

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

RODRIGO BARBOSA DE OLIVEIRA BRITO

**EFEITO DA VITAMINA 25 (OH)D SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTOR *TOLL-
LIKE* E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM MONÓCITOS FRENTE AO
AMBIENTE URÊMICO**

São Paulo, SP

2016

RODRIGO BARBOSA DE OLIVEIRA BRITO

**EFEITO DA VITAMINA 25 (OH)D SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTOR *TOLL-
LIKE* E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS EM MONÓCITOS FRENTE AO
AMBIENTE URÊMICO**

Dissertação de mestrado 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

Brito, Rodrigo Barbosa de Oliveira.

Efeito da vitamina 25(OH) D sobre a expressão de receptor *toll-like* e mediadores inflamatórios em monócitos frente ao ambiente urêmico.
/ Rodrigo Barbosa de Oliveira Brito. 2016.

57 f.

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

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

I. Vitamina D. 2. Receptor toll-like. 3. Citocinas. 4. Uremia.

II. Dalboni, Maria Aparecida. II. Título

CDU 616

São Paulo, 12 de dezembro de 2016.

TERMO DE APROVAÇÃO

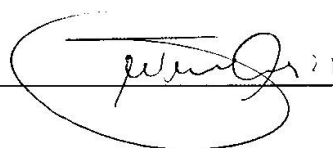
Aluno: Rodrigo Barbosa de Oliveira Brito

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

Presidente: Profa. Dra. Maria Aparecida Dalboni



Membro: Profa. Dra. Luciene Machado dos Reis



Membro: Prof. Dr. Humberto Delle



AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força e saúde para superar as dificuldades, mostrando os caminhos que me fizeram chegar até aqui.

Agradeço a Universidade Nove de Julho (UNINOVE) por toda a oportunidade concedida, no desenvolvimento da minha carreira acadêmica desde a graduação e agora o mestrado.

Agradeço a minha querida orientadora professora Maria Aparecida Dalboni por todo carinho e atenção para comigo e ao meu trabalho. Ao professor Humberto Dellê o qual tenho imensa admiração, ao professor Cleber Camacho por todos os ensinamentos, e a todos os meus professores que de certa forma contribuíram para a minha formação.

Agradeço a minha família, que me apoiou e incentivou em toda a minha vida acadêmica. Em especial a minha mãe Lourdes, meu pai William, meus irmãos Tarcísio e Tarciana, ao meu cunhado Deivson, as minhas sobrinhas Helena e Maria Victória e a minha avó Maria (*in memoriam*).

Agradeço a todos os meus amigos que ficaram ao meu lado no desenvolvimento desta pesquisa, em especial agradeço ao Rafael, Silvio, Camila, Yves, Kaline, Cristina, Diego, Stephanie, Giovani, Janaina, Luiz, Vanessa, Jacqueline, Willian, Alana, Ângela, Caren, Marie, Andreia. Meu muito obrigado.

RESUMO

A doença renal crônica (DCR) é caracterizada por um estado inflamatório causado pela presença de toxinas urêmicas no plasma dos pacientes. Este estado inflamatório está associado com um elevado risco de doenças cardiovasculares e infecções. Na DCR, há uma deficiência de vitamina 25(OH)D, a qual possui propriedades imunomoduladoras, sendo que a suplementação com a mesma pode diminuir a inflamação presente na uremia.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da 25(OH)D sobre vias inflamatórias como: receptor *toll like 4* (TRL4), estresse oxidativo (ROS) e expressão do receptor de vitamina D (VDR), 1- α hidroxilase, 24 hidroxilase e mediadores inflamatórios em monócitos no ambiente urêmico.

Os monócitos de linhagem U937 foram tratados com ou sem 25(OH)D 50ng/mL, durante 24 horas, depois estes foram incubados com 50% de soro de pacientes saudáveis ou soro de paciente urêmicos durante 24 horas a 37°C e 5 de CO₂. Os monócitos foram caracterizados pela expressão de CD14+. Os TRL4, VDR, CYP24, Cyp27 e o ROS foram avaliados por citometria de fluxo. Foi realizado ELISA do sobrenadante da cultura celular para IL-6, TNF- α , IL-10, catelicidina, MCP-1 e NF κ B.

Observamos uma alta expressão de TRL-4, IL-6, TNF- α , IL-10, catelicidina e MCP-1 em monócitos incubados com soro urêmico, comparados quando incubados com soro saudável. O tratamento com 25(OH)D foi capaz de reduzir a expressão de TRL4, catelicidina e MCP-1 frente ao ambiente urêmico. Não houve diferença na expressão do VDR, das enzimas CYP27 e CYP24 e NF-KB.

Concluimos que o ambiente urêmico induz a inflamação, aumentando TRL4 e mediadores inflamatórios, o tratamento com vitamina D induz uma melhora nos parâmetros inflamatórios, resultando em menor inflamação no ambiente urêmico.

Palavras chaves: Vitamina D, receptor toll-like, citocinas e uremia.

ABSTRACT

The chronic kidney disease (CRD) is characterized by an inflammatory condition caused by the presence of uremic toxins in the patients plasma. This inflammatory state is associated with a high risk of cardiovascular diseases and infections. In CKD, there is a deficiency of vitamin 25 (OH) D, which has immunomodulatory properties, and the supplementation with it can decrease inflammation present in uremia.

The aim of this study was to evaluate the effect of 25 (OH) D on inflammatory pathways such as toll like receptor 4 (TRL4), oxidative stress (ROS) and expression of vitamin D receptor (VDR), 1- α hydroxylase, 24 hydroxylase And inflammatory mediators in monocytes in the uremic environment.

The human monocytes (U937 lineage) were treated with or without 25 (OH) D 50ng / ml for 24 hours, then they were incubated with 50% serum from healthy patients or uremic patient serum for 24 hours at 37 ° C and 5% CO₂. Monocytes were characterized by the expression of CD14 +. TRL4, VDR, CYP24, Cyp27 and ROS were evaluated by flow cytometry. Cell culture supernatant ELISA was performed for IL-6, TNF- α , IL-10, catatelicidin, MCP-1 and NF-KB.

We observed a high expression of TRL-4, IL-6, TNF- α , IL-10, cathelicidin and MCP-1 in monocytes incubated with uremic serum, compared when incubated with healthy serum. Treatment with 25 (OH) D was able to reduce the expression of TRL4, cathelicidin and MCP-1 against the uremic environment. There was no difference in the expression of VDR, CYP27 and CYP24 enzymes and NF-KB.

We conclude that the uremic environment induces inflammation, increasing TRL4 and inflammatory mediators, treatment with vitamin D induces an improvement in the inflammatory parameters, resulting in less inflammation in the uremic environment.

