit Dial.* 1992;8:59-61.
- ⁷⁷ Fischbach M, Lahlou A, Eyer D, Desprez P, Geisert J. Determination of individual ultrafiltration time (APEX) and purification phosphate time by peritoneal equilibration test: application to individual peritoneal dialysis modality prescription in children. *Perit Dial Int.* 1996;16 Suppl 1:S557-560.
- ⁷⁸ Pannekeet MM, Imholz AL, Struijk DG, Koomen GC, Langedijk MJ, Schouten N, et al. The standard peritoneal permeability analysis: a tool for the assessment of peritoneal permeability characteristics in CAPD patients. *Kidney Int.* 1995 Sep;48(3):866-875.
- ⁷⁹ Krediet RT, Struijk DG, Koomen GC, Arisz L. Peritoneal fluid kinetics during CAPD measured with intraperitoneal dextran 70. *ASAIO Trans.* 1991 Dec;37(4):662-667.
- ⁸⁰ Rocco MV, Jordan JR, Burkart JM. 24-hour dialysate collection for determination of peritoneal membrane transport characteristics: longitudinal follow-up data for the dialysis adequacy and transport test (DATT). *Perit Dial Int.* 1996 Dec;16(6):590-593.
- ⁸¹ Vonesh EF, Story KO, O'Neill WT. A multinational clinical validation study of PD ADEQUEST 2.0. PD ADEQUEST International Study Group. *Perit Dial Int.* 1999 Dec;19(6):556-571.
- ⁸² Imai H, Satoh K, Ohtani H, Hamai K, Haseyama T, Komatsuda A, et al. Clinical application of the Personal Dialysis Capacity (PDC) test: serial analysis of peritoneal function in CAPD patients. *Kidney Int.* 1998 Aug;54(2):546-553.
- ⁸³ Gotch FA, Lipps BJ, Keen ML, Panlilio F. Computerized urea kinetic modeling to prescribe and monitor delivered Kt/V (pKt/V, dKt/V) in peritoneal dialysis. Fresenius Randomized Dialysis Prescriptions and Clinical Outcome Study (RDP/CO). *Adv Perit Dial.* 1996;12:43-45.
- ⁸⁴ Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jimenez C, et al. Functional longevity of the human peritoneum: how long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long-term study. *Am. J. Kidney Dis.* 1994 Jan;23(1):64-73.

-
- ⁸⁵ Davies SJ, Bryan J, Phillips L, Russell GI. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996 Mar;11(3):498-506.
- ⁸⁶ Coles GA, Williams JD. The management of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis. *Kidney Int. Suppl.* 1994 Dec;48:S14-17.
- ⁸⁷ Rippe B. How to measure ultrafiltration failure: 2.27% or 3.86% glucose? *Perit Dial Int.* 1997 Apr;17(2):125-128.
- ⁸⁸ Kawaguchi Y, Hasegawa T, Nakayama M, Kubo H, Shigematu T. Issues affecting the longevity of the continuous peritoneal dialysis therapy. *Kidney Int. Suppl.* 1997 Nov;62:S105-107.
- ⁸⁹ Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A, Tranaeus A, Lindholm B. Peritoneal transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int.* 1990 Sep;38(3):495-506.
- ⁹⁰ Smit W, Schouten N, van den Berg N, Langedijk MJ, Struijk DG, Krediet RT. Analysis of the prevalence and causes of ultrafiltration failure during long-term peritoneal dialysis: a cross-sectional study. *Perit Dial Int.* 2004 Dec;24(6):562-570.
- ⁹¹ Ho-dac-Pannekeet MM, Atasever B, Struijk DG, Krediet RT. Analysis of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients by means of standard peritoneal permeability analysis. *Perit Dial Int.* 1997 Apr;17(2):144-150.
- ⁹² Krediet RT, Douma CE, van Olden RW, Ho-dac-Pannekeet MM, Struijk DG. Augmenting solute clearance in peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 1998 Dec;54(6):2218-2225.
- ⁹³ Gokal R, Jakubowski C, King J, Hunt L, Bogle S, Baillod R, et al. Outcome in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis and haemodialysis: 4-year analysis of a prospective multicentre study. *Lancet.* 1987 Nov 14;2(8568):1105-1109.
- ⁹⁴ Adequacy of dialysis and nutrition in continuous peritoneal dialysis: association with clinical outcomes. Canada-USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996 Feb;7(2):198-207.
- ⁹⁵ Genestier S, Hedelin G, Schaffer P, Faller B. Prognostic factors in CAPD patients: a retrospective study of a 10-year period. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1995 Oct;10(10):1905-1911.

