



**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA**

JACQUELINE FERRITTO REBELLO

**Efeito da vitamina 25 (OH) D₃ sobre a expressão de
receptor TOLL-LIKE (TLR-4) e mediadores inflamatórios sobre
células endoteliais (HUVEC) no ambiente urêmico**

**SÃO PAULO, SP
2016**

JACQUELINE FERRITTO REBELLO

**Efeito da vitamina 25 (OH) D₃ sobre a expressão de
receptor TOLL-LIKE (TLR-4) e mediadores inflamatórios sobre
células endoteliais (HUVEC) no ambiente urêmico**

Dissertação apresentada à Universidade
Nove de Julho para obtenção do título de
Mestre em Medicina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Aparecida
Dalboni

**SÃO PAULO, SP
2016**

Rebello, Jacqueline Ferritto.

Efeito da vitamina 25 (OH) D₃ sobre a expressão de receptor Toll-like (TLR-4) e mediadores inflamatórios sobre células endoteliais (HUVEC) no ambiente urêmico. / Jacqueline Ferritto Rebello. 2016.

51f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2016.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Dalboni.

1. Doença renal crônica. 2. Vitamina D. 3. Receptor Toll-like. 4. Citocinas. 5. HUVEC.

I. Dalboni, Maria Aparecida.

II. Título.

CDU 616

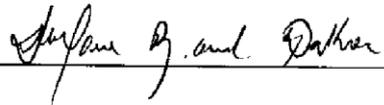
São Paulo, 12 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

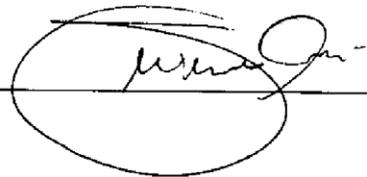
Aluna: **Jacqueline Ferrito Rebello**

Título da Dissertação: **“EFEITO DA VITAMINA 25 (OH)D SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTOR TOLL-LIKE E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS HUVEC NO AMBIENTE URÊMICO”**

Presidente: Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni



Membro: Profa. Dra. Luciene Machado dos Reis



Membro: Prof. Dr. Humberto Delle



RESUMO

INTRODUÇÃO: A principal causa de mortalidade em pacientes com Doença Renal Crônica (DRC) são as Doenças Cardiovasculares (DCV) associadas a mecanismos inflamatórios que resultam em disfunção e lesão endotelial. A deficiência de vitamina 25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃ (forma ativa) e o ambiente urêmico pró-inflamatório podem estar envolvidos na inflamação via ativação de receptores toll-like (TLR). Além disso, sabe-se que a 1,25(OH)₂D₃ exerce função imunomoduladora em vários tipos celulares, entretanto não está claro se a suplementação com 25(OH)D₃ pode modular resposta inflamatória nas células endoteliais frente ao ambiente urêmico. **OBJETIVO:** Desta forma o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da 25(OH)D₃ sobre as expressões de marcadores inflamatórios e mecanismo intracelular da Vitamina D em células endoteliais frente ao ambiente urêmico. **MATERIAIS E MÉTODOS:** As células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) foram incubadas na presença ou ausência de soro urêmico, tratadas ou não com 25(OH)D₃ por 24h. Após incubação, avaliamos os mediadores inflamatórios: toll-like (TLR-4), ICAM-I (CD54), HLA-DR e Espécies reativas de oxigênio (ERO) e os mecanismos intracelulares da Vitamina D: Receptor de Vitamina D (VDR), 1-alpha-hydroxylase (CYP27) e 24-hydroxylase (CYP24) por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Observamos que o insulto com soro urêmico induziu menor expressão de TLR-4 comparado com o soro sadio em HUVEC. O tratamento com 25(OH)D₃ não teve efeito na modulação do TLR-4 nestas células. Quanto à produção de ERO, houve um aumento significativo na sua expressão no grupo de HUVEC insultadas com soro urêmico, entretanto o tratamento com 25(OH)D₃ não diminuiu a produção de ERO nestas células. Não observamos diferenças significativas na expressão de VDR, CYP24 e CYP27 entre os grupos. Observamos correlação positiva entre IL-10, ERO e MCP-1 e entre catelicidina, IL-10, TNF α e MCP-1. Observou-se uma correlação negativa entre TLR-4 e ERO. **DISCUSSÃO:** Este estudo demonstrou que o soro urêmico diminui TLR-4, não alterou os mecanismos intracelulares da vitamina D e aumentou a produção de citocinas inflamatórias e ERO, entretanto o pré-tratamento agudo com 25(OH)D₃ não demonstrou efeito sobre estes marcadores. Desta forma, estes dados reforçam que são necessários mais estudos com diferentes abordagens tempo-resposta para elucidar mecanismos que possam minimizar a inflamação e suas consequências fisiopatológicas e diversas complicações em células endoteliais frente ao ambiente urêmico.

Palavras Chave: Vitamina D. Receptor toll-like. Citocinas. Uremia. Doenças cardiovasculares.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The main cause of mortality in patients with chronic kidney disease (CKD) are Cardiovascular Diseases (CVD); associated with inflammatory mechanisms, which result in endothelial dysfunction and injury. A deficiency of 25(OH)D₃ and/or 1,25(OH)₂D₃ together with uremic environment may be responsible by poor outcome and activation of the Toll-like receptors (TLR). Furthermore, it is known that 1,25(OH)₂D₃ exerts immunomodulatory function in various cell types; however it is unclear whether supplementation with 25(OH)D₃ might modulate inflammatory response in endothelial cells against uremic environment. **OBJECTIVE:** The aim of this study was to evaluate the effect of 25(OH)D₃ on the expression of inflammatory markers and intracellular Vitamin D mechanism in endothelial cells against the uremic environment. **MATERIALS AND METHODS:** Endothelial cells from human umbilical cord (HUVEC) were incubated in the presence or absence of uremic serum treated or not treated with 25(OH)D₃ for 24h. After incubation, we investigated the inflammatory mediators: Toll-like (TLR-4), ICAM-I (CD54), HLA-DR, Oxidative Stress (ROS) and intracellular mechanisms of Vitamin D Receptor (VDR), 1 α -hydroxylase (CYP27) and 24-hydroxylase (CYP24) by flow cytometry. **RESULTS:** The uremic serum induced lower expression of TLR-4 compared with the healthy serum HUVEC. Treatment with 25(OH)D₃ had no effect on the modulation of TLR-4 in these cells. For production of ROS, as expected, there was a higher expression in HUVEC stimulated with uremic serum. However, the treatment with 25(OH)D₃ not decreased ROS production in these cells. We did not observe differences in the expression of VDR, CYP24 and CYP27 in any groups. We observe a positive correlation between IL-10, MCP-1 and ROS and cathelicidin, IL-10, TNF α and MCP1. There was a negative correlation between TLR-4 and ROS **DISCUSSION:** This study showed that the uremic serum induced a lower expression of TLR-4, higher expression of cytokines and ROS. Unfortunately, the treatment with 25(OH)D₃ was not sufficient to diminish these inflammation mechanisms in HUVEC. Thus, it is necessary future studies to evaluate the impact of time response from 25(OH)D₃ or 1,25(OH)₂D₃ in HUVEC in uremic model.

Key words: Vitamin. Toll-like receptor. Cytokines. Uremia. Cardiovascular Diseases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos estágios da doença renal crônica	11
Tabela 2	Classificação das toxinas urêmicas de acordo com suas características físico-químicas e remoção por diálise	12
Tabela 3	Descrição dos kits de <i>ELISA</i> utilizados	34
Tabela 4	Expressão de TLR-4, ERO, VDR, CYP27, CYP24, IL-10, MCP-1, TNF α e Catelicidina em HUVEC na presença e ausência de 25(OH)D ₃ frente ao insulto com soro de indivíduos saudáveis e soro de indivíduos urêmicos	36
Tabela 5	Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre as variáveis analisadas	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Incubação de 5x10 ⁵ de células na ausência e presença de pré-tratamento com vitamina D, insultado com soro de indivíduos saudáveis e soro de indivíduos urêmicos	27
Quadro 2	Descrição dos monoclonais utilizados para detecção de TLR-4, CD54 e HLA-DR	27
Quadro 3	Descrição dos anticorpos conjugados utilizados	30
Quadro 4	Descrição do ensaio para avaliação de ERO.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxa de prevalência estimada de pacientes em diálise no Brasil 2010-2014.....	11
Figura 2	Evolução da resposta inflamatória aguda e crônica.....	13
Figura 3	Sinalizações envolvidas na síntese de citocinas pela ativação de receptores <i>toll-like</i> (TLRs).....	15
Figura 4	Efeitos das toxinas urêmicas sobre citocinas pró e anti-inflamatórias e suas associações com comorbidades da DRC.....	16
Figura 5	Interações de células monócito-endotelial no processo de desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.....	17
Figura 6	Expressão de selectinas e integrinas nas células endoteliais	18
Figura 7	Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese de 1,25 (OH) ₂ D ₃ e respectivas ações em órgãos alvos	19
Figura 8	Esquematização da ação da vitamina D na síntese de peptídeo antimicrobiano	21
Figura 9	Demonstração da caracterização de células HUVEC.....	24
Figura 10	Parâmetros Bioquímicos no <i>Pool</i> de soro normal e soro urêmico	26
Figura 11	Desenho do Estudo	26
Figura 12	Exemplo de expressão de CD54+, TLR-4 e HLA-DR em células HUVEC por citometria de fluxo	29
Figura 13	Demonstração do ajuste da auto fluorescência das células HUVEC e expressão intracelular de CYP27, CYP24 e VDR	31
Figura 14	Demonstração do ajuste da auto fluorescência das células HUVEC e expressão da análise de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)-FITC ...	33
Figura 15	Expressão de TLR-4 em células HUVEC incubadas com e sem soro Urêmico, tratadas ou não com 25(OH)D ₃	37
Figura 16	Expressão de ERO em células HUVEC incubadas com e sem soro Urêmico, tratadas ou não com 25(OH)D ₃	37
Figura 17	Expressão de TNF- α em células HUVEC incubadas com e sem soro Urêmico, tratadas ou não com 25(OH)D ₃	38
Figura 18	Expressão de MCP-1 em células HUVEC incubadas com e sem soro Urêmico, tratadas ou não com 25(OH)D ₃	38
Figura 19	Expressão de IL-10 em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D ₃	39

Figura 20	Expressão de catelicidina em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D ₃	39
Figura 21	Correlação entre a expressão de TNF- α e IL-10, MCP-1 e Catelicidina em células HUVEC.....	41
Figura 22	Correlação entre a expressão de Catelicidina e IL-10 e MCP-1 em células HUVEC.....	41
Figura 23	Correlação entre a expressão de ERO com CY24 e IL-10 em células HUVEC.....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DRC	Doença Renal Crônica
DCV	Doenças Cardiovasculares
HD	Hemodiálise
TFG	Taxa de filtração glomerular
PTH	hormônio da paratireoide ou paratormônio
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (do inglês)
HASMC	<i>human aortic smooth muscle cells</i> (do inglês)
25(OH)D₃	25 Hidroxivitamina D, Calcidiol
1,25(OH)₂D₃	1,25 Dihidroxivitamina D, Calcitriol
D₃	Vitamina D ou Colecalciferol
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> (do inglês)
VDBP	<i>Vitamin D Binding Protein</i> (do inglês)
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i> (do inglês)
CYP27	27-Hidroxilase ou 1 alfa hidroxilase
CYP24	24-hidroxilase
PCS	p-cresilsulfato
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i> (do inglês)
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Microbial Patterns</i> (do inglês)
DAMPs	<i>Danger-Associated Molecular Patterns</i> (do inglês)
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Factor 88</i> (do inglês)
NFκB	<i>Factor Nuclear Kappa B</i> (do inglês)
MIF	média de intensidade de fluorescência
CD	<i>cluster of differentiation</i> (do inglês)
IL	Interleucina
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (do inglês)
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (do inglês)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
TNFα	Fator de Necrose Tumoral - α
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen - antigen D Related</i> (do inglês)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA	10
1.2 INFLAMAÇÃO	13
1.3 VITAMINA D	18
2 OBJETIVO GERAL	23
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 OBTENÇÃO DOS POOSDE SORO NORMAL E SORO URÊMICO	25
3.2 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE TLR-4, CD54 E HLA-DR	27
3.3 ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO	28
3.4 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE VDR, CYP27 E CYP24	30
3.5 CITOMETRIA DE FLUXO PARA DETECÇÃO DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	32
3.6 ENSAIO IMUNO ENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IL-6, IL-10, TNF- A, CATELICIDINA, VEGF, MCP-1 E NFKB.....	33
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS	35
5 DISCUSSÃO	42
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	51

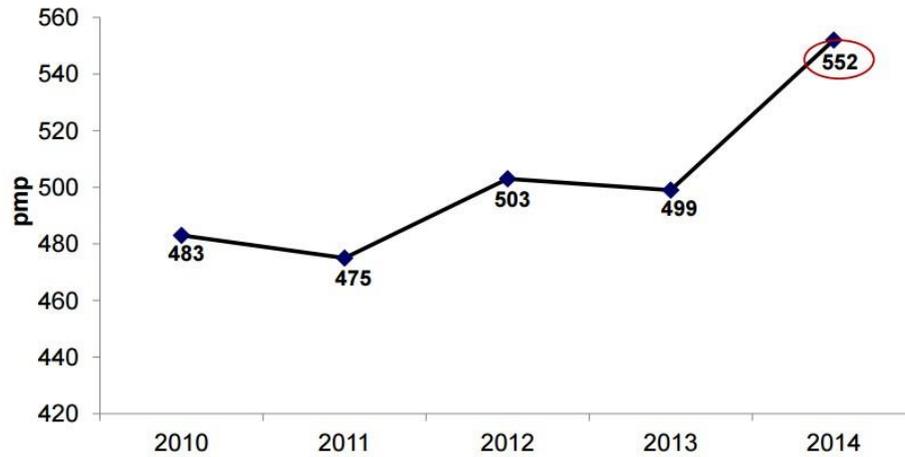
1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por cerca de 60% das causas de mortes em todo mundo, afetando cerca de 35 milhões de pessoas por ano.¹ Dentre os principais tipos de DCNT, a doença cardiovascular (DCV) é a que tem o maior impacto epidemiológico, sendo responsável por cerca de 30% de todas as mortes no mundo.² A DCV tem aumentado progressivamente, por conta do acúmulo de fatores de risco tradicionais como hipertensão e diabetes.³ Além destes, a doença renal crônica (DRC) caracterizada pela perda da filtração glomerular também têm aumentado a incidência de mortalidade por DCV.^{4,5}