Key words: Vitamin, toll-like receptor, cytokines and uremia.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das toxinas urêmicas de acordo com suas características físico-químicas e remoção por diálise	12
Tabela 2	Descrição dos kits de ELISA utilizados	36
Tabela 3	Efeito da suplementação com vitamina 25(OH)D ₃ sobre a expressão de TLR4, VDR, CYP27, CYP24, ROS, CATELICIDINA, IL-10, IL-6, TNF-ALFA, MCP-1 E NF-kB em monócitos de linhagem U-937 frente ao insulto com soro normal e urêmico	31
Tabela 4	Análises de correlação Pearson entre TR4, VDR, CYP24, CYP27, ROS, catelicidina, IL-10, IL-6, TNF- α e MCP-1	36

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Parâmetros Bioquímicos no Pool de soro normal e soro urêmico	28
Quadro 2	Incubação de monócitos na ausência e presença de pré-tratamento com vitamina D, insultado com soro de indivíduos saudáveis e soro de pacientes urêmico	29
Quadro 3	Descrição dos monoclonais utilizados para análises de citometria de fluxo	31
Quadro 4	Descrição do ensaio de estresse oxidativo (ROS)	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos receptores Toll-like (TLRs)	14
Figura 2	Ativação Imunológica pelos receptores Toll-like (TLRs)	15
Figura 3	Modulação da Vitamina D em vários tipos celulares	17
Figura 4	Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese de 1,25 (OH) ₂ D ₃ e respectivas ações em órgãos alvos	21
Figura 5	Esquema da ação da vitamina D na síntese de peptídeo antimicrobiano catelicidina.....	23
Figura 6	Desenho do estudo	28
Figura 7	Demonstração da expressão de CD14+, TRL-4 e VDR em células U937 por citometria de fluxo	31
Figura 8	Demonstração do ajuste da alta fluorescência das células U937, para análise do maquinário da Vitamina D, CYP27 e CY24	32
Figura 9	Demonstração do ajuste da alta fluorescência das células U937, para análise de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	33
Figura 10	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D ₃ sobre a expressão TLR-4, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937	39
Figura 11	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D ₃ sobre a expressão ROS, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937	39
Figura 12	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D ₃ sobre a expressão IL-6, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937	40
Figura 13	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D ₃ sobre a expressão TNF- α , frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937	40
Figura 14	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D ₃ sobre a expressão IL-10, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937	41

Figura 15	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D3 sobre a expressão MCP-1, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937	41
Figura 16	Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D3 sobre a expressão Catelicidina, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937.	42
Figura 17	Correlação entre a expressão de TLR4 e ROS, IL-6, TNF- α , IL-10, CATELICIDINA e MCP-1 em monócitos de linhagem U937	44
Figura 18	Correlação entre a expressão de IL-6 e ROS, TNF- α , IL-10, CATELICIDINA e MCP-1 em monócitos de linhagem U937	44
Figura 19	Correlação entre a expressão de TNF- α e ROS, IL-10, CATELICIDINA e MCP-1 em monócitos de linhagem U937	45
Figura 20	Correlação entre a expressão de CATELICIDINA e ROS, IL-10 e MCP-1 em monócitos de linhagem U937	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

CD - do inglês, *Clusters of Differentiation*

CO₂ - Dióxido de carbono

CYP24 - 24-hidroxilase

CYP27 - 27-Hidroxilase ou 1 alfa hidroxilase

DRC - Doença Renal Crônica

DAMPs - do inglês: *danger-associated molecular patterns*

ELISA - Imuensaio do inglês, *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*

IL – interleucina

MCP-1 - do inglês, *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

NF-κB - Fator de transcrição (do inglês, *Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of Activated B Cells*)

PAMPs - do inglês: *pathogen-associated microbial patterns*

PBS - Solução de salina tamponada com fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PMA - do inglês, *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*

ROS - Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

Rpm - Rotações por minuto

SFB - Soro Fetal Bovino

TLR - do inglês *Toll-like receptors*

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, Tumor Necrosis Factor α)

U-937 - Linhagem de monócitos humano

VDBP - do inglês: *Vitamin D Binding Protein*

VDR - do inglês: *Vitamin D Receptor*

25(OH)D₃ - 25 Hidroxivitamina D, Calcidiol

1,25(OH)₂D₃ - 1,25 Dihidroxivitamina D, Calcitriol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAIS	25
2.1 Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Preparação do pool de soro humano.....	27
3.1.1 <i>Pool</i> de Soro Normal.....	27
3.1.2 <i>Pool</i> de Soro Urêmico.....	27
3.2 Citometria de fluxo para detecção de CD14, TLR-4, VDR.....	29
3.3 Citometria de Fluxo para detecção de CYP27 e CYP24.....	30
3.4 Análise por citometria de fluxo.....	31
3.5 Citometria de Fluxo para detecção de Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	34
3.6 ELISA para detecção de TNF- α , IL-6, IL-10, catelicidina, MCP-1 e NF-kB.....	36
3.7 Análise Estatística.....	36
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7. ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

Pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentam deficiência da resposta imunológica. De fato, pacientes com DRC e em diálise apresentam elevadas taxas de infecções, principalmente por bactérias, estas infecções estão associadas com deficiência nos mecanismos imunes destes indivíduos frente aos patógenos (Sarnak et al., 2000; Haag et al., 1996; Descamps et al., 1993).

Um dos fatores associados a deficiência imune, principalmente da imunidade inata, é a presença de toxinas urêmicas. Com a perda da função renal e a queda na taxa de filtração glomerular, ocorrem vários distúrbios eletrolíticos e desordens graves, dentre elas o acúmulo progressivo destas toxinas, fenômeno este conhecido como uremia (Barreto et al., 2014; Vanholder et al., 2003).

As toxinas urêmicas são classificadas de acordo com o grupo Europeu de toxinas urêmicas (EUTox) em 3 classes, de acordo com suas características físico-químicas e remoção por diálise.

Tabela 1: Classificação das toxinas urêmicas de acordo com suas características físico-químicas e remoção por diálise.

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

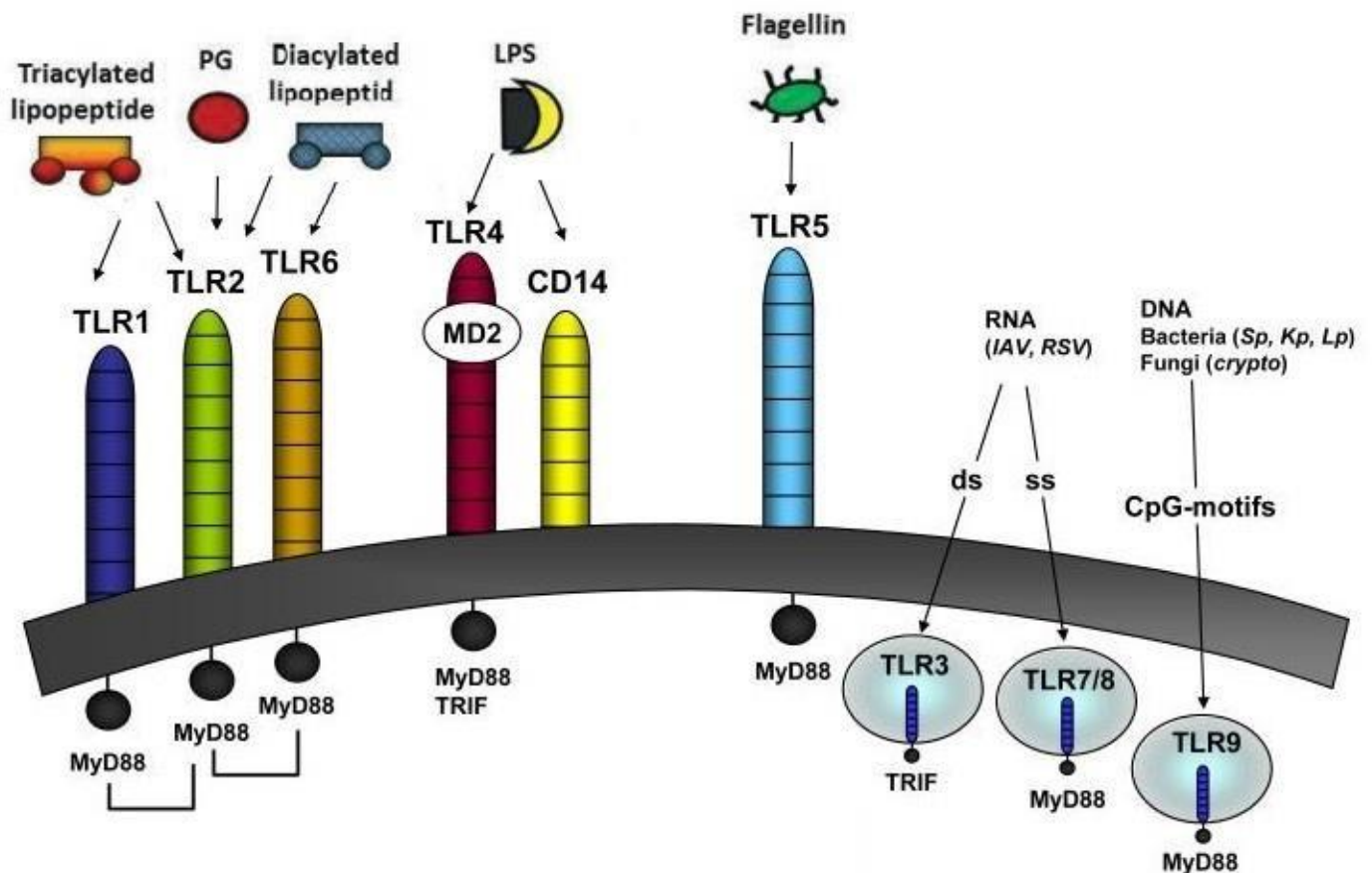
Fonte: Adaptado de VANHOLDER; GLORIEUX, 2003.