-
- ⁹⁶ Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Malatino LS, Zoccali C. Prognostic value of combined use of biomarkers of inflammation, endothelial dysfunction, and myocardial pathology in patients with ESRD. *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2330-2337.
- ⁹⁷ Rutten JHW, Korevaar JC, Boeschoten EW, Dekker FW, Krediet RT, Boomsma F, et al. B-type natriuretic peptide and amino-terminal atrial natriuretic peptide predict survival in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2006 Oct;26(5):598-602.
- ⁹⁸ Brown EA, Davies SJ, Rutherford P, Meeus F, Borrás M, Riegel W, et al. Survival of functionally anuric patients on automated peritoneal dialysis: the European APD Outcome Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003 Nov;14(11):2948-2957.
- ⁹⁹ Jansen MAM, Termorshuizen F, Korevaar JC, Dekker FW, Boeschoten E, Krediet RT. Predictors of survival in anuric peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 2005 Sep;68(3):1199-1205.
- ¹⁰⁰ Krediet RT. Dry body weight: water and sodium removal targets in PD. *Contrib Nephrol.* 2006;150:104-110.
- ¹⁰¹ Krediet RT, Balafa O. Cardiovascular risk in the peritoneal dialysis patient. *Nat Rev Nephrol.* 2010 Aug;6(8):451-460.
- ¹⁰² Verger C, Larpent L, Celicout B. Clinical significance of ultrafiltration failure on CAPD. In: La Greca G, Chiaramonte S, Fabris A, Feriani M, Ronco C. *Peritoneal Dialysis*. Milan: Wichtig Editore. 1986. 91-94.
- ¹⁰³ Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002 Feb;13(2):470-479.
- ¹⁰⁴ Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):389-399.
- ¹⁰⁵ Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int.* 2003 Dec;23(6):530-541.
- ¹⁰⁶ Devuyst O, Topley N, Williams JD. Morphological and functional changes in the dialysed peritoneal cavity: impact of more biocompatible solutions. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002;17 Suppl 3:12-15.
- ¹⁰⁷ Witowski J, Wisniewska J, Korybalska K, Bender TO, Breborowicz A, Gahl GM, et al. Prolonged exposure to glucose degradation products impairs viability and function of human peritoneal mesothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001 Nov;12(11):2434-2441.

-
- ¹⁰⁸ Tauer A, Knerr T, Niwa T, Schaub TP, Lage C, Passlick-Deetjen J, et al. In vitro formation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine and imidazolones under conditions similar to continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 Feb 9;280(5):1408-1414.
- ¹⁰⁹ Kim YS, Kim BC, Song CY, Hong HK, Moon KC, Lee HS. Advanced glycosylation end products stimulate collagen mRNA synthesis in mesangial cells mediated by protein kinase C and transforming growth factor-beta. *J. Lab. Clin. Med.* 2001 Jul;138(1):59-68.
- ¹¹⁰ Lamb EJ, Cattell WR, Dawnay AB. In vitro formation of advanced glycation end products in peritoneal dialysis fluid. *Kidney Int.* 1995 Jun;47(6):1768-1774.
- ¹¹¹ Friedlander MA, Wu YC, Elgawish A, Monnier VM. Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of formation and clearance in peritoneal dialysis. *J. Clin. Invest.* 1996 Feb 1;97(3):728-735.
- ¹¹² Ho-dac-Pannekeet MM, Weiss MF, de Waart DR, Erhard P, Hiralall JK, Krediet RT. Analysis of non enzymatic glycosylation in vivo: impact of different dialysis solutions. *Perit Dial Int.* 1999;19 Suppl 2:S68-74.
- ¹¹³ Nakamura S, Miyazaki S, Sakai S, Morita T, Hirasawa Y, Niwa T. Localization of imidazolone in the peritoneum of capd patients: a factor for a loss of ultrafiltration. *Am. J. Kidney Dis.* 2001 Oct;38(4 Suppl 1):S107-110.
- ¹¹⁴ Honda K, Nitta K, Horita S, Yumura W, Nihei H, Nagai R, et al. Accumulation of advanced glycation end products in the peritoneal vasculature of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with low ultra-filtration. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999 Jun;14(6):1541-1549.
- ¹¹⁵ Park MS, Lee HA, Chu WS, Yang DH, Hwang SD. Peritoneal accumulation of AGE and peritoneal membrane permeability. *Perit Dial Int.* 2000 Aug;20(4):452-460.
- ¹¹⁶ Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000 Apr;11(4):717-728.
- ¹¹⁷ Topley N, Liberek T, Davenport A, Li FK, Fear H, Williams JD. Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. *Kidney Int. Suppl.* 1996 Nov;56:S17-21.
- ¹¹⁸ Topley N, Jörres A, Luttmann W, Petersen MM, Lang MJ, Thierauch KH, et al. Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: induction by IL-1 beta and TNF alpha. *Kidney Int.* 1993 Jan;43(1):226-233.