A DRC tem sido considerada um problema de saúde pública. Segundo a análise do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) cerca de 13% da população adulta nos EUA apresenta algum grau de perda de função renal.⁶ O NKF e o KDOQI (*The National Kidney Foundation e o Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) relata um aumento importante da literatura sobre DRC nos últimos anos, refletindo a grande incidência desta doença. No Brasil, a taxa de prevalência estimada de pacientes em diálise teve um aumento constante entre os anos de 2010 e 2014⁷. (Figura 1) Estes números se correlacionam com tendências globais sugerindo que as despesas de saúde com DRC e pacientes implicarão em maior gasto; assim como com elevadas taxas de morbidade e mortalidade; reforçando a importância das medidas de prevenção.⁶

Os principais fatores de risco para a DRC são: hipertensão arterial, diabetes *melittus*, obesidade, tabagismo, idade acima de 50 anos e história familiar de doença renal entre outras.⁸



Fonte: Sociedade Brasileira de Nefrologia.⁷

Figura 1 – Taxa de prevalência estimada de pacientes em diálise no Brasil 2010 - 2014

A DRC é definida por qualquer indivíduo que, independente da causa, apresente por pelo menos três meses consecutivos diminuição da função renal indicada pela diminuição da excreção de creatinina (taxa de filtração glomerular = TFG < 60 ml/min/1,73m² e aumento da creatinina sérica > 1,3 mg/dL). Nos casos de pacientes com TFG ≥ 60 ml/min/1,73m², considera-se DRC em estágios 1 e 2 da DRC (Tabela 1), pacientes que apresentem pelo menos um marcador de dano renal parenquimatoso ou alteração no exame de imagem.¹

Para melhor avaliação e tratamento dos pacientes com DRC, bem como para uma melhor estimativa de prognóstico, é necessário que, todos os pacientes diagnosticados sejam classificados, de acordo com os estágios da DRC descrito na tabela abaixo:

Tabela 1 – Classificação dos estágios da doença renal crônica

Estágio	TFG (ml/min/1,73m ²)
1	≥ 90
2	60 – 89
3a	45 - 59
3b	30 - 44
4	15 - 29
5	< 15

Fonte: Diretrizes clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica no SUS.¹

Com a perda da função renal e a queda na taxa de filtração glomerular, ocorrem vários distúrbios, dentre eles, hidroeletrólíticos, no metabolismo mineral, no equilíbrio ácido-básico e acúmulo progressivo de substâncias tóxicas denominadas toxinas urêmicas, fenômeno este conhecido como uremia.^{10,11}

As Toxinas Urêmicas tem sido alvo de pesquisa, principalmente pelo grupo Europeu de Toxinas Urêmicas (EUTox) que contribui ativamente para identificação e efeitos tóxicos das toxinas urêmicas. Atualmente, seu banco de dados conta com uma lista de 152 solutos de retenção urêmica identificados e divididos em 3 classes, de acordo com suas características físico-químicas e peso molecular.¹²

Tabela 2 – Classificação das toxinas urêmicas de acordo com suas características físico-químicas e peso molecular

Classificação	Características	Toxicidade
Moléculas pequenas geralmente solúveis em água	Peso Molecular (PM) máximo 500 Daltons (Da) facilmente removidas por diálise	Não necessariamente tóxicas
Moléculas Médias	PM > 500 Da Possível remover por diálise	Afetam um grande número de órgãos e sistemas
Moléculas ligadas a proteínas	Geralmente baixo PM e difíceis de remover por diálise	Exercem grande variedade de efeitos tóxicos

Fonte: Adaptado de VANHOLDER; GLORIEUX, 2003.¹¹

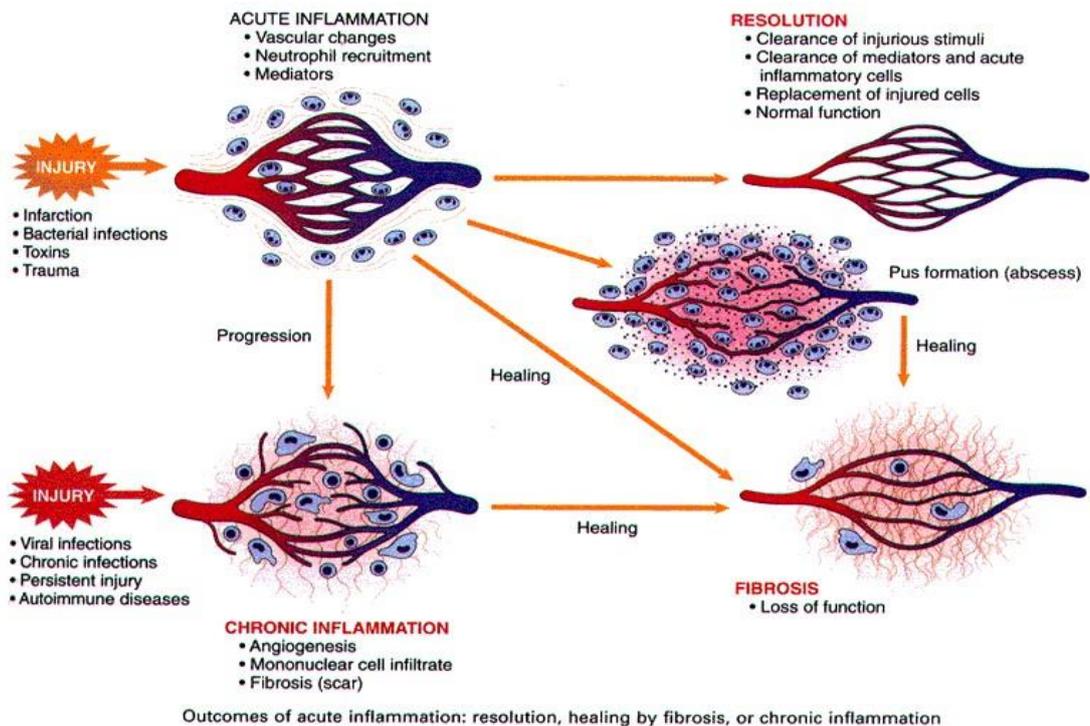
Diversos são os efeitos destas toxinas nas células de todo o organismo; principalmente das toxinas ligadas a proteínas, uma vez que dificilmente são removidas por diálise.^{10,11,12}

Na literatura existem diversos trabalhos demonstrando os efeitos das toxinas urêmicas na inflamação, principalmente no endotélio. Acredita-se que a exposição constante do endotélio a toxinas urêmicas possa levar as mudanças no fenótipo, função celular e expressão de moléculas inflamatórias; contribuindo para lesões vasculares.^{13,14}

1.2 INFLAMAÇÃO E RECEPTOR TOLL-LIKE

A inflamação é uma resposta fisiológica e complexa que ocorre no período de horas até 7 dias com a função de eliminar bactérias, fungos, vírus e alguns protozoários; além de tecidos necróticos ou micropartículas celulares (Figura 2).^{15,16}

Assim, esta pode ocorrer de forma aguda com aumento de mediadores inflamatórios e fagocitose, com a finalidade de eliminação do agente infeccioso e não infeccioso seguido do declínio da geração de mediadores inflamatórios e o aumento de mediadores envolvidos no reparo do tecido lesado. A forma crônica ocorre quando o agente infeccioso e não infeccioso ou ainda partículas e restos celulares de lesões teciduais não são removidos adequadamente e a geração de mediadores inflamatórios se torna contínua, resultando em efeito deletério local e sistêmico.^{15,16} (Figura 2)



Fonte: Robbins and Cotran, pathologic Basics of Diseases, 2009.¹⁵

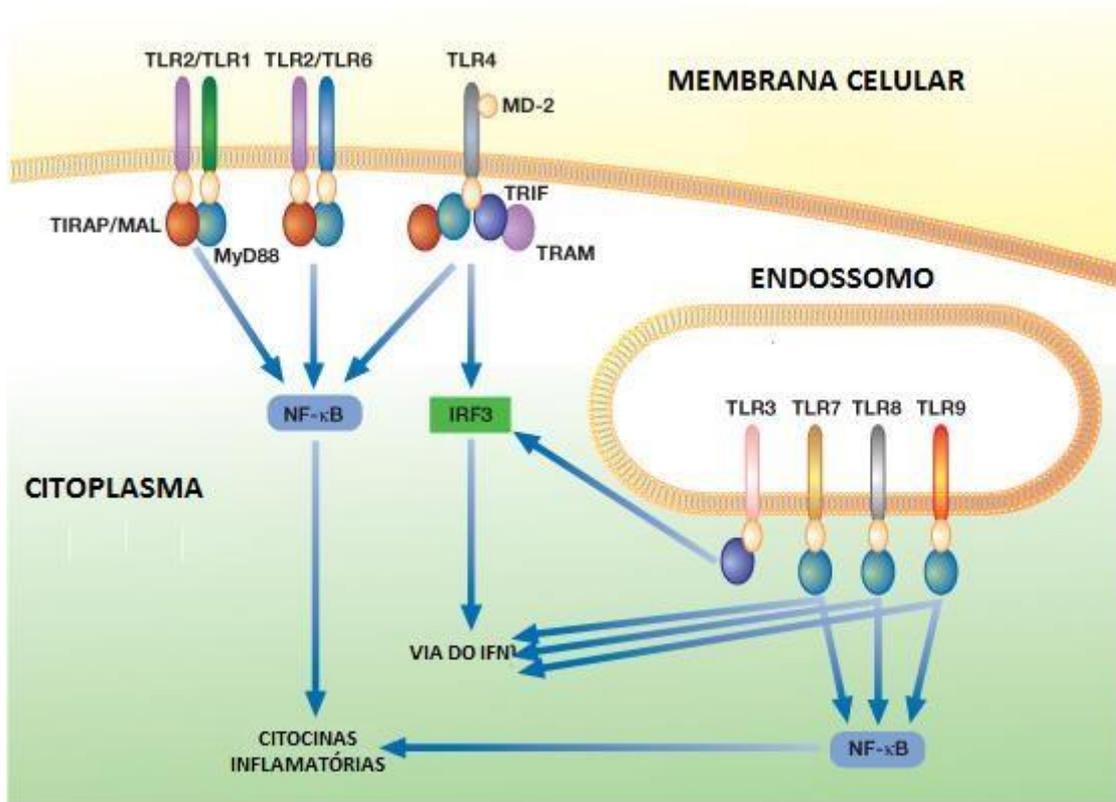
Figura 2 - Evolução da resposta inflamatória aguda e crônica

Um dos mecanismos da resposta inflamatória envolve os *Toll-like receptors* (TLRs) que são receptores presentes nas membranas de vários tipos celulares que reconhecem padrões moleculares estáveis de agentes infecciosos os PAMPs (*pathogen-associated microbial patterns*) (que não sofrem mutação) e outro grupo de moléculas estáveis chamado de DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), p. ex: proteínas intracelulares como as *heat shock proteins*.^{17,18}

Até o momento 13 tipos de TLRs já foram descritos, porém apenas os receptores 1 ao 9 têm conhecidos suas respectivas funções em humanos.^{17,18}

Os tipos 1, 2, 4, 5 e 6 são expressos na membrana plasmática, enquanto que os tipos 3, 7, 8 e 9 estão localizados no endossomo. Eles estão presentes em diversos tipos celulares, como neutrófilos, monócitos, linfócitos e células endoteliais.^{18,19,20}

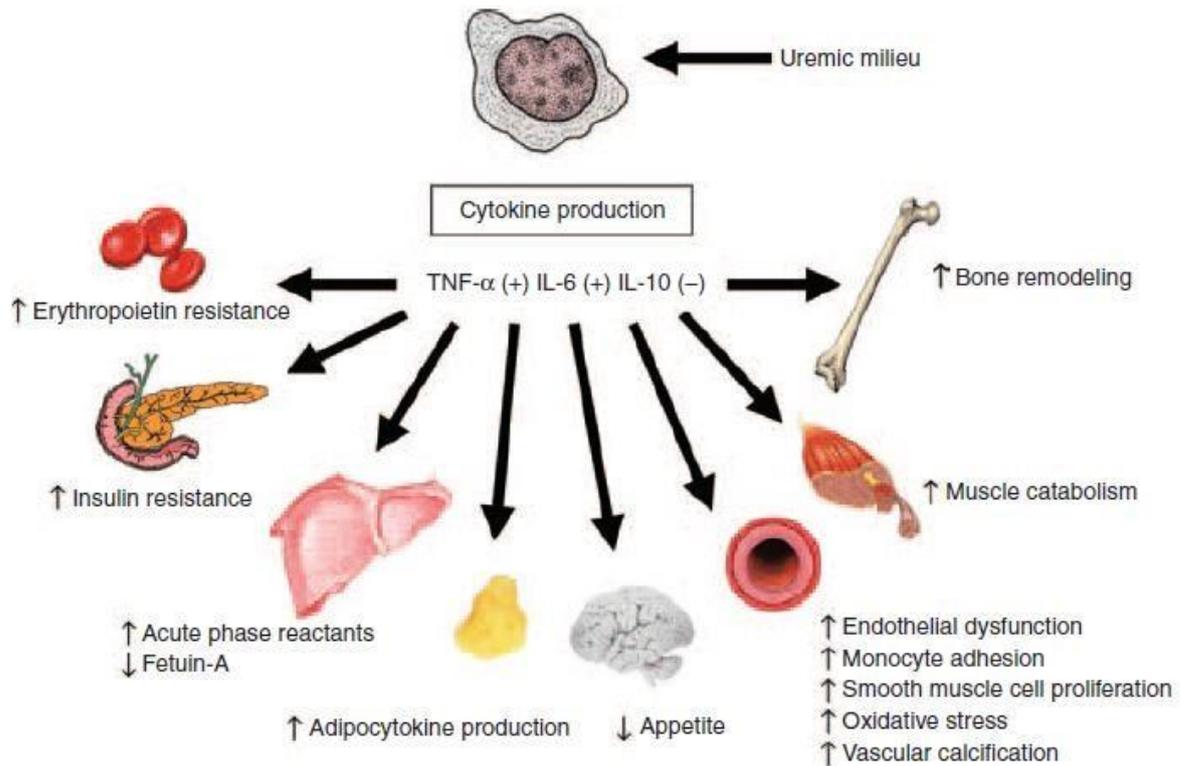
Após o reconhecimento das PAMPs ou DAMPs pelos TLRs, ocorre a ativação de uma cascata de sinalização, envolvendo ativação de proteínas adaptadoras (p ex: MyD88), proteínas quinases e fatores de transcrição (p ex: NFκB), que finalmente se translocam para o núcleo e modulam a síntese de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-8, IFNγ e TNF)^{19,20} (Figura 3).