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 (Barreto et al., 2014; Vanholder et al., 2003; EUTox, 2016).

Este ambiente urêmico desencadeia diversos processos inflamatórios como a ativação de monócitos, diminuindo a capacidade fagocitária, apoptose de neutrófilos, então perdendo a capacidade de resposta a infecção. (Nosratola et al., 2012 e Sela et al., 2005).

Além da prevalência de infecções em pacientes com DRC, vários estudos demonstram relação direta de maior estado inflamatório e estresse oxidativo detectado pela produção de vários biomarcadores inflamatórios como TNF- α , IL6, proteína C reativa (PCR), e ROS (Sela et al., 2005), associados a várias doenças, principalmente a doença cardiovascular (Usama et al., 2016).

Um dos mecanismos associados com a inflamação são os receptores *toll like* (Nosratola et al., 2012). Estes receptores estão presentes na membrana celular de vários tipos celulares, como monócitos, neutrófilos e linfócitos e estão associados não somente no reconhecimento de patógenos infecciosos que são denominados de padrões moleculares relacionados aos patógenos (PAMPs), mas também estão associados com o reconhecimento de substâncias antigênicas não infecciosas, as quais são denominadas de DAMPs (Figura 1) (George et al. 2016).



Adaptado de Melissa et al; Int Immunopharmacol. 2011 Oct; 11(10): 1399–1406.

Figura 1: Reconhecimento de PAMPs e DAMPs pelos receptores Toll-like (TLRs).

Uma vez que estes receptores são ativados, ocorre uma sequência de eventos intracelulares, que resultam na produção de vários fatores inflamatórios (Figura 2).

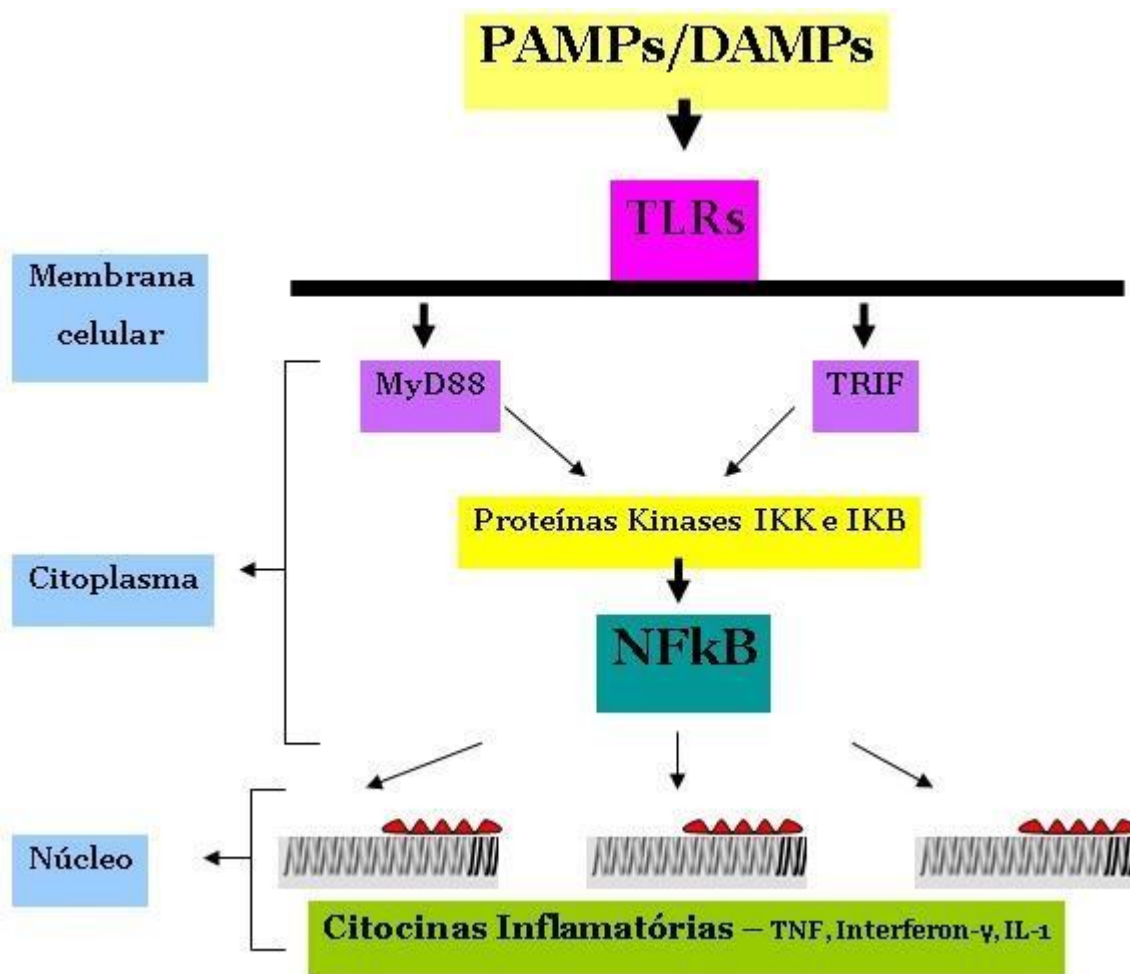


Figura 2: Ativação Imunológica pelos receptores Toll-like (TLRs).

O ambiente urêmico *per se* é extremamente pró-inflamatório. O fato de células da imunidade inata, como monócitos, neutrófilos e linfócitos dos pacientes com DRC entrarem em contato com dialisadores, linha arterio-venosa, água, soluções de diálise e principalmente as toxinas urêmicas (circulantes no plasma destes pacientes em decorrência da perda da função renal), acabam resultando na ativação destas células a produzirem inúmeros mediadores inflamatórios e consequente inflamação, que por sua vez participa da fisiopatologia de várias comorbidades nos pacientes com DRC, como por exemplo anemia e doença cardiovascular (Charytan et al., 2015). O conjunto destes fatores junto à hipovitaminose D sugere que estes sejam responsáveis

por maior prevalência de inflamação e conseqüentemente piores desfechos na população em diálise (Capusa et al., 2015).

A vitamina D, além de regular o metabolismo de Ca e P, também tem sido descrita com importante efeito imunomodulador. (Figura 3).