-
- ¹¹⁹ Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li FK, Leung JC. Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am. J. Kidney Dis.* 2000 Apr;35(4):644-652.
- ¹²⁰ Mlambo NC, Hylander B, Brauner A. Increased levels of transforming growth factor beta 1 and basic fibroblast growth factor in patients on CAPD: a study during non-infected steady state and peritonitis. *Inflammation.* 1999 Apr;23(2):131-139.
- ¹²¹ Stenvinkel P, Heimbürger O, Paultre F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 May;55(5):1899-1911.
- ¹²² Stenvinkel P, Chung SH, Heimbürger O, Lindholm B. Malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 2001;21 Suppl 3:S157-162.
- ¹²³ Wang T, Chen YG, Ye RG, Li SL, Li HQ, Chen YX. Effect of glucose on TGF-beta 1 expression in peritoneal mesothelial cells. *Adv Perit Dial.* 1995;11:7-10.
- ¹²⁴ Kumano K, Schiller B, Hjelle JT, Moran J. Effects of osmotic solutes on fibronectin mRNA expression in rat peritoneal mesothelial cells. *Blood Purif.* 1996;14(2):165-169.
- ¹²⁵ Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gaultie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001 Oct;12(10):2029-2039.
- ¹²⁶ Zweers MM, Struijk DG, Smit W, Krediet RT. Vascular endothelial growth factor in peritoneal dialysis: a longitudinal follow-up. *J. Lab. Clin. Med.* 2001 Feb;137(2):125-132.
- ¹²⁷ Zweers MM, de Waart DR, Smit W, Struijk DG, Krediet RT. Growth factors VEGF and TGF-beta1 in peritoneal dialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 1999 Aug;134(2):124-132.
- ¹²⁸ Pecoits-Filho R, Araújo MRT, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romão JE Jr, et al. Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002 Aug;17(8):1480-1486.
- ¹²⁹ Selgas R, del Peso G, Bajo MA, Molina S, Cirugeda A, Sánchez-Tomero JA, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in peritoneal dialysis effluent. *J. Nephrol.* 2001 Aug;14(4):270-274.
- ¹³⁰ De Vriese AS, Tilton RG, Stephan CC, Lameire NH. Vascular endothelial growth factor is essential for hyperglycemia-induced structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001 Aug;12(8):1734-1741.

-
- ¹³¹ Schwenger V, Morath C, Salava A, Amann K, Seregin Y, Deppisch R, et al. Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end-products. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006 Jan;17(1):199-207.
- ¹³² De Vriese AS, Flyvbjerg A, Mortier S, Tilton RG, Lameire NH. Inhibition of the interaction of AGE-RAGE prevents hyperglycemia-induced fibrosis of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003 Aug;14(8):2109-2118.
- ¹³³ Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 1982 Oct;95(1):333-339.
- ¹³⁴ Zuk A, Matlin KS, Hay ED. Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. *J. Cell Biol.* 1989 Mar;108(3):903-919.
- ¹³⁵ Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* 2007 Aug;13(8):952-961.
- ¹³⁶ Flier SN, Tanjore H, Kokkotou EG, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. *J. Biol. Chem.* 2010 Jun 25;285(26):20202-20212.
- ¹³⁷ Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-454.
- ¹³⁸ Zeisberg, M., & Neilson, E. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*, 119, pp. 1429-1437.
- ¹³⁹ Zeisberg M, Duffield JS. Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010 Aug;21(8):1247-1253.
- ¹⁴⁰ Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N. Engl. J. Med.* 2003 Jan 30;348(5):403-413.
- ¹⁴¹ Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, et al. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch.* 2004 Mar;444(3):247-256.
- ¹⁴² Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in

peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007 Jul;18(7):2004-2013.