Fonte: Adaptado de Booth et al., 2011 ²¹

Figura 3 – Resposta inflamatória ativada por TLRs

Na DRC, já está descrito que as toxinas urêmicas (ambiente urêmico) têm papel importante em ativar células da imunidade inata e humoral com geração de citocinas e radicais de oxigênio.²² A sinalização da resposta inflamatória frente ao ambiente urêmico apresenta efeitos deletérios em vários órgãos e tecidos de pacientes com DRC²³ (Figura 4).



Fonte: STENVINKEL et al., 2005.²³

Figura 4 – Efeitos das toxinas urêmicas na produção de citocinas pró e antiinflamatórias e suas respectivas associações com comorbidades da DRC.

Além do efeito das citocinas nas células da imunidade inata, sabe-se que pacientes com DRC apresentam disfunções endoteliais importantes, principalmente pela presença de espécies reativas de oxigênio (ERO). O aumento do estresse oxidativo resulta em dano tecidual causado pelo desequilíbrio entre os fatores pró e antioxidantes.²²

Recentemente Watanabe et al. (2015) relatou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) e *human aortic smooth muscle cells* (HASMC), induzida pela toxina urêmica *p-cresilsulfato* (PCS), com consequente aumento também da secreção de MCP-1, um importante mediador do processo inflamatório vascular.²⁴

A quimiocina MCP-1 é considerada a molécula mais potente no recrutamento de leucócitos para a camada subendotelial, determinante na iniciação e no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas²⁵ (Figura 5).

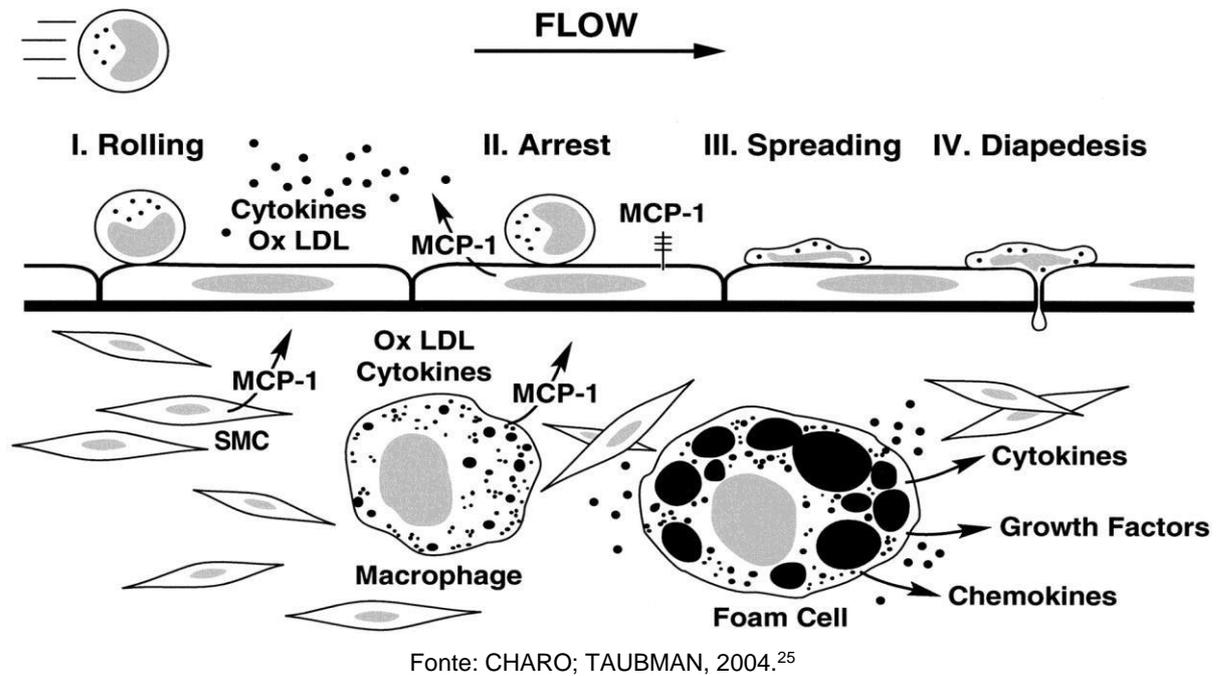
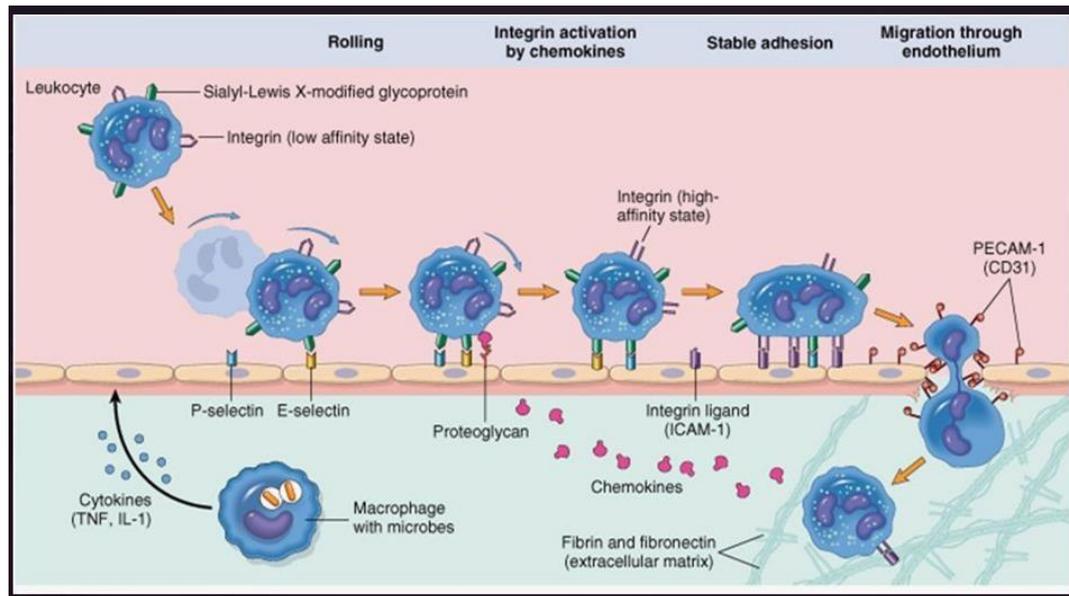


Figura 5 – Interações de células monócito-endotelial no processo de desenvolvimento das lesões ateroscleróticas

Outro mecanismo importante que participa da ativação das células endoteliais são o aumento da expressão de ligantes para integrinas, as moléculas de adesão, como por exemplo, ICAM-1 (CD54).¹⁵ (Figura 6)

De fato, Zohra Tumor et al.²⁶ demonstrou que o sulfato de indoxil (toxina urêmica ligada a proteína) regula positivamente a expressão de ICAM-1 e MCP-1 por ativação de NFκ-B induzida por EROS em Células HUVEC.²⁶



Fonte: Robbins and Cotran, pathologic Basics of Diseases, 2005, 7ªed.¹⁵

Figura 6 - Expressão de selectinas e integrinas nas células endoteliais

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos principais reguladores do crescimento dos vasos sanguíneos e desempenha um papel importante na promoção da sobrevivência e manutenção endotelial.²⁷ Em condições patológicas, como por exemplo na aterosclerose, ele tem sido relacionado com o desenvolvimento e progressão da doença pela sua capacidade de aumentar a infiltração inflamatória na placa e também pela neovascularização.²⁸ Por conta disso o VEGF pode ser um importante marcador de lesão endotelial na doença renal crônica.²⁸

1.3 VITAMINA D (1,25-diidroxivitamina D)

A forma ativa da vitamina D, a 1,25-diidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}^3$), tem como principal função fisiológica a manutenção das concentrações intra e extracelulares de cálcio em níveis fisiologicamente aceitáveis.²⁹ Esse efeito é exercido por meio de sua ação na regulação do metabolismo do cálcio e fósforo no intestino e ossos.³⁰ No intestino age promovendo aumento na absorção ativa de cálcio (via formação de proteína ligadora de vitamina D – VDBP) e de fósforo.³¹ No osso, sua ação é importante para o remanejamento ósseo normal, por meio de ação indireta sobre os osteoclastos e do aumento do número de osteoblastos.³²

Entretanto, o “status” da vitamina D de forma ativa é avaliado pela concentração sérica de 25(OH)D que é um precursor da forma ativa. A concentração de referência para a 25(OH)D é geralmente descrita como variando de 30 a 60 ng/mL. Valores séricos entre 20 ng/mL a 30 ng/ml e abaixo de 20 ng/mL são considerados indicativos de insuficiência e deficiência de vitamina D, respectivamente.³³

Além da 1,25-diidroxivitamina D estar associada com o metabolismo do cálcio e fósforo, tem sido descrito o seu papel na modulação sobre as células da imunidade inata³⁴ (Figura 7). O mesmo têm sido investigado para a 25(OH)D, assim, o interesse para o papel de ambas as formas de vitamina D extraesqueleto têm aumentado consideravelmente durante as três últimas décadas.