Desta forma, suplementação de vitamina D nos pacientes com DRC tem se mostrado eficiente no que se refere aos distúrbios do cálcio e fósforo nesta população (Pilz S et al., 2016). Entretanto, poucos estudos têm sido conduzidos para avaliar o efeito desta suplementação no que se refere as células e mecanismos envolvidos na resposta da imunidade inata. Recentemente, Zhang Y et al descreveram efeito benéfico da suplementação com vitamina D em relação a diminuição de IL-6 e TNF- α , entretanto este estudo foi conduzido em pacientes sem doença renal.

A vitamina D também participa na regulação de vários mecanismos como controle do sistema renina-angiotensina-aldosterona, proliferação celular e imunomodulação da resposta inflamatória (Figura 3).

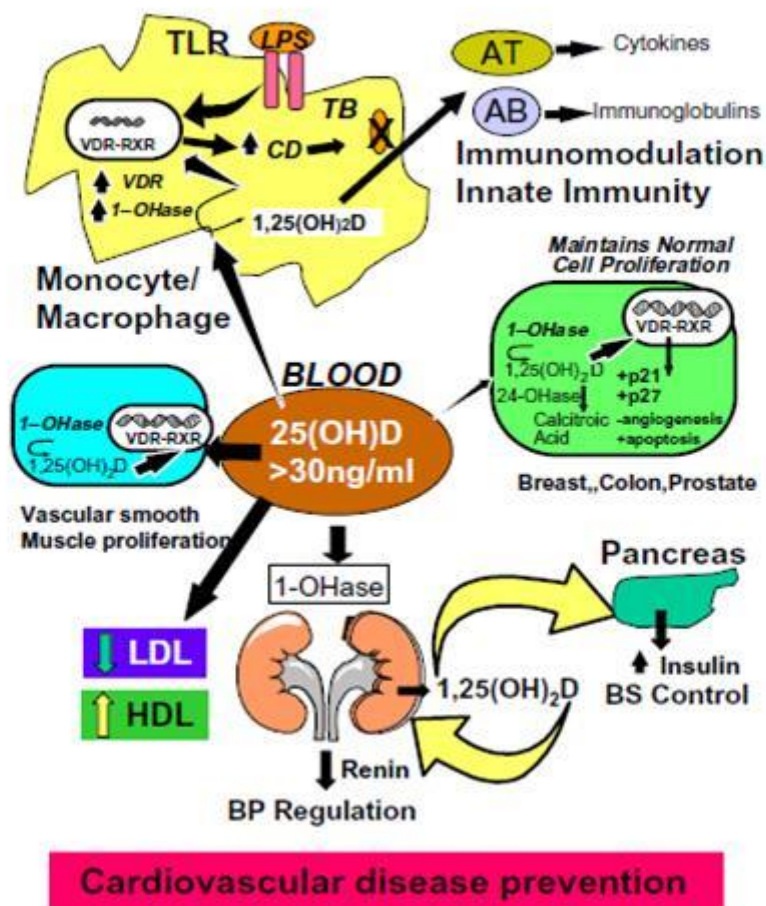


Figura 3: Modulação da Vitamina D em vários tipos celulares.

A forma ativa da vitamina D, a 1,25-diidroxivitamina D (1,25(OH)₂D), tem como principal função fisiológica a manutenção das concentrações intra e extracelulares de cálcio em níveis fisiologicamente aceitáveis (Morton et al., 1997). Esse efeito é exercido por meio de sua ação na regulação do metabolismo do cálcio e fósforo no intestino e ossos (Holick et al., 2003). No intestino, age promovendo aumento na absorção ativa de cálcio (via formação de proteína ligadora de vitamina D - VDBP) e de fósforo (Theofan et al., 1986). No osso, sua

ação é importante para o remanejamento ósseo normal, através do aumento do número de osteoclastos (Roodman et al., 1985).

A principal fonte de vitamina D para o ser humano é a síntese endógena, na pele, como consequência da exposição à luz solar. Estudos mostram que 90-95% das necessidades dessa vitamina podem ser atendidas por meio dessa fonte (Holick et al., 2004). Estima-se que o organismo utiliza cerca de 3.000 a 5.000 UI de vitamina D₃ por dia (Heaney et al., 2003).

Na natureza, poucos alimentos são fontes de vitamina D entre eles o óleo de fígado de peixe e a gordura de peixe (Vaes et al., 2016). A necessidade dessa vitamina em pessoas que se expõem regularmente ao sol, em condições apropriadas, é suprida mesmo na ausência de fontes dietéticas (Arnoud et al., 1996). A recomendação dietética de vitamina D para adultos de ambos os sexos é de 600 UI/dia (LeFevre et al., 2014).

A vitamina D é, em princípio, biologicamente inativa e requer sucessivas hidroxilações no fígado e rim para a formação da 1,25(OH)₂D, a forma mais ativa dessa vitamina (Reichel et al., 1989). A primeira etapa das reações é a formação do colecalciferol vitamina D₃ na pele, em consequência à exposição ao sol. Apesar desse processo ser bastante eficiente, alguns fatores como o envelhecimento, o uso de filtros ou protetores solares, a quantidade de melanina na pele, as alterações sazonais e a latitude podem diminuir a produção cutânea de vitamina D₃ (Holick et al., 2005).

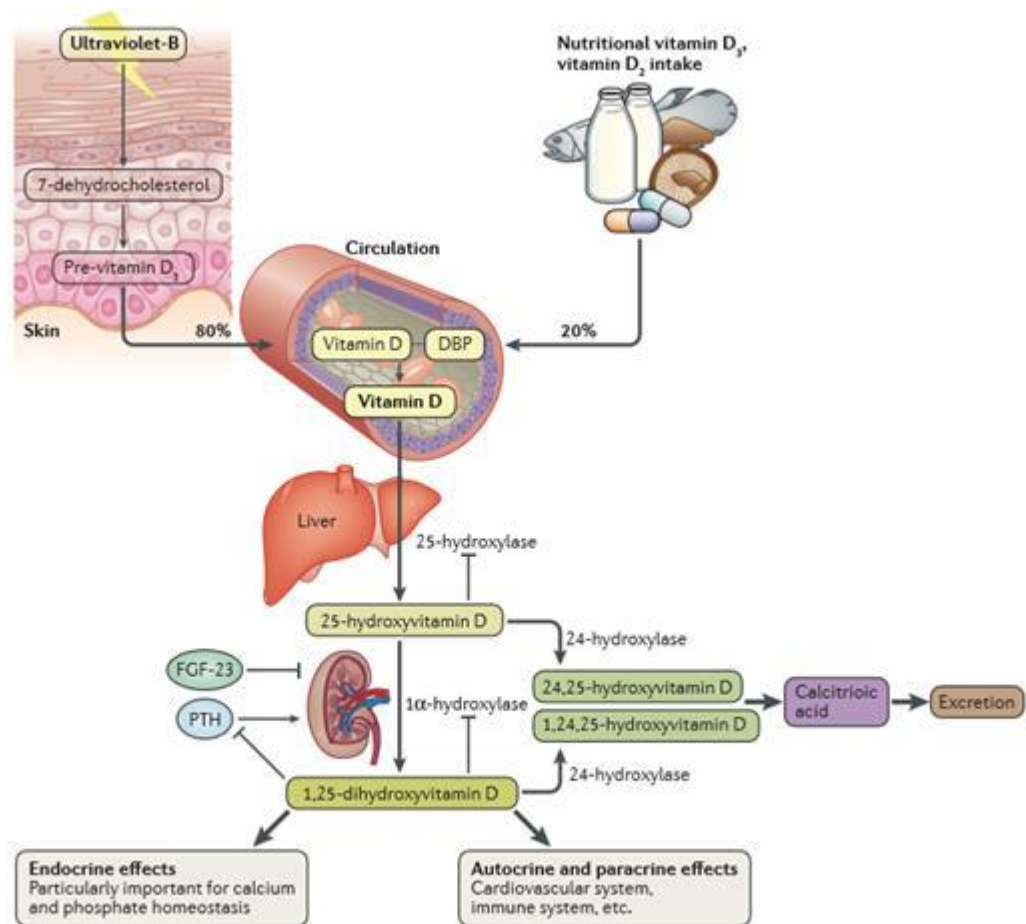
Para que ocorra a síntese do colecalciferol vitamina D₃ na pele, os fótons ultravioletas penetram na pele onde provocam a fotólise do 7-deiidrocolesterol (pró-vitamina D₃) aí presente, formando o pré-colecalciferol (pré-vitamina D₃). Quando foto-sintetizada, a pré-vitamina D₃ pode ser termicamente isomerizada