¹⁴³ Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development.* 2005 Jul;132(14):3151-3161.

¹⁴⁴ Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):927-939.

¹⁴⁵ Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871-890.

¹⁴⁶ Ha H, Yu MR, Choi HN, Cha MK, Kang HS, Kim MH, et al. Effects of conventional and new peritoneal dialysis solutions on human peritoneal mesothelial cell viability and proliferation. *Perit Dial Int.* 2000;20 Suppl 5:S10-18.

¹⁴⁷ Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II as a renal growth factor. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993 Mar;3(9):1531-1540.

¹⁴⁸ Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1993 Nov 11;329(20):1456-1462.

¹⁴⁹ Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 2001 Sep 20;345(12):851-860.

¹⁵⁰ Li PK-T, Chow K-M, Wong TY-H, Leung C-B, Szeto C-C. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on residual renal function in patients receiving peritoneal dialysis. A randomized, controlled study. *Ann. Intern. Med.* 2003 Jul 15;139(2):105-112.

¹⁵¹ Kolesnyk I, Dekker FW, Noordzij M, le Cessie S, Struijk DG, Krediet RT. Impact of ACE inhibitors and AII receptor blockers on peritoneal membrane transport characteristics in long-term peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 2007 Aug;27(4):446-453.

¹⁵² Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, Albar-Vizcaíno P, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, et al. BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010 Apr;25(4):1098-1108.

¹⁵³ Bui DSS, Seguro AC, Shimitzu MH, Schliemann I, Martini D, Romão JEJ, et al. N-Acetylcysteine protects the peritoneum from the injury induced by hypertonic dialysis

solution. *J Nephrol* [Internet]. 2011 Jun 9 [cited 2011 Aug 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21667456>

¹⁵⁴ Feldman LS. Effect of N-Acetylcysteine on Peritoneal Membrane Function in Chronic Peritoneal Dialysis Patients. Fonte: clinicaltrials.gov: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00421785>

¹⁵⁵ Yu M. Anti-Oxidant Effect on Peritoneal Membrane in Peritoneal Dialysis (PD) Patients. ClinicalTrials.gov: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01111422>

¹⁵⁶ Ersoy R, Celik A, Yilmaz O, Sarioglu S, Sis B, Akan P, et al. The effects of irbesartan and spironolactone in prevention of peritoneal fibrosis in rats. *Perit Dial Int*. 2007 Aug;27(4):424-431.

¹⁵⁷ Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Loureiro J, Aguilera A, Ramírez-Huesca M, González-Mateo G, et al. Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009 Mar;20(3):582-592.

¹⁵⁸ Stegmayr BG. Beta-blockers may cause ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*. 1997 Dec;17(6):541-545.

¹⁵⁹ Brown P, Baddeley H, Read AE, Davies JD, McGarry J. Sclerosing peritonitis, an unusual reaction to a beta-adrenergic-blocking drug (practolol). *Lancet*. 1974 Dec 21;2(7895):1477-1481.

¹⁶⁰ Kroeger RJ, Groszmann RJ. Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model. *Hepatology*. 1985 Feb;5(1):97-101.

¹⁶¹ Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, Carey W. Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis. *Hepatology*. 2007 Sep;46(3):922-938.

¹⁶² Krediet RT. Beta-blockers and ultrafiltration failure. *Perit Dial Int*. 1997 Dec;17(6):528-531..

¹⁶³ Swedberg K. History of Beta blockers in congestive heart failure. *Heart*. 1998 Jun;79(Suppl 2):S29-30.

¹⁶⁴ Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N. Engl. J. Med*. 1996 May 23;334(21):1349-1355.