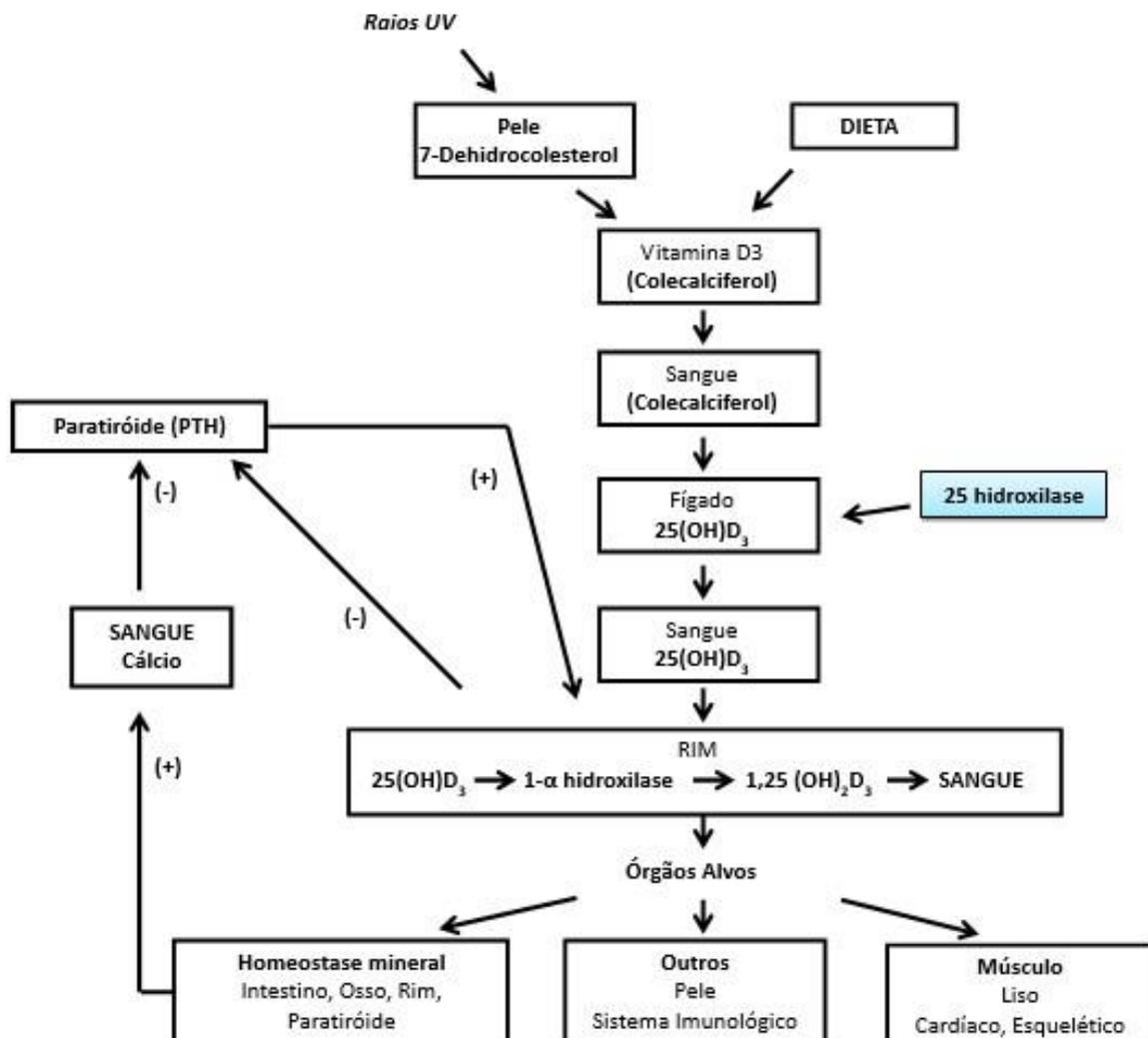


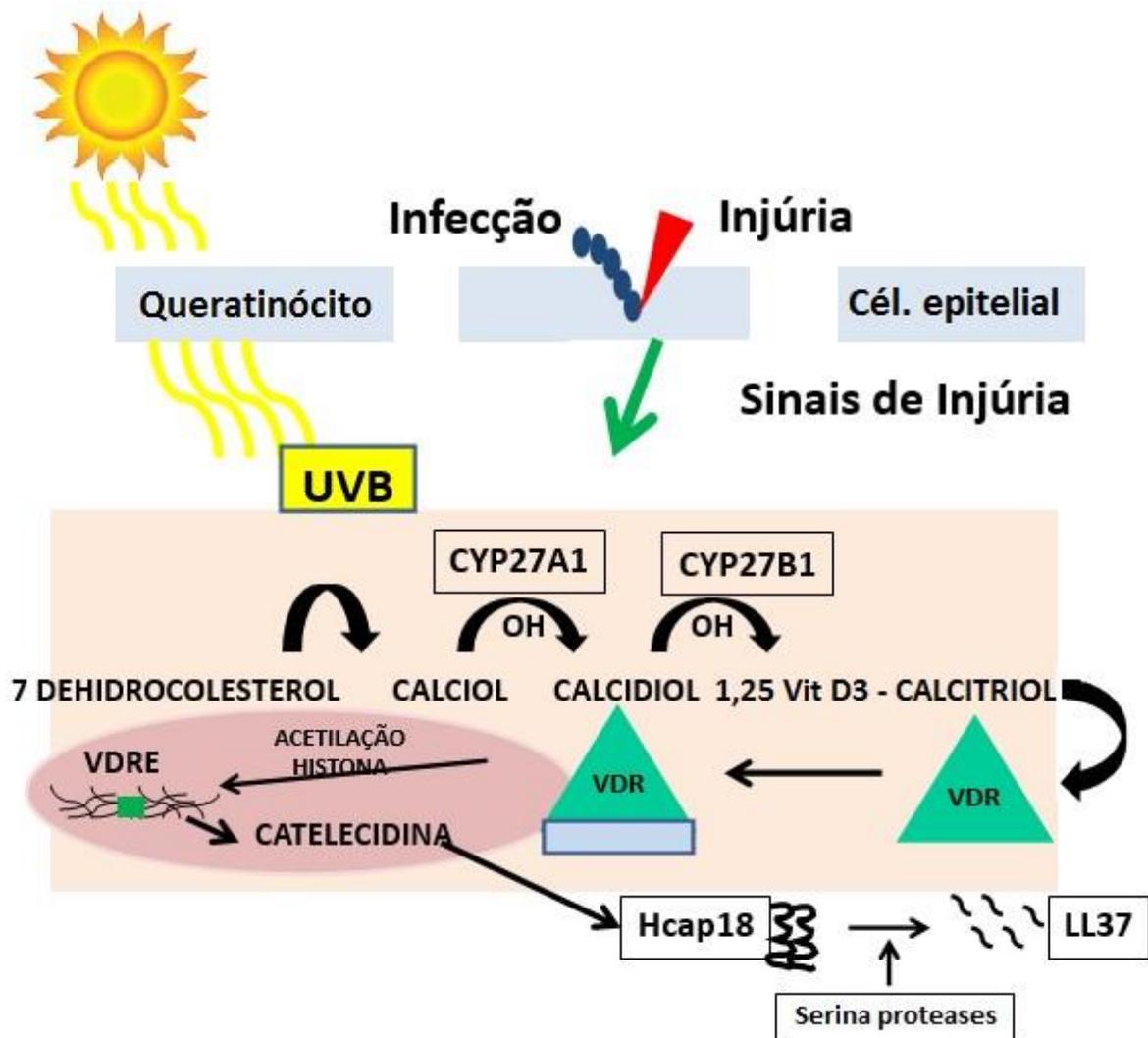
Figura 7 – Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese de 1,25(OH)₂D₃ e respectivas ações em órgãos-alvos

O interesse de se estudar ambas vitaminas D sobre a imunidade inata originou-se através da descoberta da presença do receptor da vitamina D (VDR) e a enzima 1 α -hidroxilase (CYP27b1) dentro das células do sistema imune, incluindo as mononucleares circulantes e neutrófilos.^{35,36,37,38} Isso tem revolucionado o campo da imunologia relacionado a vitamina D. Além disso, estes conhecimentos tem aumentado o interesse na vitamina D como potencial modulador de várias doenças.^{39,40}

Um estudo recente demonstrou que a vitamina D regula a expressão de peptídeos antimicrobianos endógenos específicos⁴¹, sendo que este mecanismo associa a vitamina D como potencial modulador da resposta imune a várias doenças infecciosas.

Este mesmo estudo demonstrou que a estimulação do receptor *Toll-like 2* por *M. tuberculosis* em macrófagos aumenta intracelularmente a expressão de VDR e 1 α -hidroxilase (CYP27b1) que converte a 25 (OH) D₃ para a forma ativa da vitamina D, a 1,25 (OH)₂ D₃.⁴¹ Esta última aumenta a expressão de VDR, ativa o gene hCAP18 resultando na transcrição do peptídeo antimicrobiano, catelicidina⁴² (Figura 8), o qual está envolvido na morte intracelular da *M. tuberculosis*.

Estes mecanismos também são conhecidos contra outros patógenos como bactérias gram-negativa e positiva, vírus e fungos.^{43,44} Entretanto, é desconhecido se outros tipos celulares como células endoteliais apresentam estes mecanismos intracelulares da vitamina D e síntese de catelicidina.



Fonte: ROODMAN, et al., 1985³²

Figura 8 – Esquematisação da ação da vitamina D na síntese de peptídeo antimicrobiano

Vale ressaltar que pacientes com DRC principalmente aqueles em estágios mais avançados da DRC são imunodeprimidos e apresentam hipovitaminose D^{45,46,47}, o que poderia contribuir para uma desregulação da expressão de VDR, CYP27, CYP24 e catelicidina dentro das células da imunidade inata. Por outro lado, a imunodepressão destes pacientes também é consequência de maior estado inflamatório e estresse oxidativo detectado pela produção de vários biomarcadores inflamatórios como TNF- α , IL-6, Proteína C-reativa, LDL oxidado .

Em resumo, o ambiente urêmico *per se* é extremamente pró-inflamatório. As toxinas urêmicas circulantes, citocinas pró-inflamatórias e radicais de oxigênio; além de terem efeito sobre as células da imunidade inata, também resultam na ativação das células endoteliais; que por sua vez participam da fisiopatologia de várias comorbidades nos pacientes com DRC, como por exemplo, a doença cardiovascular. O conjunto destes fatores junto à hipovitaminose D, sugere que estes sejam importantes para maior prevalência de inflamação e conseqüentemente piores desfechos nesta população.

Entretanto, na literatura são poucos os estudos que avaliam o efeito desta suplementação sobre mecanismos da resposta inflamatória em células endoteliais, principalmente frente ao ambiente urêmico.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito da 25(OH)D₃ sobre as expressões de receptor TLR-4, IL-6, IL-10, TNF α , MCP-1, ICAM-1, HLADR, VEGF, ERO, Catelicidina, VDR, CYP27, CYP24 e NFK-B em células endoteliais frente ao ambiente urêmico.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da vitamina 25(OH)D₃ na modulação de biomarcadores inflamatórios e mecanismos intracelulares em células endoteliais frente ao ambiente urêmico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da 25(OH)D₃ sobre a expressão de TLR-4, ICAM-1, HLA-DR do receptor de vitamina D (VDR), da CYP27 hidroxilase e CYP24 hidroxilase, expressão de IL-6, IL-10, TNF- α , VEGF, MCP-1, ERO, Catelicidina e NFK-B em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) incubados com e sem soro urêmico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas células imortalizadas da linhagem endotelial *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVEC) adquirida comercialmente. Foi efetuada a caracterização dessas células pela expressão de CD 31 APC e CD 146 APC pelo método de citometria de fluxo.

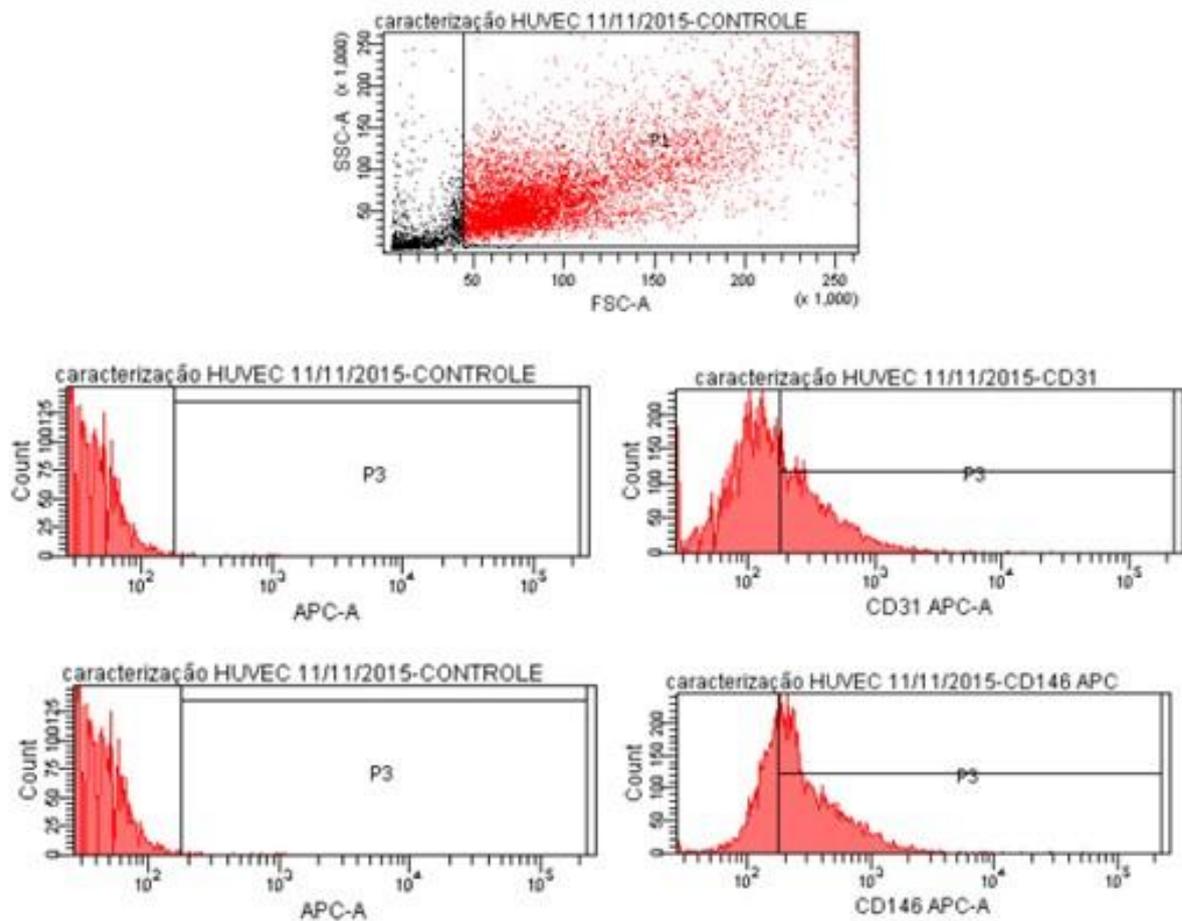


Figura 9 – Demonstração da caracterização de células HUVEC

As células foram descongeladas em banho maria a 37°C sob agitação por 2 minutos, o conteúdo celular foi transferido para um tubo cônico contendo 9 mL de meio de cultura (RPMI Medium 1640, Vitrocell pH 7.4) 10 mMol/L de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, NY, USA), 2 mMol/L de L-Glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco, BRL, Life Technologies, USA), 10% de soro fetal bovino (Vitrocell) e centrifugadas a 125 G por 5 minutos. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e o pellet ressuspensão em 12 mL de meio de cultura, e mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até que a concentração de células atingisse confluência. Após proliferação as células foram tratadas com 5 mL de tripsina por 5 minutos e após o desprendimento celular foi acrescentado 5 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. O conteúdo celular foi transferido para um tubo graduado para 50 mL e centrifugado a 125 G por 5 minutos, em seguida foi realizado teste de viabilidade celular utilizando Azul de Tripán e pelo método de citometria de fluxo, utilizando kit Anexina/PI (BD Pharmingen Cat: 556547).

Foram transferidas 5×10^5 células para garrafas de cultura de 25 cm³ e incubadas por 24 horas. Após 24 horas, duas garrafas foram pré-tratadas com vitamina 25(OH)D₃ (Sigma-Aldrich CAT: 101443236), na concentração de 30 ng/mL (75nM) por mais 24 horas. Após o pré-tratamento com vitamina 25(OH)D₃ as células foram insultadas com soro de pacientes urêmicos e soro de indivíduos saudáveis (obtidos de acordo com a descrição abaixo, Figura 7) v/v (soro urêmico ou saudável/RPMI), com ou sem pré-tratamento de vitamina 25(OH)D₃ (Figura 8). Após incubação, as células nas suas respectivas condições foram avaliadas para: TLR-4, VDR, CYP27, CYP24, catelicidina, IL-6, IL-10, TNF α , HLA-DR, ICAM-1, MCP-1, VEGF, NF-kB e ERO (Quadro 1).

3.1 Obtenção dos Pools de soro normal e soro urêmico:

Pool de Soro Normal: foram coletadas amostras de sangue (20 mL) de 20 voluntários sadios em tubos sem anticoagulantes e centrifugadas a 150 G por 10 minutos. A seguir o sobrenadante foi transferido para um recipiente estéril, e armazenado em alíquotas em freezer -80°.

Pool de Soro Urêmico: foram coletadas amostras de sangue em tubos sem anticoagulantes de 30 pacientes com DRC em hemodiálise (HD) antes do início da segunda sessão de HD da semana. Os tubos foram centrifugados a 150 G por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um recipiente estéril e imediatamente armazenado em freezer -80°. Foram admitidos pacientes que não apresentavam qualquer tipo de doença infecciosa, inflamatória, em uso de imunossuppressores, portador de Diabetes mellitus ou neoplasias e que não faziam uso de suplementação com vitamina D.

Ambos os *pools* foram enviados ao laboratório de análises clínicas do Hospital do Rim para análise de creatinina, ureia, PTH, cálcio, fósforo e 25 (OH)D₃.