a colecalciferol vitamina D₃ ou pode absorver radiação ultravioleta e formar isômeros biologicamente inertes (lumisterol e taquisterol). O excesso de colecalciferol produzido pode ser armazenado no tecido adiposo e utilizado posteriormente, principalmente no inverno, quando a produção cutânea dessa vitamina se encontra diminuída (Holick et al., 2005).

O colecalciferol sintetizado na pele ou ingerido pela dieta entra na circulação e se liga à proteína ligadora de vitamina D. Dessa maneira, é transportado para o fígado, onde, por meio da ação da enzima 25-hidroxilase, ocorre a primeira hidroxilação no carbono 25, resultando na formação da principal forma de vitamina D circulante, a 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) (Holick et al., 1989). A produção de 25(OH)D pelo fígado é regulada por um mecanismo de retroalimentação inibitória (*feedback* negativo) controlado pelo colecalciferol, 25(OH)D e pela 1,25(OH)₂D (Bell et al., 1985).

Uma vez sintetizada, a 25(OH)D é então transportada às células dos túbulos renais proximais, onde na mitocôndria, sofre mais uma hidroxilação no carbono 1 por ação da enzima 25(OH)D-1- α -hidroxilase específica, transformando-se em 1,25(OH)₂D que tem ação em vários órgãos alvos (Figura 4) (Holick et al., 1989). A 1,25(OH)₂D entra na circulação e se liga à proteína ligadora de vitamina D e por meio da interação com receptores no intestino e osso exerce a sua principal função endócrina que é manter a homeostase do cálcio (Holick et al., 2005). A 1,25(OH)₂D é o único hormônio responsável por regular a eficiência da absorção intestinal de cálcio de forma que na sua ausência somente 10% a 15% do cálcio ingerido é absorvido.⁶ Entretanto, com concentrações séricas adequadas de vitamina D o intestino absorve cerca de 30% a 40% do cálcio dietético (Holick et al., 2005). Apesar da

deficiência/insuficiência de 1,25(OH)₂D ser importante, é a concentração circulante de 25(OH)D que determina o *status* de vitamina D de um indivíduo. A concentração sérica normal de 25(OH)D é geralmente descrita como variando de 30 a 60 ng/mL. Valores séricos inferiores a 20 ng/mL são considerados indicativos da deficiência de vitamina D. A intoxicação por vitamina D ocorre quando a concentração de 25(OH)D é superior a 150 ng/mL associada a hipercalcemia e hiperfosfatemia (Holick et al., 1990). Estudos sugerem que 1.000 IU de vitamina D₃ por dia (síntese cutânea e/ou fonte dietética) são necessários para a manutenção das concentrações normais de 25(OH)D (30 a 40 ng/mL) (Holick et al., 2014; Heaney et al., 2003; Glerup et al., 2000). Consideram-se valores normais de 1,25(OH)₂D entre 16 e 60 pg/mL, entretanto sua utilização é de pequeno valor na avaliação da deficiência de vitamina D, pois, à medida que a deficiência progride, há um aumento na produção e secreção do paratormônio que, nos túbulos renais, estimula a atividade da enzima 25(OH)D1- α -hidroxilase. Assim, o hiperparatireoidismo secundário associado à deficiência de vitamina D acelera a conversão de 25(OH)D em 1,25(OH)₂D. Como a concentração circulante de 25(OH)D é aproximadamente da ordem de três vezes maior que a da 1,25(OH)₂D, até mesmo concentrações reduzidas de 25(OH)D no sangue podem proporcionar substrato suficiente para a formação de 1,25(OH)₂D (Holick et al., 2003).



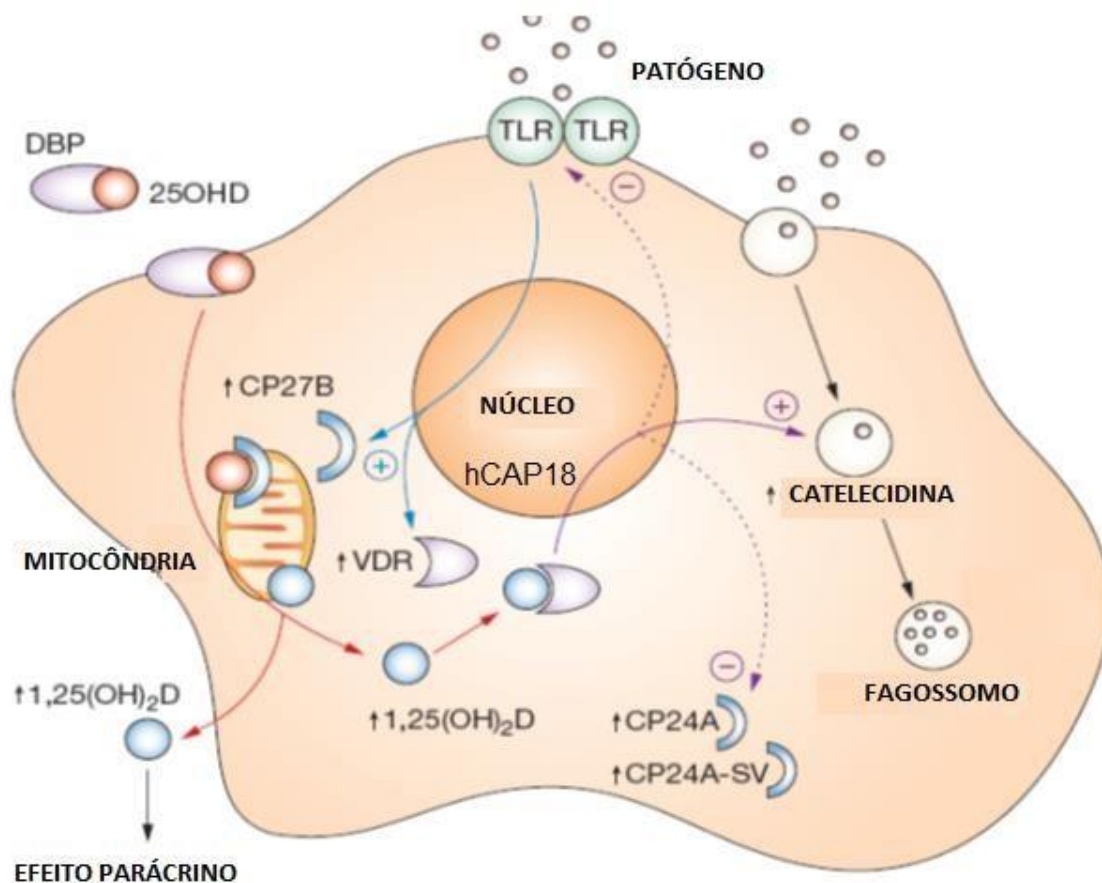
Stefan Pilz/ Nat Rev Cardiol. 2016 Jul;13(7)

Figura 4: Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos na síntese de 1,25 (OH)₂D₃ e respectivas ações em órgãos alvos.