-
- ¹⁶⁵ A randomized trial of beta-blockade in heart failure. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). CIBIS Investigators and Committees. *Circulation*. 1994 Oct;90(4):1765-1773.
- ¹⁶⁶ Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 Focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009 Apr 14;53(15):e1-e90.
- ¹⁶⁷ Hunt SA. ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005 Sep 20;46(6):e1-82.
- ¹⁶⁸ Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C-yuan. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* 2004 Sep 23;351(13):1296-1305.
- ¹⁶⁹ Cockcroft JR, Chowienzyk PJ, Brett SE, Chen CP, Dupont AG, Van Nueten L, et al. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995 Sep;274(3):1067-1071.
- ¹⁷⁰ Brixius K, Bundkirchen A, Bölck B, Mehlhorn U, Schwinger RH. Nebivolol, bucindolol, metoprolol and carvedilol are devoid of intrinsic sympathomimetic activity in human myocardium. *Br. J. Pharmacol.* 2001 Aug;133(8):1330-1338.
- ¹⁷¹ Dessy C, Saliez J, Ghisdal P, Daneau G, Lobysheva II, Frérart F, et al. Endothelial beta3-adrenoreceptors mediate nitric oxide-dependent vasorelaxation of coronary microvessels in response to the third-generation beta-blocker nebivolol. *Circulation*. 2005 Aug 23;112(8):1198-1205.
- ¹⁷² Gupta S, Wright HM. Nebivolol: a highly selective beta1-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitric oxide. *Cardiovasc Ther.* 2008;26(3):189-202.
- ¹⁷³ Bowman AJ, Chen CP, Ford GA. Nitric oxide mediated venodilator effects of nebivolol. *Br J Clin Pharmacol.* 1994 Sep;38(3):199-204.
- ¹⁷⁴ Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, et al. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric

oxide synthase pathway in human ventricle. *J. Clin. Invest.* 1998 Oct 1;102(7):1377-1384.

¹⁷⁵ Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Nava C, Davoli A, Criscuoli M, et al. Nebivolol and its 4-keto derivative increase nitric oxide in endothelial cells by reducing its oxidative inactivation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003 Nov 19;42(10):1838-1844.

¹⁷⁶ Mason RP. Nitric oxide mechanisms in the pathogenesis of global risk. *J Clin Hypertens* (Greenwich). 2006 Aug;8(8 Suppl 2):31-38; quiz 40.

¹⁷⁷ Flather MD, Shibata MC, Coats AJS, Van Veldhuisen DJ, Parkhomenko A, Borbola J, et al. Randomized trial to determine the effect of nebivolol on mortality and cardiovascular hospital admission in elderly patients with heart failure (SENIORS). *Eur. Heart J.* 2005 Feb;26(3):215-225.

¹⁷⁸ Ghio S, Magrini G, Serio A, Klersy C, Fucili A, Fucilli A, et al. Effects of nebivolol in elderly heart failure patients with or without systolic left ventricular dysfunction: results of the SENIORS echocardiographic substudy. *Eur. Heart J.* 2006 Mar;27(5):562-568.

¹⁷⁹ Edes I, Gasior Z, Wita K. Effects of nebivolol on left ventricular function in elderly patients with chronic heart failure: results of the ENECA study. *Eur. J. Heart Fail.* 2005 Jun;7(4):631-639.

¹⁸⁰ Bajo MA, Selgas R, Jimenez C, Del Peso G, Fernandez-Reyes MJ, Dapena F, De Alvaro F. CAPD for treatment of ESRD patients with ascites secondary to liver cirrhosis. *Adv Perit Dial.* 1994;10:73-6.

¹⁸¹ González-Mateo GT, Loureiro J, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Selgas R, López-Cabrera ML, Aroeira LS. Chronic exposure of mouse peritoneum to peritoneal dialysis fluid: structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* 29: 227-233, 2009.

¹⁸² Wang Y, Zhang M, Liu Y, Liu Y, Chen M. The effect of nebivolol on asymmetric dimethylarginine system in spontaneously hypertension rats. *Vascul. Pharmacol.* 2011 Feb;54(1-2):36-43.

¹⁸³ Whaley-Connell A, Habibi J, Johnson M, Tilmon R, Rehmer N, Rehmer J, et al. Nebivolol reduces proteinuria and renal NADPH oxidase-generated reactive oxygen species in the transgenic Ren2 rat. *Am. J. Nephrol.* 2009;30(4):354-360.