	<i>Pool normal</i>	<i>Pool urêmico</i>
Creatinina (mg/dL)	0,82	8,92
Uréia (mg/dL)	33	135
PTH (pg/mL)	23	392
Cálcio (mg/dL)	9,7	7,4
Fósforo (mg/dL)	3,4	4,3
25 (OH)D₃ (ng/mL)	29,2	10,5

Figura 10 – Parâmetros Bioquímicos no *Pool* de soro normal e soro urêmico



Legenda:

SN = Soro de indivíduo saudável

SU = Soro paciente urêmico

Figura 11 – Desenho do Estudo

Quadro 1 – Incubação de 5×10^5 de células na ausência e presença de prétratamento com vitamina D, insultado com soro de indivíduos saudáveis e soro de indivíduos urêmicos

TUBO	QTD Cél	RPMI	SORO NORMAL	SORO URÊMICO	25 (OH)D ₃ 30 ng/mL
Soro normal (SN)	5×10^5	2000 µL	2000 µL	---	---
SN+25 (OH)D ₃	5×10^5	1760 µL	2000 µL	---	240 µL
Soro urêmico (SU)	5×10^5	2000 µL	---	2000 µL	---
SU+25 (OH)D ₃	5×10^5	1760 µL	---	2000 µL	240 µL

3.2 Citometria de fluxo para detecção de TLR-4, CD54 e HLA-DR

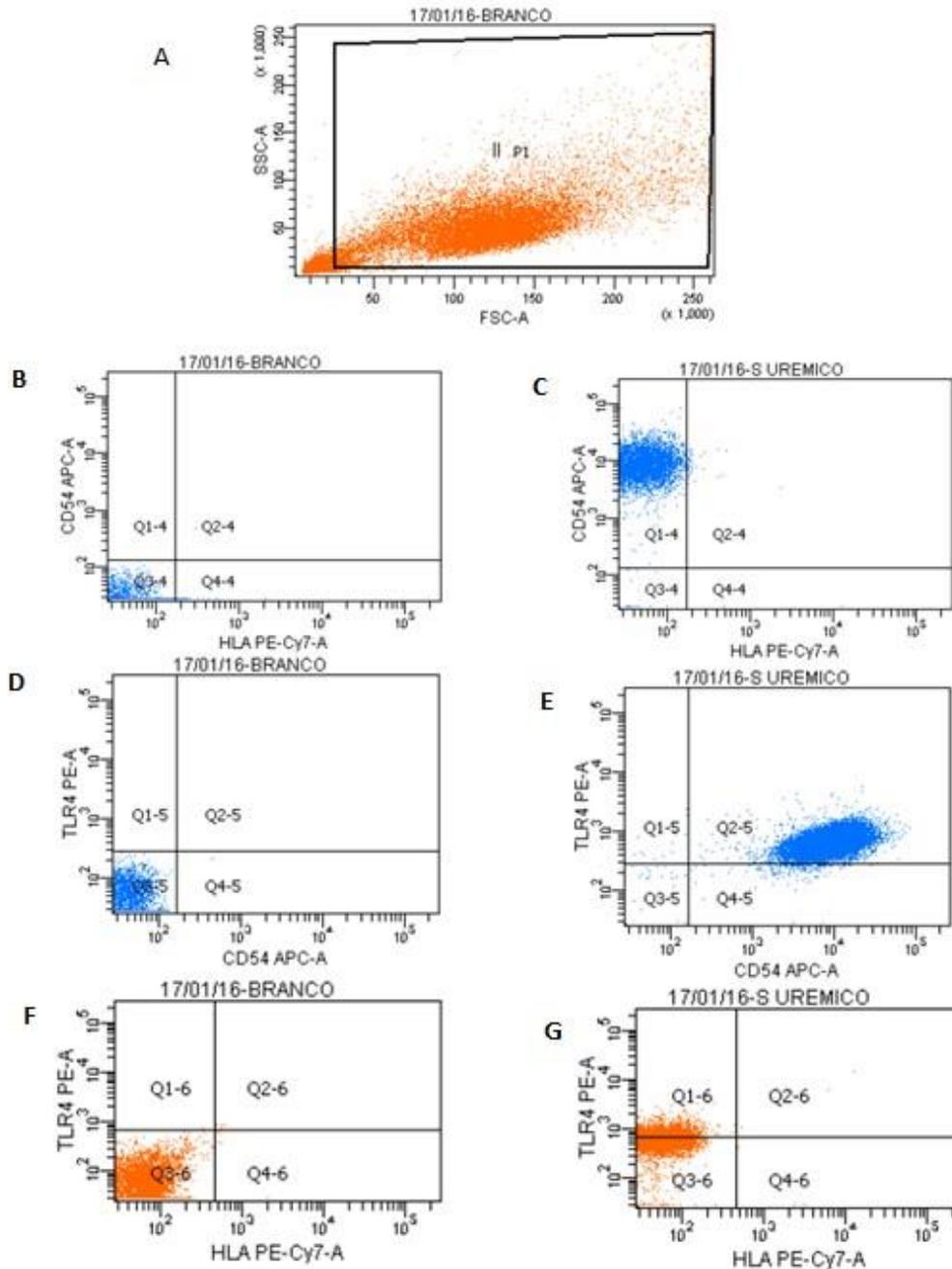
Após o término do protocolo experimental descrito no (Quadro 1) foram transferidas 3×10^5 células para os tubos de polipropileno medindo 12x75 mm (específico para citometria). Estes foram centrifugados a 150 G por 10 min a 4°C e descartado o sobrenadante. Acrescentou-se 100 µL de BSA (BD Pharmingen, Cat 349202). A seguir, foi adicionado monoclonal para marcação de receptores de superfície: TLR-4, CD54 e HLA-DR (Quadro 2). As amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação estes foram centrifugados e o sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” foi ressuspensão em 500 µL de tampão PBS + azida. A detecção da expressão destes receptores foram realizadas no citômetro de fluxo (FacsCanto I, BD) imediatamente ou em até 2 horas após as marcações, onde nesta condição as amostras permaneceram refrigeradas e no escuro.

Quadro 2 – Descrição dos monoclonais utilizados para detecção de TLR-4, CD54 e HLA-DR

Painel	Marcador	Quantidade	clone	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo
Controle	----	---	---	---	---	---
Tubo 1	CD54	5 µL	HAB8 ANTI-HUMAN	APC	eBioscience	17-0549-42
	TRL-4	5 µL	HTA125 ANTI-HUMAN	PE	eBioscience	12-9917-42
	HLA-DR	20 µL	MOUSE ANTI-HUMAN	PECY5	BD-Pharmingen	555813

3.3 Análise da citometria de fluxo

Utilizou-se um gráfico *dot plot* de dispersão frontal (FSC) versus dispersão lateral (SSC) após a caracterização das células HUVEC, onde foi definido a região de autofluorescência para serem eliminadas das análises. A seguir foi utilizada a técnica de *Fluorescência Minus One* (FMO), para excluir possíveis sobreposições de fluorocromos detectados pelos canais de detecção de fluorescência; permitindo mais precisão na análise. Para análise dos marcadores CD54, TLR-4 e HLA-DR foram utilizados gráficos do tipo *dot plot*, e para VDR, CYP24, CYP27 e EROS foram utilizados gráficos do tipo histograma. Os resultados foram descritos em porcentagem de expressão (%) ou em *mean fluorescence intensity* (MFI) (média de intensidade de fluorescência); desta forma, quanto maior for a MFI, maior é a expressão destes receptores. A partir da MFI foram realizadas as análises estatísticas.



Legenda: A - Gate II P1 – Células HUVEC previamente caracterizadas por marcação de **CD31 e CD133** e selecionadas em *gate* através das suas características de tamanho (*Foward Scatter* – FSC) e complexidade interna (*Side Scatter* – SSC). Figuras B, D e F: ajuste de auto fluorescência das células HUVEC nos canais de detecção para os respectivos anticorpos marcados com os respectivos fluorocromos PE-Cy5, APC e PE. Figura C – Q1-4 = Expressão de CD54 APC+ em HUVEC; Figura E – Q2-5 = Expressão de TLR-4 PE e +CD54 APC+ em HUVEC. Figura G – Q1-6 = Expressão de TLR-4 PE em HUVEC.

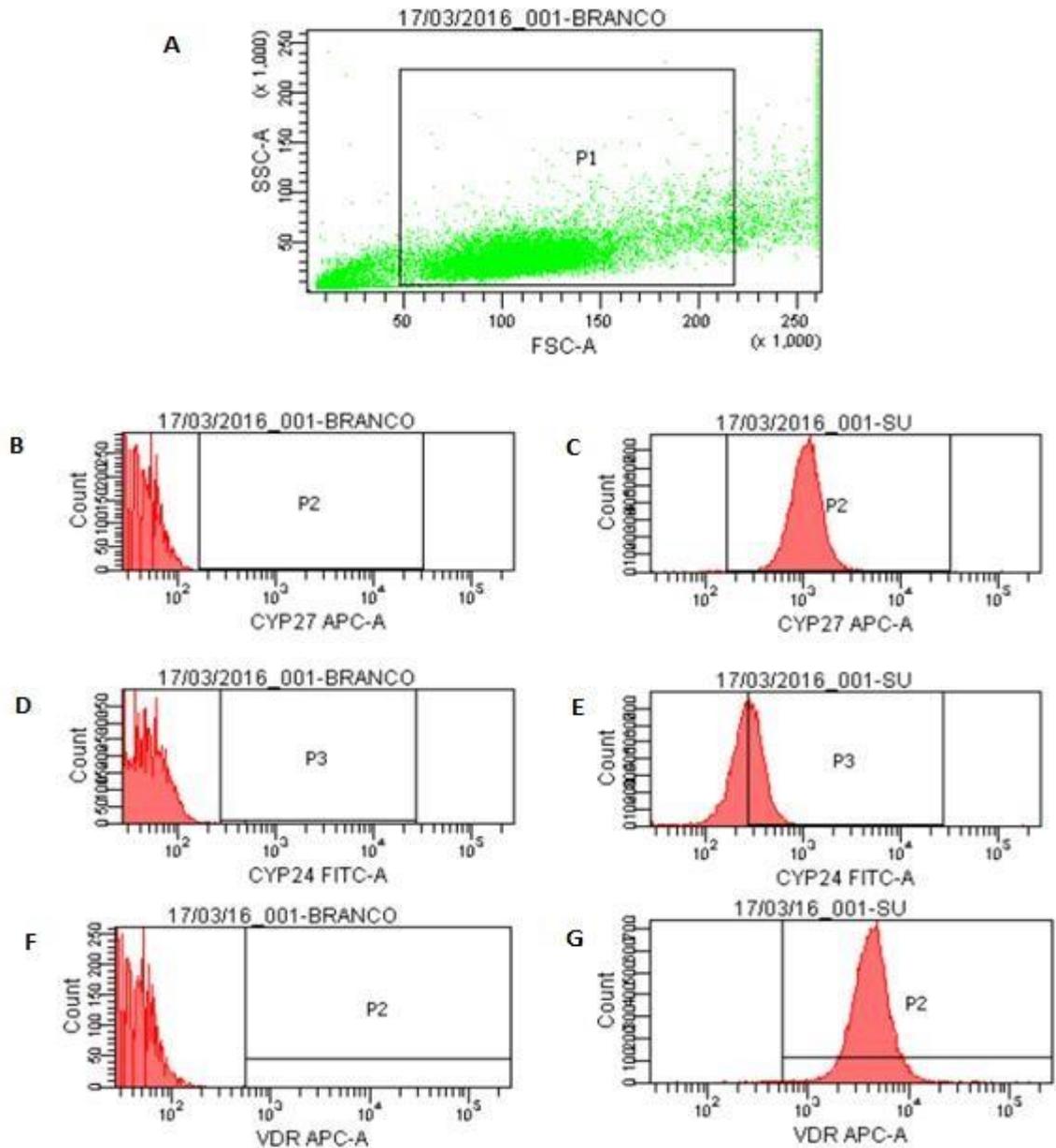
Figura 12 – Exemplo de expressão de CD54+, TRL-4 e HLA-DR em células HUVEC por citometria de fluxo

3.4 Citometria de Fluxo para detecção de VDR, CYP27 e CYP24

Foram transferidas 3×10^5 células para os tubos de citometria. Estes foram centrifugados a 150 G por 10 min a 4°C, e descartado o sobrenadante. Foi adicionado 1 mL de tampão de fixação/ permeabilização contendo Paraformaldeído (BD Pharmingen, Cytotfix/Cytoperm cat: 554722- 1x) para cada tubo de amostra. Incubado por 20 minutos a 4-8°C ao abrigo da luz. Centrifugado e desprezado o sobrenadante. A seguir, foi adicionado anticorpo monoclonal para marcação de VDR, CYP27 e CYP24 e secundário de acordo com o Quadro 3. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 4-8°C ao abrigo da luz. Foi adicionado 2 mL de tampão de lavagem contendo saponina (BD Perm/Wash buffer, cat: 554723) em todos os tubos. Centrifugados e desprezado o sobrenadante. Adicionou-se 500 µL de solução de PBS+ 1% de azida. As detecções da expressão destes receptores foram realizadas no citômetro de fluxo (FacsCanto I, BD) imediatamente ou em até 2 horas após as marcações, onde nesta condição as amostras permaneceram refrigeradas e no escuro.

Quadro 3 – Descrição dos anticorpos conjugados utilizados

Painel	Marcador	Quantidade	clone	Fluorocromo	Fabricante	Catálogo
Controle 2	---	---	---	---	---	---
Tubo 2	VDR	1 µL (primário) 3 µL (secundário)	H1512 MOUSE	APC	Santa Cruz/ Invitrogen	SC13133 Z25151
Controle 3	---	---	---	---	---	---
Tubo 3	CYP24	1 µL (primário) 3 µL (secundário)	D0811 RABBIT	A.F 488	Santa Cruz/ Invitrogen	SC66851 Z5302
	CYP27	1 µL (primário) 3 µL (secundário)	K2911 GOAT	A.F 647	Santa Cruz/ Invitrogen	SC49642 Z25608



CYP27 Enzima responsável pela hidroxilação da 25 (OH) D₃ em 1,25 (OH)₂ D₃
CYP24 Enzima responsável pela inativação do excesso de 25 (OH) D₃ e 1,25 (OH)₂ D₃
VDR Receptor da Vitamina D

Legenda: A: Gate P1 = HUVEC foram selecionadas a partir de suas características de tamanho (Foward Scatter – FSC) e complexidade interna (Side Scatter – SSC). A partir do *gate* foram criados gráficos do tipo histograma (quantidade de células em relação à intensidade de fluorescência detectada). Figuras B, D e F: Ajuste de auto fluorescência das células para os canais de detecção de anticorpos monoclonais conjugados aos respectivos fluorocromos: Alexa fluor (AF) 647, AF 488 e APC. C, E e G: HUVEC positivas para anticorpos monoclonais: CYP27, CYP24 e VDR como demonstrado nos quadrantes P2, P3 e P2 para VDR.