Outro aspecto importante é que a 1,25(OH)₂D pode ser produzida em vários outros tecidos e células do organismo como no colón, próstata, pele, monócitos ativados, células pulmonares e da paratireoide (Holick et al., 2004). Portanto, a manutenção das concentrações adequadas de 25(OH)D (> 30 ng/mL) também é necessária para que possa ocorrer a síntese extrarenal de 1,25(OH)₂D.

Além da vitamina D estar associada com o metabolismo do cálcio e fósforo, tem sido descrito que esta aumenta a atividade bactericida através da ativação de mecanismos da imunidade inata (Deluca et al., 2001). O conhecimento do metabolismo da vitamina D e sua função extraesqueleto tem

aumentado consideravelmente durante as três últimas décadas. A descoberta que o receptor da vitamina D (VDR) e a enzima 1 α -hidroxilase (CYP27b1) estão presentes nas células do sistema imune, incluindo as células mononucleares circulantes e neutrófilos (Clemens et al., 1983; Stump et al., 1979; Gomart et al., 2007; Kamen et al., 2008) tem revolucionado o campo da imunologia da vitamina D. Além disso, estes conhecimentos tem aumentado o interesse na vitamina D como potencial modulador de várias doenças (Cantorna et al., 2004; Flanagan et al., 2006). Um estudo recente demonstrou que a vitamina D regula a expressão de peptídeos antimicrobianos endógenos específicos (Liu et al., 2006), sendo que este mecanismo associa a vitamina D como potencial modulador da resposta imune a várias doenças infecciosas. Esta modulação ocorre por ativação de receptores toll-like que sinalizam para maior expressão de VDR e 1 α -hidroxilase, a enzima que converte 25 (OH) D₃ para a forma ativa da vitamina D, a 1,25 (OH)₂ D. Esta forma ativa, regula o VDR para sinalizar o gene codificador hCAP18 que é uma pró-proteína que é clivada para a liberação do peptídeo antimicrobiano, catelicidina (Sorensen et al., 2001) a qual age como microbicida. É conhecido contra patógenos, incluindo bactérias gram-negativa e positiva, vírus e fungos (Figura 5 – esquemática da ação da vitamina D na síntese de peptídeo antimicrobiano) (Ramanathan et al., 2002). Desta forma, na deficiência de 1,25 (OH)₂ D pode haver diminuição da produção de catelicidina (Yamshcilov et al., 2009).



Adaptado de Adams *et al*, 2012; *A. Biochemical*. 523: 95-102

Figura 5: Esquema da ação da vitamina D na síntese de peptídeo antimicrobiano (catelicidina).

Até o presente momento, não há estudo que tenha avaliado o efeito da vitamina D no ambiente urêmico e sua regulação sobre a expressão de receptores *toll-like*, mediadores inflamatórios e mecanismos da vitamina D em células da imunidade inata.

Assim, com a finalidade de avaliar exclusivamente o efeito das toxinas urêmicas sobre estes mecanismos inflamatórios e se a suplementação com vitamina D é capaz de diminuir a geração dos mediadores inflamatórios em monócitos, o objetivo do nosso estudo foi investigar em modelo “in vitro” o efeito da vitamina D sobre a expressão do receptore *toll like 4*, VDR, 1- α hidroxilase, catelicidina, estresse oxidativo e citocinas inflamatórias frente ao ambiente

urêmico (soro urêmico). Para isto, foi utilizado um modelo de cultura de células da linhagem U937, que são células de linhagem monocitária humana já bem estabelecido na literatura (Jain et al., 2013).

2 OBJETIVO GERAIS

Avaliar o efeito da vitamina D na modulação de marcadores inflamatórios e mecanismos intracelulares em monócitos de linhagem humana U937 frente ao ambiente urêmico.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da vitamina D sobre a modulação do receptor TLR-4, estresse oxidativo, catelicidina e citocinas inflamatórias no ambiente urêmico.

Avaliar o efeito da suplementação de vitamina D sobre a modulação do receptor de vitamina D (VDR), CYP27 hidroxilase e CYP24 hidroxilase frente ao ambiente urêmico.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas células imortalizadas da linhagem monocítica U937 (ATCC nº#TIB-202) e diferenciadas em monócitos com forbol éster 12–miristato 13 - acetato de forbol (PMA) (Sigma-Aldrich P1585) para avaliar em cultura a modulação da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão dos receptores TLR- 4, VDR, CYP27, CYP24, catelicidina, IL-6, IL-10, MCP-1, NF-kB e estresse oxidativo frente ao plasma urêmico. Foram realizados 8 ensaios para estas avaliações.

As células U937 até a quinta passagem foram descongeladas em banho Maria a 37° C em agitação por 2 minutos, o conteúdo celular foi transferido para um tubo cônico contendo 9 mL de meio de cultura e centrifugadas 150 G por 5 minutos. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e o pellet ressuspenso em 15 mL de meio de cultura RPMI-1640 (pH 7.4, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), 10 mmol/L de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, NY, USA), 2 mmol/L de L-Glutamine (Merck, Darmstadt, Germany), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco, BRL, Life Technologies, USA), 10% de soro bovino fetal e mantidas em cultura a 37° C com 5% de CO₂.

O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até que a concentração de células atingir 1x10⁶/mL. A diferenciação de células U937 para monócito foi realizada utilizando-se PMA a 10nM/mL por 24hs em garrafa de cultura de 75cm³ contendo 1x10⁶ células/mL. Após a diferenciação, as células foram lavadas em 10mL de PBS (Sigma, Cat P3744-1PAK) para remoção do PMA e incubadas com 5mL de tripsina 0,5%, com finalidade de desprender as células da superfície da placa, obtendo uma suspensão celular homogênea. Em seguida, as células foram

lavadas com meio de cultura (5mL) para a neutralização da tripsina, e foi realizado teste de viabilidade celular utilizando Azul de Tripán.

As células U937 após a diferenciação foram transferidas para garrafas de cultura de 25cm², onde foram pré-tratadas com vitamina 25(OH)D₃ (Sigma-Ildrich CAT:101443236), na concentração de 50ng/mL por 24hs, utilizando 1x10⁶ células/mL. Após o pré-tratamento com vitamina 25(OH)D₃, as células foram insultadas com soro de pacientes urêmico e soro de indivíduos saudáveis v/v RPMI, com ou sem pré-tratamento de vitamina 25(OH)D₃ (Quadro 2).

3.1 Preparação do pool de soro humano

3.1.1 Pool de Soro Normal: foram coletadas amostras de sangue (20 mL) de 20 voluntários sadios em tubos sem anticoagulantes e centrifugadas a 500 G por 10 minutos. A seguir o sobrenadante foi transferido para um recipiente estéril, e armazenado em alíquotas em freezer -80°.

3.1.2 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 500 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 imunossupressores, 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.

Quadro 1: Parâmetros Bioquímicos no Pool de soro normal e soro urêmico.