¹⁸⁴ Aroeira LS, Loureiro J, González-Mateo GT, Fernandez-Millara V, Del Peso G, Sánchez-Tomero JÁ, Ruiz-Ortega M, Bajo MA, López-Cabrera M, Selgas R. Characterization of epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells in a

mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. *Perit Dial Int* 2008 28:S29-S33.

¹⁸⁵ Davies SJ. Longitudinal relationship between solute transport and ultrafiltration capacity in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int*. 2004 Dec;66(6):2437-2445.

¹⁸⁶ Parikova A, Smit W, Struijk DG, Krediet RT. Analysis of fluid transport pathways and their determinants in peritoneal dialysis patients with ultrafiltration failure. *Kidney Int*. 2006 Dec;70(11):1988-1994.

¹⁸⁷ Saura M, Zaragoza C, Herranz B, Grieria M, Diez-Marqués L, Rodriguez-Puyol D, et al. Nitric oxide regulates transforming growth factor-beta signaling in endothelial cells. *Circ. Res*. 2005 Nov 25;97(11):1115-1123.

¹⁸⁸ Craven PA, Studer RK, Felder J, Phillips S, DeRubertis FR. Nitric oxide inhibition of transforming growth factor-beta and collagen synthesis in mesangial cells. *Diabetes*. 1997 Apr;46(4):671-681.

¹⁸⁹ Srinivas V, Leshchinsky I, Sang N, King MP, Minchenko A, Caro J. Oxygen sensing and HIF-1 activation does not require an active mitochondrial respiratory chain electron-transfer pathway. *J. Biol. Chem*. 2001 Jun 22;276(25):21995-21998.

¹⁹⁰ Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J. Biol. Chem*. 2000 Aug 18; 275(33):25130-25138.

¹⁹¹ Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 1993 Jun; 42(6):801-813.

¹⁹² Nyengaard JR, Ido Y, Kilo C, Williamson JR. Interactions between hyperglycemia and hypoxia: implications for diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004 Nov; 53(11):2931-2938.

¹⁹³ Diederer RMH, Starnes CA, Berkowitz BA, Winkler BS. Reexamining the Hyperglycemic Pseudohypoxia Hypothesis of Diabetic Oculopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006 Jun 1;47(6):2726 -2731.

¹⁹⁴ Krediet RT, Zweers MM, van Westrhenen R, Ho-dac-Pannekeet MM, Struijk DG. What can we do to preserve the peritoneum? *Perit Dial Int*. 2003 Dec; 23 Suppl 2:S14-19.

-
- ¹⁹⁵ Whaley-Connell A, Habibi J, Johnson M, Tilmon R, Rehmer N, Rehmer J, et al. Nebivolol reduces proteinuria and renal NADPH oxidase-generated reactive oxygen species in the transgenic Ren2 rat. *Am. J. Nephrol.* 2009; 30(4):354-360.
- ¹⁹⁶ Manthey D, Gamerdinger M, Behl C. The selective beta1-adrenoceptor antagonist nebivolol is a potential oestrogen receptor agonist with neuroprotective abilities. *Br. J. Pharmacol.* 2010 Mar; 159(6):1264-1273.
- ¹⁹⁷ Goto N, Hiyoshi H, Ito I, Tsuchiya M, Nakajima Y, Yanagisawa J. Estrogen and antiestrogens alter breast cancer invasiveness by modulating the transforming growth factor- β signaling pathway. *Cancer Science.* 2011 Aug 1;102(8):1501-1508.
- ¹⁹⁸ Agabiti Rosei E, Rizzoni D. Metabolic profile of nebivolol, a beta-adrenoceptor antagonist with unique characteristics. *Drugs.* 2007; 67(8):1097-1107.
- ¹⁹⁹ Celik T, Iyisoy A, Kursaklioglu H, Kardesoglu E, Kilic S, Turhan H, et al. Comparative effects of nebivolol and metoprolol on oxidative stress, insulin resistance, plasma adiponectin and soluble P-selectin levels in hypertensive patients. *J. Hypertens.* 2006 Mar;24(3):591-596.
- ²⁰⁰ Rizos E, Bairaktari E, Kostoula A, Hasiotis G, Achimastos A, Ganotakis E, et al. The combination of nebivolol plus pravastatin is associated with a more beneficial metabolic profile compared to that of atenolol plus pravastatin in hypertensive patients with dyslipidemia: a pilot study. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2003 Jun;8(2):127-134.