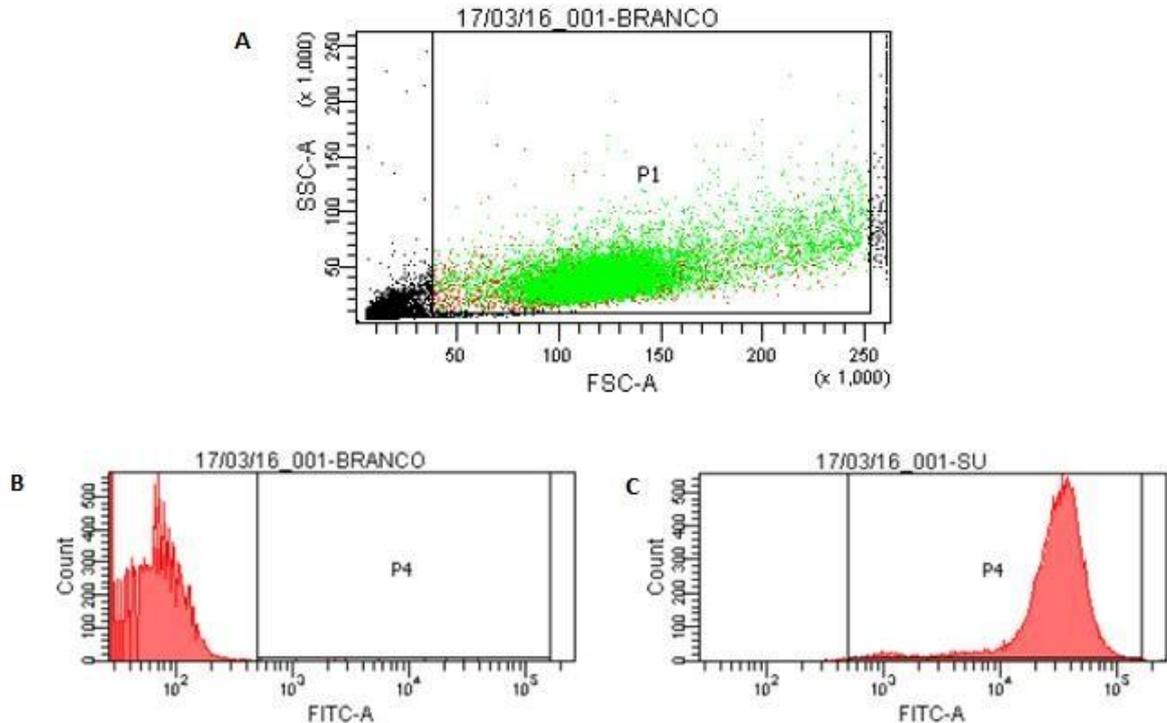
Figura 13 – Demonstração do ajuste da auto fluorescência das células HUVEC e expressão intracelular de CYP27, CY24 e VDR

3.5 Citometria de Fluxo para detecção de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Foram transferidas 3×10^5 células no tubo de citometria. Estes foram centrifugados a 150 G por 10 min a 4°C e descartado o sobrenadante. Acrescentouse 900 μ L de PBS (BD Pharmingen, Cat 349202). A seguir, foram adicionados 100 μ L de solução contendo reagente 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) na concentração de 0,3 mM (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida os tubos foram centrifugados e desprezados o sobrenadante. Adicionou-se 500 μ L de PBS (Sigma, Cat P3744-1PAK). A detecção da produção de ERO foram realizadas no citômetro de fluxo (FacsCanto I, BD) imediatamente ou em até 2 horas após as marcações, onde nesta condição as amostras permaneceram refrigeradas e no escuro.

Quadro 4 – Descrição do ensaio para avaliação de ERO

Painel	HUVEC	PBS	DCFH-DA (0,3 mM)	Fabricante	Catálogo
Controle	3×10^5	1000 μ L	---	---	---
Tubo 4	3×10^5	900 μ L	100 μ L	Sigma, St. Louis, MO, USA	D6883



Legenda: A: Gate P1 = HUVEC foram selecionadas a partir de suas características de tamanho (*Foward Scatter* – FSC) e complexidade interna (*Side Scatter* – SSC). A partir do *gate* foram criados gráficos do tipo histograma (quantidade de células em relação a intensidade de fluorescência detectada). B: Ajuste de auto fluorescência das células que foi detectada no canal de leitura do fluorocromo FITC, onde ocorre a detecção do reagente DCFH-DA. C: P-4 = HUVEC positiva para detecção de ERO por meio de detecção da fluorescência do reagente DCFH-DA.

Figura 14 – Demonstração do ajuste da auto fluorescência das células HUVEC e análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)-FITC

3.6 Ensaio Imuno Enzimático (ELISA) para Detecção de IL-6, IL-10, TNF- α , Catelicidina, VEGF, MCP-1 e NFkB

Após o término de cada experimento, foram armazenadas células HUVEC e sobrenadantes de cultura no freezer -80°C, para a realização de ensaios de *enzymelinked immunosorbent assay (ELISA)*. Utilizando o sobrenadante de cultura foi analisado IL-6, IL-10, TNF- α , Catelicidina, VEGF e MCP-1. A células foram utilizadas para análise da proteína Nuclear NF-kB.

Os testes de *ELISA* foram realizados utilizando Kits comerciais descritos a seguir, de acordo com os protocolos dos fabricantes, conforme tabela a seguir:

Tabela 3 – Descrição dos kits de *ELISA* utilizados

PROTEÍNA	KIT COMERCIAL
CCL2 (MCP-1)	KIT human CCL2 (MCP-1) cat: DCP00 R&D SYSTEMS
IL-6	KIT human IL-6 High Sensitivity cat: HS600B R&D SYSTEMS
TNF- α	KIT human TNF- α affymetrix eBioscience ref:88-7346-22
LL37 (CATELICIDINA)	KIT human LL37(CATELICIDINA) cat: HK321-02 Hycult biotech
IL-10	KIT human IL-10 cat: 550613 BD
NFkB p65 VEGF	KIT human NFkB p65 cat: 85-86083-11 eBioscience KIT human sVEGF-R1 Platinum cat: BMS268/3 eBioscience

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo *software* SPSS for Windows, versão 20. Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis, com resultado paramétrico para todos os grupos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para testar as diferenças entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste ANOVA *one-way* com Pós-Hoc de Bonferroni. O teste de Pearson foi utilizado para analisar as correlações entre os parâmetros do estudo. Foram consideradas estatisticamente significantes diferenças com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Observamos que o insulto com soro urêmico induziu menor expressão de TLR-4 comparado com o soro sadio em HUVEC. O tratamento com 25(OH)D₃ não teve efeito na modulação do TLR-4 nestas células. (Tabela 4, Figura 15)

Quanto à produção de ERO, assim como esperado, houve um aumento significativo na sua produção no grupo de HUVEC insultadas com soro urêmico, Entretanto o tratamento com 25(OH)D₃ não diminuiu a produção de ERO nestas células. (Tabela 4, Figura 16)

Não observamos diferenças significativas na expressão de VDR, CYP24 e CYP27 entre os grupos. (Tabela 4)

Observamos aumento de TNF- α , IL-10, MCP-1 e catelicidina no sobrenadante de cultura de HUVEC incubada com soro urêmico comparado ao soro de sadios. Entretanto o tratamento com 25(OH)D₃ não teve efeito. (Figuras 17,18,19,20)

Observamos correlação positiva entre IL-10, ERO e MCP-1 e entre catelicidina, IL-10, TNF- α e MCP-1. (Tabela 5, Figuras 21, 22, 23)

Observou-se uma correlação negativa entre TLR-4 e ERO. (Tabela 5)

Tabela 4 – Expressão/Produção de TLR-4, ERO, VDR, CYP27, CYP24, IL-10, MCP1, TNF α e Catelicidina em HUVEC na presença e ausência de 25(OH)D₃ frente ao insulto soro de indivíduos saudáveis e soro de indivíduos urêmicos. (n = 15)

	SORO NORMAL (SN)		SORO URÊMICO (SU)		p
	SN	SN+25(OH)D ₃	SU	SU+25(OH)D ₃	
TLR-4 (%)	76±11	59±10	55±13 #	68±11	0,002
ERO (MIF)	21±5	22±5	31±9 #	25±6	0,001
VDR (MIF)	4,50±1,11	4,87±0,86	4,21± 0,71	4,34± 0,72	0,35
CYP27 (MIF)	1,10±0,17	1,03±0,17	1,10±0,19	1,13±0,21	0,57
CYP24 (MIF)	0,39±0,03	0,40±0,04	0,40±0,04	0,42±0,05	0,57
IL-10 (Pg/mL)	59±9	53±7	87±9 #	84±13	< 0,001
MCP-1 (Pg/mL)	57±8	48±5	67± 9 #	67± 8	< 0,001
TNFα (Pg/mL)	79±19	75±18	145±33 #	131±20	< 0,001
Catelicidina (Pg/mL)	0,41±0,04	0,43±0,03	0,46±0,03 #	0,46±0,03	< 0,001

≠ SN

TLR-4	<i>Toll-Like Receptors 4</i> (do inglês)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
VDR	Receptor da vitamina D
CYP27	27-Hidroxilase ou 1 alfa hidroxilase
CYP24	24 - Hidroxilase
IL-10	Interleucina 10
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> (do inglês)
TNF α	Fator de Necrose Tumoral - α
CATELICIDINA	Peptídeo antimicrobiano

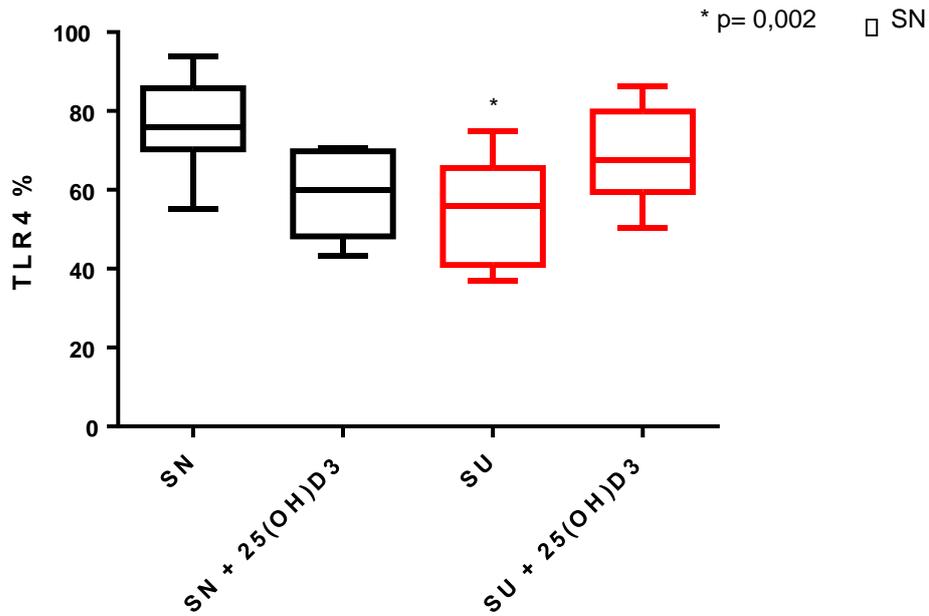


Figura 15 - Expressão de TLR-4 em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D₃ (n = 15)

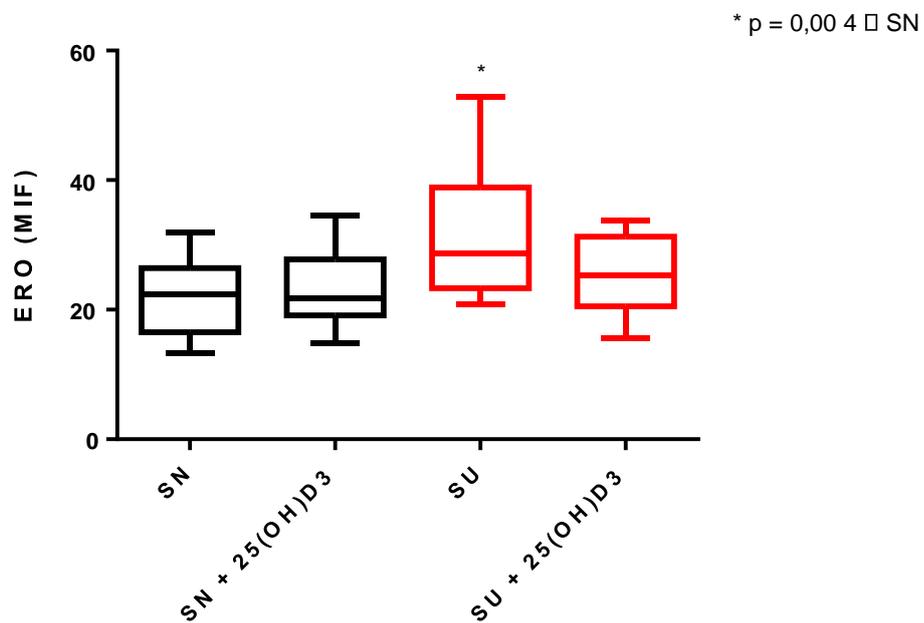


Figura 16 - Produção de ERO em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D₃ (n = 15)

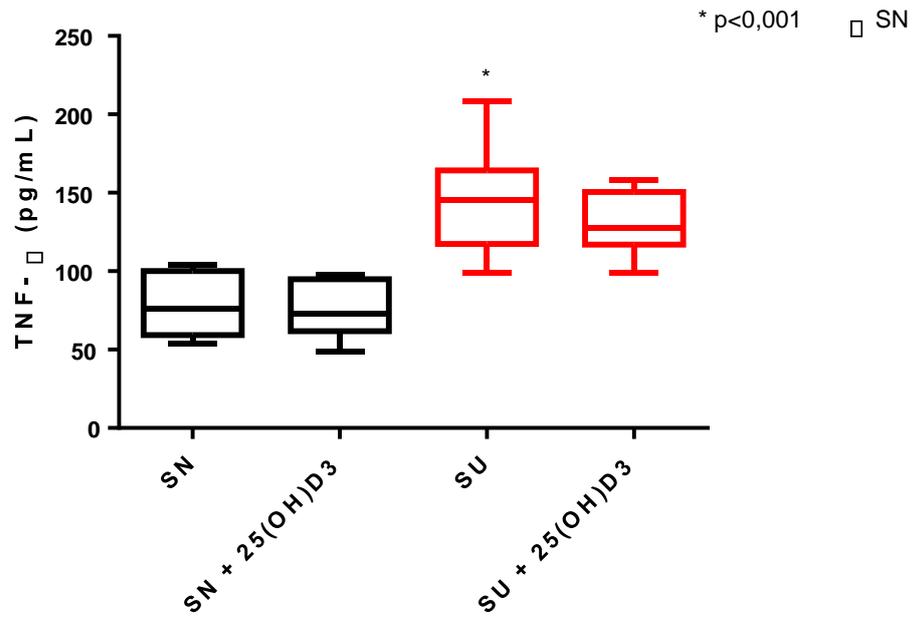


Figura 17 - Expressão de TNF- α em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D₃ (n = 15)