	<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

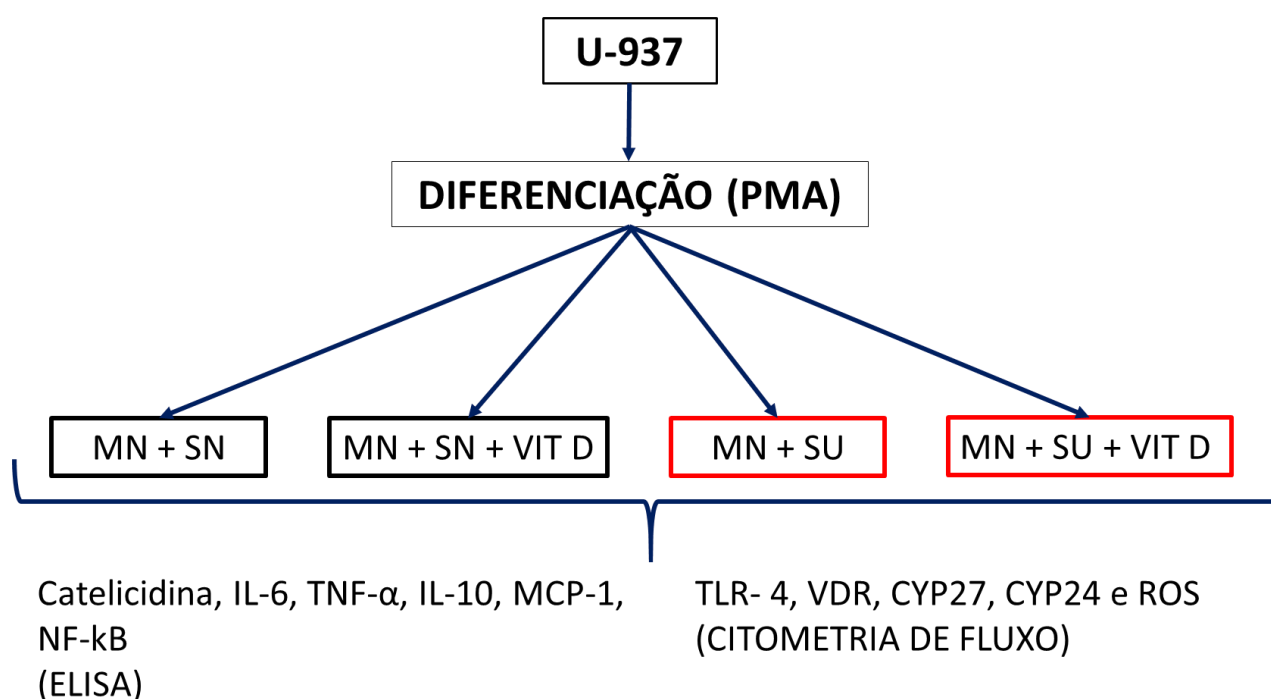


Figura 6: Desenho do estudo.

MN = Monócito

SN = Soro de indivíduo saudável

PU = Soro paciente urêmico

VIT D = Vitamina 25 (OH)D₃

Quadro 2: Incubação de 1×10^6 /mL de monócitos na ausência e presença de prétratamento com vitamina D, insultado com soro de indivíduos saudáveis e soro de pacientes urêmico.

	SN	SN + 25(OH)D3	SU	SU + 25(OH)D3
RPMI	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
SORO	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
VITAMINA 25(OH)D₃ (50ng/mL)	-----	Pré-tratado	----- -	Pré-tratado

3.2 Citometria de fluxo para detecção de CD14, TLR-4, VDR

Após o término do protocolo experimental descrito no (Quadro 2) foram transferidos 3×10^5 células para tubos de citometria 12x75 mm. Estes foram centrifugados a 500 G por 10 min a 4°C e descartado o sobrenadante. Acrescentou-se 100 µL de BSA (BD Pharmingen, Cat 349202). A seguir, foram adicionados anticorpos monoclonais para antígenos de superfície CD14 (caracterização de monócitos) e TLR-4 (Quadro 3), incubados por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a incubação, foi adicionado 2 mL de PBS (Sigma, Cat P3744-1PAK). Em seguida, foi centrifugado a 500 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 seguido do anticorpo secundário

descrito no 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. Em seguida, centrifugados e desprezado o sobrenadante. Adicionou-se 300 µL de solução de PBS 1% AZIDA e a detecção da expressão destes receptores foi realizada 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.

3.3 Citometria de Fluxo para detecção de CYP27 e CYP24

Foram transferidas 3×10^5 células para os tubos de citometria 12x75 mm. Estes foram centrifugados a 500 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, Incubados por 20 minutos a 4-8°C ao abrigo da luz. Em seguida, centrifugado e desprezado o sobrenadante. A seguir, foi adicionado anticorpo monoclonal para marcação de 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 300 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 monoclonais utilizados para análises de citometria de fluxo.

Painel	Marcador	Quantidade	Fluorocromo	Clone	Fabricante	Catálogo
BRANCO	-	-	-	-	-	-
TUBO 01	CD14	5µL	FITC	61D3	eBioscience	11014942
	TRL-4	5µL	PE	HTA125	eBioscience	12991742
	VDR	1µL (primário) 3µL (secundário)	APC	H1512 MOUSE	Santa Cruz/ Invitrogen	SC13133 Z25151
TUBO 02	CYP24	1µL (primário) 3µL (secundário)	A.F 488	D0811 RABBIT	Santa Cruz/ Invitrogen	SC66851 Z5302
	CYP27	1µL (primário) 3µL (secundário)	A.F 647	K2911 GOAT	Santa Cruz/ Invitrogen	SC49642 Z25608

3.4 Análise por citometria de fluxo

Utilizou-se um gráfico dot plot de dispersão frontal (FSC) versus dispersão lateral (SSC) após a caracterização das células U937, onde foi definido a região de autofluorescência para serem eliminadas das análises. A seguir foi utilizado a estratégia de FMO (*Fluorescência Minus One*), para determinar possíveis sobreposições de fluorocromos, permitindo mais precisão na análise. Para análise dos marcadores TLR-4 e VDR foram utilizados gráficos de DOT-PLOT. Para análise dos marcadores CYP24 e CYP27 foram utilizados gráficos do tipo histogramas. Os resultados foram descritos em mean fluorescence intensity (MFI) (média de intensidade de fluorescência), desta forma, quanto maior for a MFI, maior é a expressão destes receptores.