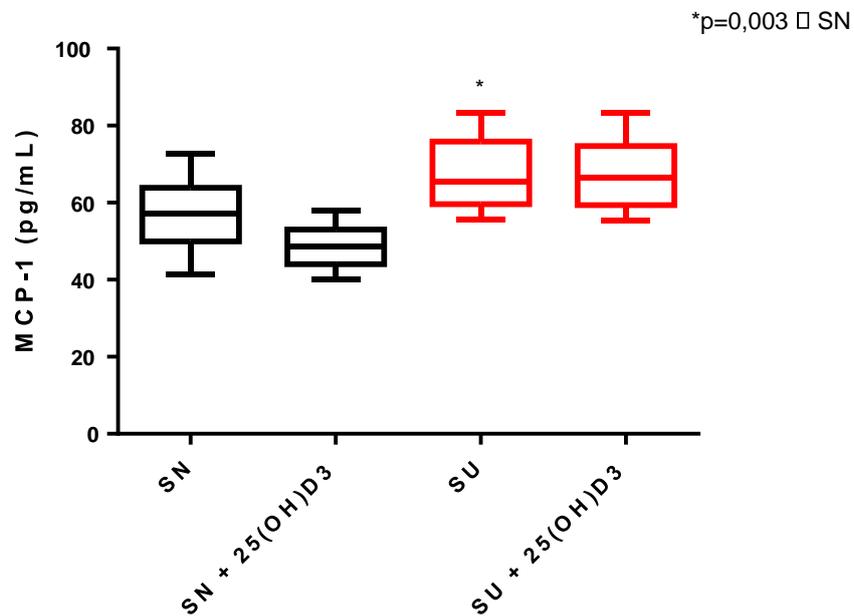


Figura 18 - Expressão de MCP-1 em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D₃ (n = 15)

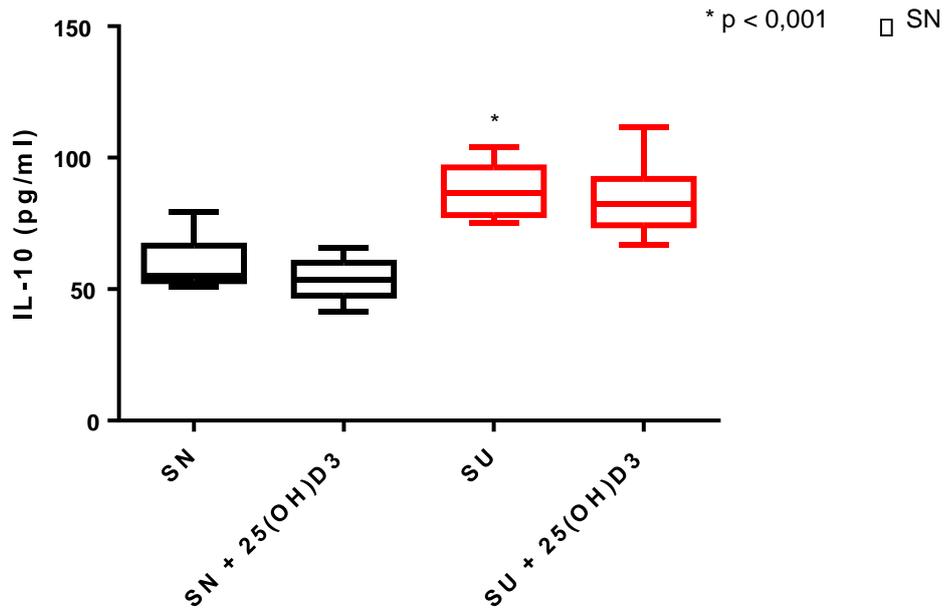


Figura 19 - Expressão de IL-10 em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D₃ (n = 15)

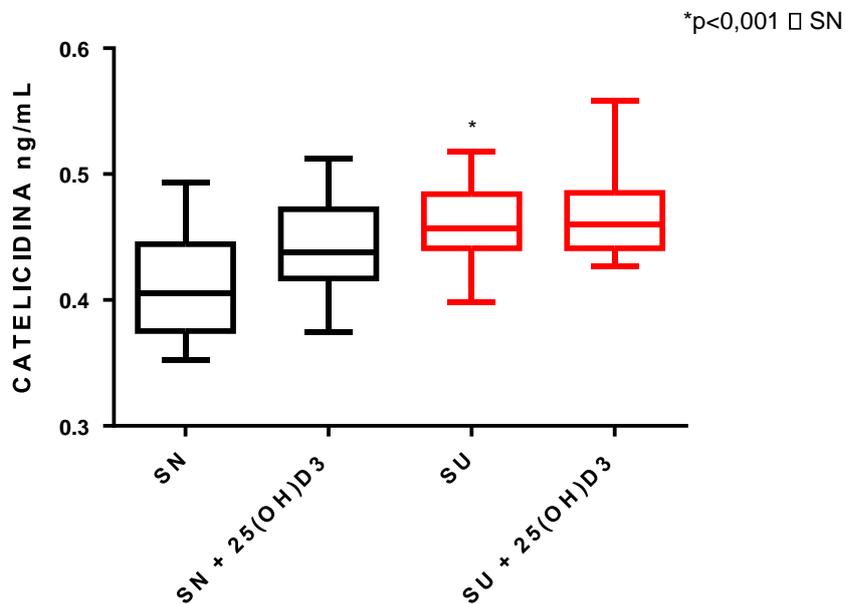


Figura 20 - Expressão de catelicidina em células HUVEC incubadas com e sem soro urêmico tratadas ou não com 25(OH)D₃ (n = 15)

Tabela 5 - Coeficiente de Correlação de Pearson (r) entre as variáveis analisadas:

	VDR	CYP27	CYP24	ERO	IL10	MCP1	Catelicidina	TNF α
TLR-4 (%)	r=0,07	r=0,13	r=-0,12	r=-0,35	r=-0,15	r=-0,07	r=-0,19	r=-0,31
	p=0,83	p=0,52	p=0,52	p=0,04	p=0,53	p=0,66	p=0,25	p=0,25
VDR (MIF)		r=0,26	r=0,42	r=0,24	r=-0,10	r=-0,14	r=-0,19	r=-0,20
		p=0,12	p<0,01	p=0,14	p=0,56	p=0,37	p=0,22	p=0,40
CYP27(MIF)			r=0,35*	r=0,40**	r=0,19	r=0,08	r=-0,238	r=0,19
			p=0,01	p<0,01	p=0,30	p=0,59	p=0,086	p=0,41
CYP24 (MIF)				r=0,32*	r=0,30*	r=-0,04	r=-0,138	r=-0,03
				p=0,01	p=0,04	p=0,75	p=0,258	p=0,89
ERO (MIF)					r=0,40*	r=0,13	r=0,109	r=0,25
					p=0,01	p=0,31	p=0,385	p=0,21
IL10 (Pg/mL)						r=0,68**	r=0,32*	r=0,87**
						p< 0,01	p=0,02	p < 0,01
MCP1 (Pg/mL)							r=0,40**	r=-0,71**
							p < 0,01	p < 0,01
Catelicidina (Pg/mL)								r=0,57** p<0,01

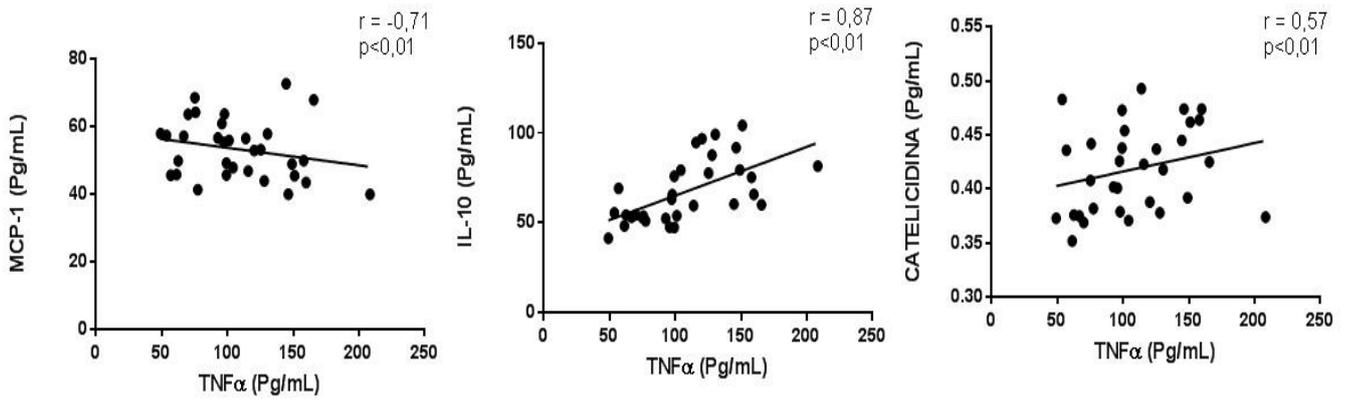
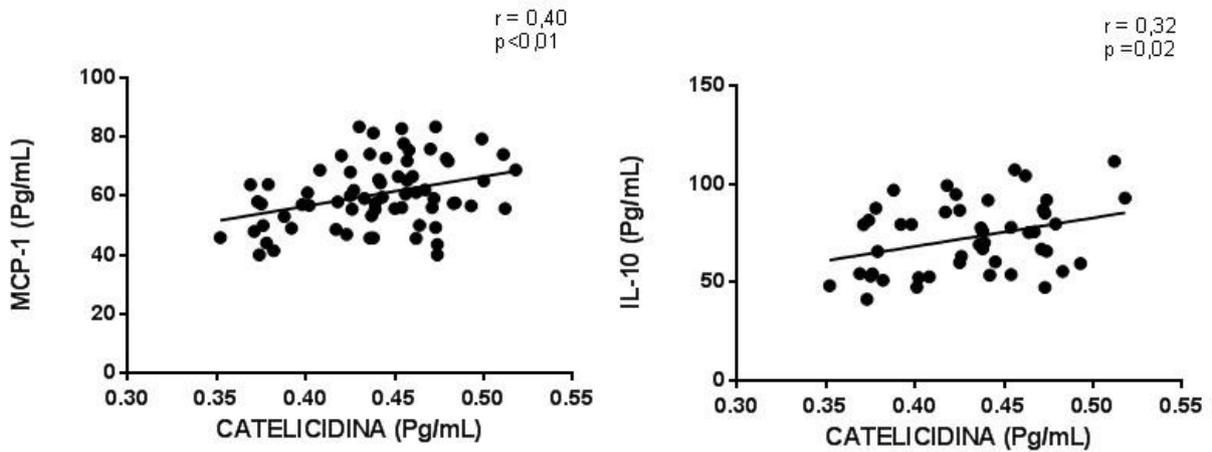


Figura 21 - Correlação entre a expressão de TNF- α e IL-10, M



CP-1 e Catelicidina em células HUVEC.

Figura 22 - Correlação entre a expressão de Catelicidina, IL-10 e MCP-1 em células HUVEC.

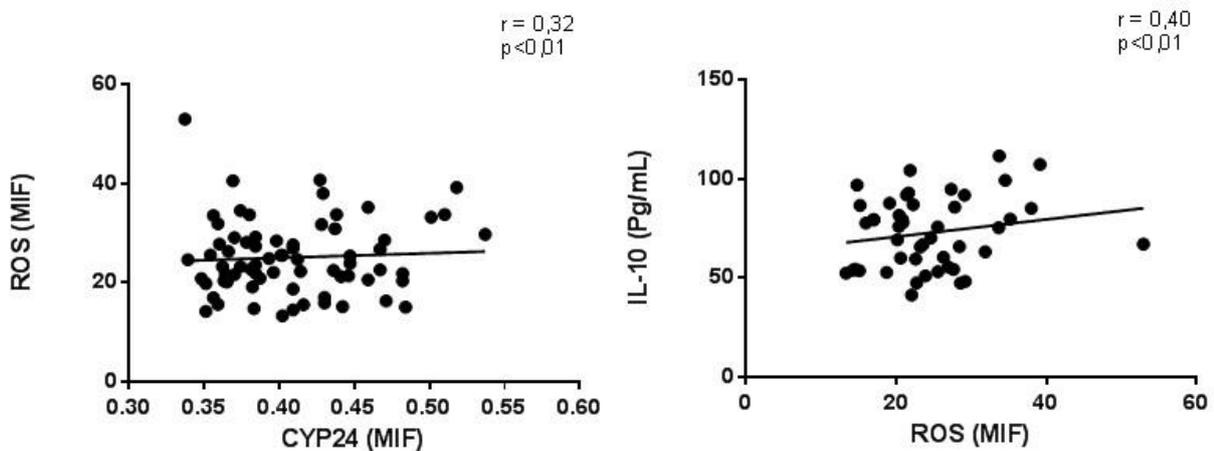


Figura 23 - Correlação entre a produção de ERO e a expressão de CY24 e IL-10 em células HUVEC.

5 - DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos o efeito do tratamento com 25(OH)D₃ (*in vitro*) sobre marcadores inflamatórios em células endoteliais (HUVEC) frente ao ambiente urêmico.

Observamos menor expressão do receptor TLR-4 frente ao insulto com soro urêmico comparado ao soro de indivíduos normais. Até o presente momento, não há na literatura nenhuma descrição avaliando a expressão deste receptor como via de inflamação em ambiente urêmico. Stinghen A et al.⁴⁸ descrevem que a uremia contribui para menor expressão de mecanismos inflamatórios como IL6 e SDF1 (quimiocina que mobiliza células endoteliais progenitora) em cultura de células HUVEC frente ao ambiente urêmico.⁴⁸ A diminuição destes mecanismos, assim como observado em nosso estudo, pode estar associada ao dano celular causado pela uremia “per se”.

Kacsó I et al.⁴⁹ também observaram menor expressão de TLR-4 em células do túbulo renal proximal de ratos wistar submetidos a nefrectomia parcial, demonstrando que o ambiente urêmico pode contribuir para um desarranjo estrutural de receptores de membrana acoplados as células endoteliais, ou ainda, o aumento do ERO pode levar a uma disfunção de expressão de TLR-4, já que observamos uma correlação negativa entre estes.⁴⁹

Ando et al.⁵⁰ também observaram uma diminuição na expressão de TLR-4 nos monócitos de pacientes com DRC e uma conseqüente diminuição de resposta imune frente a insultos infecciosos, sugerindo que essa menor expressão de TLR-4 em monócitos pode desempenhar um papel importante na susceptibilidade desses pacientes a infecções.⁵⁰ Levando-se em consideração que monócitos e células endoteliais desempenham funções diferentes, há que se considerar, que as diminuições de mecanismos envolvidos na resposta inflamatória também podem representar disfunção celular causado pelo ambiente urêmico nestas células.⁵⁰

De fato, observamos que o soro urêmico foi capaz de induzir maior expressão de IL-10, MCP-1, TNF- α e produção ERO em células HUVEC, como já descrito por

Meireles MS et al.⁵¹ em monócitos as quais os receptores do tipo Tolllike têm associação na sinalização destas citocinas e estresse oxidativo.⁵¹

Desta forma, é possível que a expressão de TLR-4 em HUVEC seja dissociada da sinalização de síntese de citocinas inflamatórias, observadas em células da imunidade inata ou ainda; neste modelo de inflamação aguda causada pela exposição ao soro urêmico. Por outro lado, alguns autores demonstram que as células endoteliais de pacientes com DRC apresentam ativação celular, com maior expressão de moléculas de adesão e algumas quimiocinas como IL-8⁴⁸, da mesma forma que observamos aumento da expressão de MCP-1; que poderia contribuir para maior recrutamento celular e retroalimentação da inflamação.⁴⁸

Baseado nos resultados anteriores, é possível que a exposição a concentrações e por maior tempo ao soro urêmico, contribua para detecção de maior inflamação destas células. Visto que diante do ambiente urêmico ocorre um desequilíbrio de marcadores envolvidos na inflamação e que nos últimos anos a vitamina D, tanto na sua forma ativa quanto na sua apresentação como 25(OH)D₃ podem modular mecanismos inflamatórios celulares; conduzimos um tratamento com 25(OH)D₃ para avaliar o impacto desta nestes mecanismos já mencionados. Porém o tratamento por 24h com 25(OH)D₃ não foi capaz de promover uma redução significativa na produção das citocinas e ERO, assim como não alterou as expressões de VDR, CYP27, CYP24 e catelicidina.

Ao contrário, mas em monócitos; Stubbs JR et al.⁵² relataram que após 8 semanas de suplementação com 25(OH)D₃ pacientes com DRCT aumentaram em três vezes a expressão de VDR em monócitos circulantes e reduziram níveis de citocinas inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF α , sugerindo um efeito biológico da vitamina 25(OH)D₃ sobre marcadores inflamatórios em pacientes com DRCT.⁵² É possível que a não significância na redução de parâmetros inflamatórios no nosso estudo possa estar relacionada ao menor tempo de tratamento, uma vez que as células foram tratadas por 24h e no estudo de Stubbs os pacientes foram tratados por 8 semanas; ou ainda, que a modulação da vitamina D é tempo, dose e tipo celular dependente.

Por outro lado, Haas MJ et al.⁵³ demonstraram que o pré-tratamento por 24h em células HUVEC com a forma ativa da vitamina D a 1,25(OH)₂D₃ foi capaz de reduzir

a produção de ERO em células endoteliais, enquanto a 25(OH)D₃ não obteve resultados significativos, sugerindo que a conversão da 25(OH)D₃ em 1,25(OH)₂D₃ por células endoteliais pode ser tempo dependente. Entretanto, este estudo não avaliou citocinas pró-inflamatórias. Assim, diferentemente das células da imunidade inata; é possível também que células endoteliais respondam melhor frente à forma ativa da vitamina D do que a 25(OH)D₃.

Adicionalmente, também não observamos nenhuma alteração de VEGF em nenhum dos grupos. Da mesma forma, Imaizumi T et al.⁵⁴ também não detectaram VEGF no sobrenadante de cultura de HUVEC. Estes autores sugeriram outra metodologia para melhor detecção de VEGF, como análise de lisados celulares ou imunofluorescência.⁵⁴

Por outro lado, Pawlak K et al.⁵⁵ demonstraram que os níveis plasmáticos de VEGF estão aumentados em pacientes em diálise e que este aumento se correlacionou positivamente com o aumento de estresse oxidativo nesses pacientes, sugerindo que esta correlação pode representar um dos mecanismos envolvidos na progressão da aterosclerose nessa população.⁵⁵ Assim, no nosso estudo é possível que o tempo de exposição ao soro urêmico não tenha sido suficiente para modulação do VEGF. Além disso, são escassos na literatura estudos que tenham avaliado a produção VEGF em células HUVEC

Entretanto, há que se considerarem alguns fatores: 1) Não há até o momento descrito na literatura sobre a expressão de TLR-4 como via de inflamação em células endoteliais principalmente frente ao ambiente urêmico e 2) muito menos se a suplementação com vitamina D promove a sinalização intracelular de VDR, CYP27 e CYP24 em HUVEC; que poderia modular a síntese de 1,25(OH)₂D₃ corroborando talvez para uma autorregulação da síntese intracelular das citocinas inflamatórias e

ERO observadas por nosso grupo em estudo anterior. Desta forma, diante do modelo investigado neste estudo “in vitro” de lesão endotelial na DRC, podemos sugerir que a diminuição do TLR-4 em HUVEC está dissociada da síntese de citocinas inflamatórias e ERO, mas que esta disfunção pode refletir dano celular; principalmente pela exacerbação de ERO e TNF- α que a médio ou longo prazo podem sinalizar morte celular e comprometimento vascular.

Em conclusão este é o primeiro estudo que avaliou o efeito do tratamento com 25(OH)D₃ sobre a expressão de VDR, CYP27 e CYP24, TLR-4, IL-6, IL-10, TNF α , MCP-1, VEGF, ERO, Catelicidina em HUVEC frente ao insulto com soro urêmico (*in vitro*). Este modelo de uremia demonstrou que houve diminuição de TLR4, nenhuma alteração nos mecanismos intracelulares da vitamina D e aumento da produção de citocinas inflamatórias e ERO, entretanto o tratamento agudo com 25(OH)D₃ não demonstrou efeito sobre estes marcadores.

Assim, estes dados reforçam que são necessários mais estudos com diferentes abordagens tempo-resposta para elucidar mecanismos que possam minimizar a inflamação e suas consequências fisiopatológicas e diversas complicações em células endoteliais frente ao ambiente urêmico.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Diretrizes clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica – **DRC no Sistema Único de Saúde**. Brasília, 2014
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases: prevent and control cardiovascular diseases, cancers, chronic respiratory diseases and diabetes. Geneva: **WHO**, 2008.
3. LEVEY, A. S. et al. Chronic kidney disease, diabetes, and hypertension: what's in a name. **Kidney Int.**, v. 78, n. 1, p. 19-22, 2010.
4. GO, A. S. et al. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. **N. Engl. J. Med.**, v. 351, n. 13, p. 1296-1305, 2004.
5. KEITH, D. S. et al. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. **Arch. Intern. Med.**, v. 164, n. 6, p. 659-663. 2004.
6. SNYDER, J.; FOLEY, R.; COLLINS, A. Prevalence of CKD in the United States: a sensitivity analysis using the national Health and nutrition examination survey (NHANES) 1999-2004. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 53, n. 2, p. 218-228, 2009.
7. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Disponível em: <<http://sbn.org.br>. Acesso em: 25 out. 2016.
8. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Como se prevenir. Disponível em: <<http://sbn.org.br/publico/previna-se/como-se-prevenir/>>. Acesso em: 25 out. 2016.
9. EKNOYAN, G. A Decade After the KDOQI CKD Guidelines: A Historical Perspective. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 60, n. 5, p. 686-688, 2012.
10. BARRETO, F. C. et al. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **J. Bras. Nefrol.**, v. 36, n. 2, p. 221-235, 2014.
11. VANHOLDER, R. C.; GLORIEUX, G. L. An overview of uremic toxicity. **Hemodial. Int.**, v. 7, n. 2, p. 156-161, 2003.
12. EUROPEAN UREMIC TOXINS WORK GROUP (EUTox). Disponível em: <http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>>. Acesso em: 25 out. 2016.
13. PASSAUER, J. et al. Evidence in vivo showing increase of baseline nitric oxide generation and impairment of endothelium-dependent vasodilation in normotensive patients on chronic hemodialysis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, n. 9, p. 1726-1734, 2000.

14. STINGHEN, A. E. M.; PECOITS-FILHO, R. Vascular na doença renal: para além da hipertensão. **Int. J. Hypertens.**, v. 2011, Article ID 232683, 2011.
15. Robbins and Cotran, pathologic Basics of Diseases. 7^oed, 2005.
16. STITZINGER M.; Lipids, inflammation and atherosclerosis. **The digital repository of Leiden University**. 9-36, 2007.
17. QUACK, M.; CARLBERG, C. Ligand-triggered stabilization of vitamin D receptor/retinoid X receptor heterodimer conformations on DR4-type response elements. **J. Mol. Biol.**, v. 296, p. 743-756, 2000.
18. HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740-745, 2000.
19. KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. **Acta Odontol. Scand.**, v. 59, n. 3, p. 124-130, 2001.
20. BROWN, J. et al. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. **J. Dent. Res.**, v. 90, n. 4, p. 417-427, 2011.
21. BOOTH, J. et al. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n. 1, p. 131-134, 2011.
22. VIANNA, H. R. et al. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J. Bras. Nefrol.**, v. 33, n. 3, p. 351-364, 2011.
23. STENVINKEL, P. et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia – the good, the bad, and the ugly. **Kidney Int.**, v. 67, n. 4, p. 1216-1233, 2005.
24. WATANABE, H. et al. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. **Pharmacol. Res. Perspect.**, v. 3, n. 1, p. e00092, 2015.
25. CHARO, Israel F.; TAUBMAN, Mark B. Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease. **Circ. Res.**, v. 95, p. 858-866, 2004.
26. TUMUR Z., Shimizu H., Enomoto A., Miyazaki H. & Niwa T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **Am J Nephrol.** 31, 435–41, 2010
27. FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. **Endocr Rev**, v. 18, n. 1 p. 4-25, 1997.
28. MORSI, W. G. et al. HO-1 and VEGF gene expression in human arteries with advanced atherosclerosis. **Clinical Biochemistry**, n. 39, p. 1057-62, 2006.
29. MORTON, A. R.; HERCZ, G. Calcium, phosphorus, and vitamin D metabolism in renal disease and chronic renal failure. In: KOPPLE, J. D.; MASSURY, S. G.

- Nutritional management of renal disease.** 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. p. 341-369.
30. HOLICK, M. F. Vitamina D. In: SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** 9. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 351-368.
 31. THEOFAN, G.; NGUYEN, A. P.; NORMAN, A. W. Regulation of calbindin-D28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is correlated to receptor occupancy. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 36, p. 16.943-16.947, 1986.
 32. ROODMAN, G. D. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 82, n. 23, p. 8213-8217, 1985.
 33. HOLICK, M. F. The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites. **J. Nutr.**, v. 120, n. 11, p. 1464-1469, 1990. (Suppl).
 34. DELUCA, H. F.; CANTORNA, M. T. Vitamin D – its role and uses in immunology. **FASEB Journal**, v. 15, p. 2579-2585, 2001.
 35. CLEMENS, T. L. et al. Specific high-affinity receptors for 1,25 (OH)₂ D in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 57, n. 6, p. 1308-1310, 1983.
 36. STUMP, W. E. et al. Target cells for 1,25 (OH)₂ D in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. **Science**, v. 206, p. 1118-1190, 1979.
 37. GOMART, A. F. et al. Regulation of the CAMP gene by 1,25 (OH)₂ D in various tissues. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 103, p. 552-557, 2007.
 38. KAMEN, D.; ARANOW, C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 20, p. 532-537, 2008.
 39. CANTORNA, M. T.; MAHON, B. D. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. **Exp. Biol. Med.**, v. 229, p. 1136-1142, 2004.
 40. FLANAGAN, J. N. et al. Vitamin D metabolism in human prostate cells: implications for prostatic cancer chemoprevention by vitamin D. **Anticancer Res.**, v. 26, n. 2567-2572, 2006.
 41. LIU, P. T.; STENGER, S.; LI, H. Toll-like receptor triggering of a vitamin D mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, p. 1770-1773, 2006.
 42. SORENSEN, O. E. et al. Human cathelicidin, hCAP18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. **Blood.**, v. 97, p. 3951-3959, 2001.

43. RAMANATHAN, B. et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 3, p. 361-372, 2002.
44. YAMSHCILOV, A. et al. Vitamin D for treatment and prevent of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. **Endocr. Pract.**, v. 15, n. 5, p. 438-449, 2009.
45. SARNAK, M. J.; JABER, B. L. Mortality caused by sepsis in patients with endstage renal disease compared with the general population. **Kidney Int.**, v. 58, n. 4, 1758-1764, 2000.
46. HAAG-WEBER, M.; HÖRL, W. H. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia. **Semin. Nephrol.**, v. 16, n. 3, p. 192-201, 1996.
47. DESCAMPS-LATSCHA, B. The immune system in end-stage renal disease. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 2, n. 6, p. 883-891, 1993.
48. STINGHEN A et al. Uremic serum inhibits in vitro expression of chemokine SDF1: impact of uremic toxicity on endothelial injury. **J Bras Nefrol**, v. 36(2) p.12331, 2014.
49. KACSO IM, Borza GM, Ciuce CC, Birsan A, Apostu RC, Dindelegan GC, et al. Expression of TLR-4 protein is reduced in chronic renal failure: evidence from an experimental model of nephron reduction. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56 p. 93–99, 2015.
50. ANDO M, Shibuya A, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K. Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients. **International Society of Nephrology**. v 70 p. 358 – 362. 2006.
51. MEIRELES MS, Kamimura MA, Dalboni MA, Giffoni JT, Aoike DT, Cuppari L. Effect of cholecalciferol ond vitamin D-regulatory proteins in monocytes and on inflammatory markers in dialysis patients: A randomized controlled trial. **Clinical nutrition**. p. 1-8, 2016.
52. STUBBS JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. **J Am Soc Nephrol**. v.21 p. 353–361, 2010.
53. HAAS MJ, Jafri M, Wehmeier KR, Onstead-Haas LM, Mooradian AD. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress by vitamin D in endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22;99 p. 1-10, 2016.
54. IMAIZUMI T, Itaya H, Nasu S, Yoshida H, Matsubara Y, Fujimoto K, Matsumiya T, Kimura H, Satoh K. Expression of vascular endothelial growth factor in human umbilical vein endothelial cells stimulated with interleukin-1alpha—an autocrine regulation of angiogenesis and inflammatory reactions. **Thrombosis Haemost.** 83:949–955, 2000.

55. PAWLAK K, Pawlak D, Myśliwiec M. Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients. *Med Sci Monit.* 12(4):CR181-5, 2006.