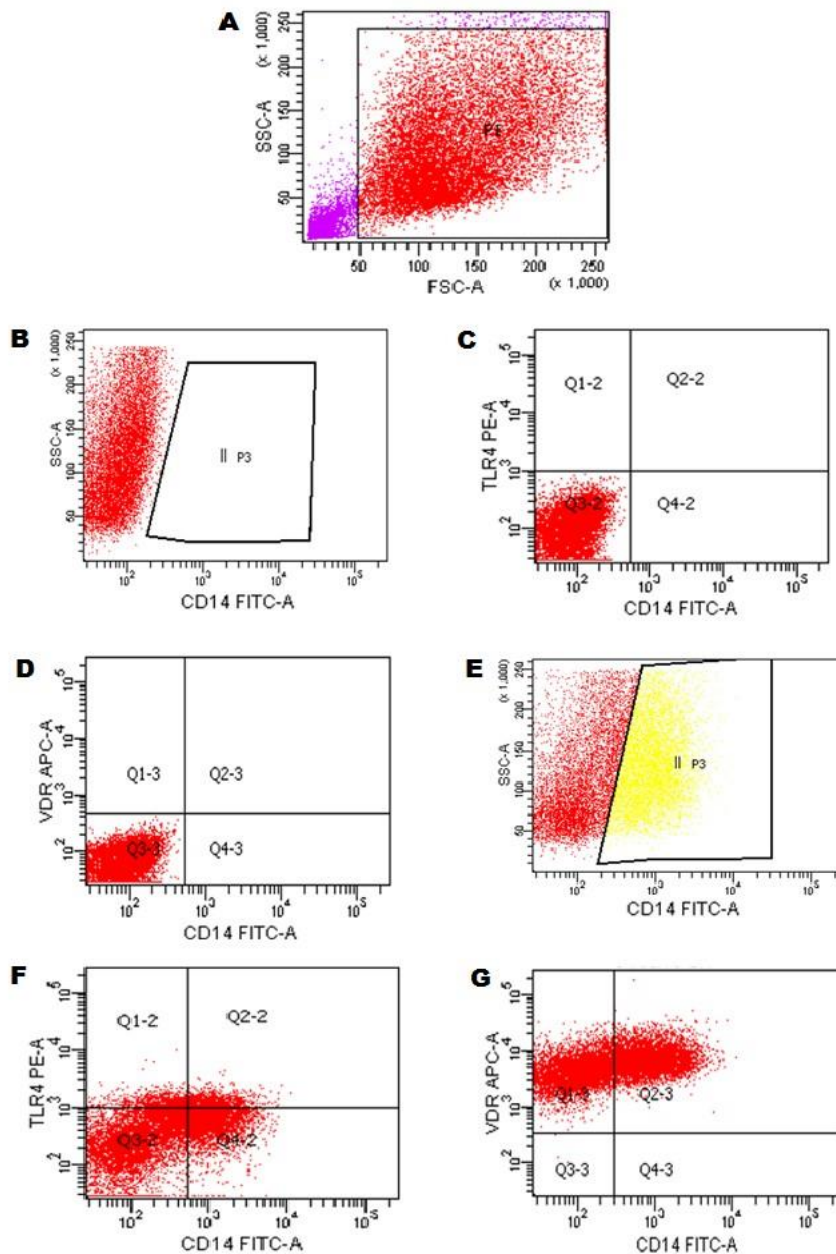


Figura 7: Demonstração da expressão de CD14+, TRL-4 e VDR em células U937 por citometria de fluxo.

A: Células U937 foram selecionados no *gate* P1 de acordo as características de tamanho (Foward Scatter – FSC) e complexidade interna (Side Scatter – SSC). Figuras B, D e E: ajuste de autofluorescência das células U937 nos canais de detecção para os respectivos anticorpos marcados com os respectivos fluorocromos FITC, PE e APC. Figura E – P3 = Expressão de CD14 FITC+ em U937; Figura F – Q2-2 = Expressão de TLR4 PE e CD14 FITC+ em U937. Figura G – Q2-6 = Expressão de VDR APC e CD14 FITC+ em U937.

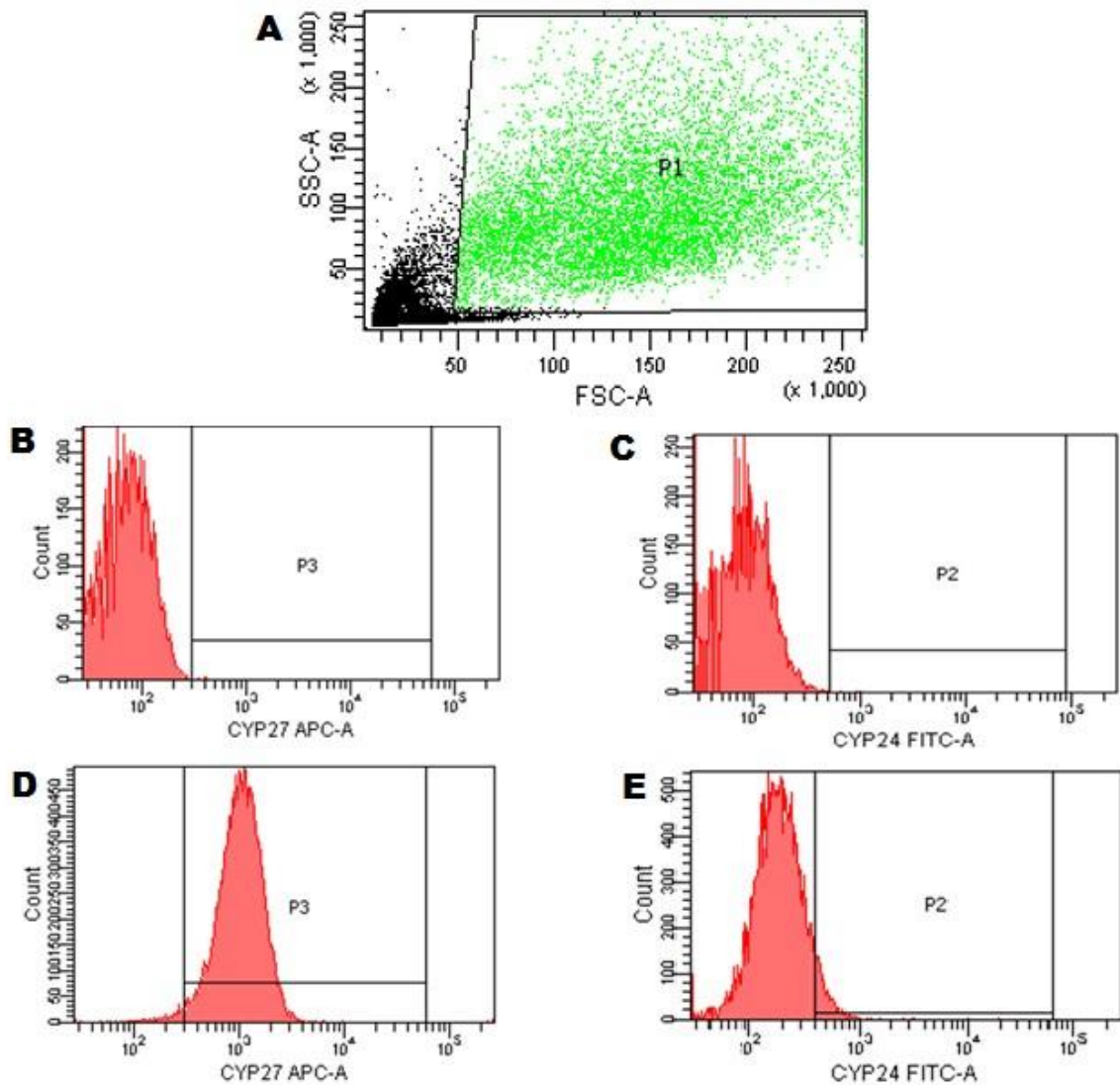


Figura 8: Demonstração do ajuste da alta fluorescência das células U937, para análise do maquinário da Vitamina D, CYP27 e CY24.

A: Gate P1 = Células U937 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). Figuras B, C : Ajuste de autofluorescência das células para os canais de detecção de anticorpos monoclonais conjugados aos respectivos fluorocromos : Alexa fluor (AF) 647 e AF 488. D e E: U937 positivas para anticorpos monoclonais: CYP27 e CYP24 como demonstrado nos quadrantes P3 e P2.

3.5 Citometria de Fluxo para detecção de Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Foram transferidos 3×10^5 células no tubo de citometria 12x75 mm. Centrifugado a 500 G por 10 min a 4°C, e descartado o sobrenadante. Acrescentou-se 1mL de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, MO, USA), diluído em PBS (BD Pharmingen, Cat 349202), na concentração de 0,3 mM. As amostras foram incubadas por 30 minutos em banho Maria a 37°C e ao abrigo da luz. Em seguida os tubos foram centrifugados e desprezado o sobrenadante. Adicionou-se 300µL de PBS (Sigma, Cat P37441PAK) e foram realizadas imediatamente as leituras no citômetro de fluxo (FacsCanto I, BD).

Quadro 4: Descrição do ensaio de estresse oxidativo (ROS).

Geração de Radicais Livres	Monócitos	DCFH-DA	PBS
Controle Negativo	3×10^5	-	1000µL
Geração Espontâneo	3×10^5	100µL	900µL

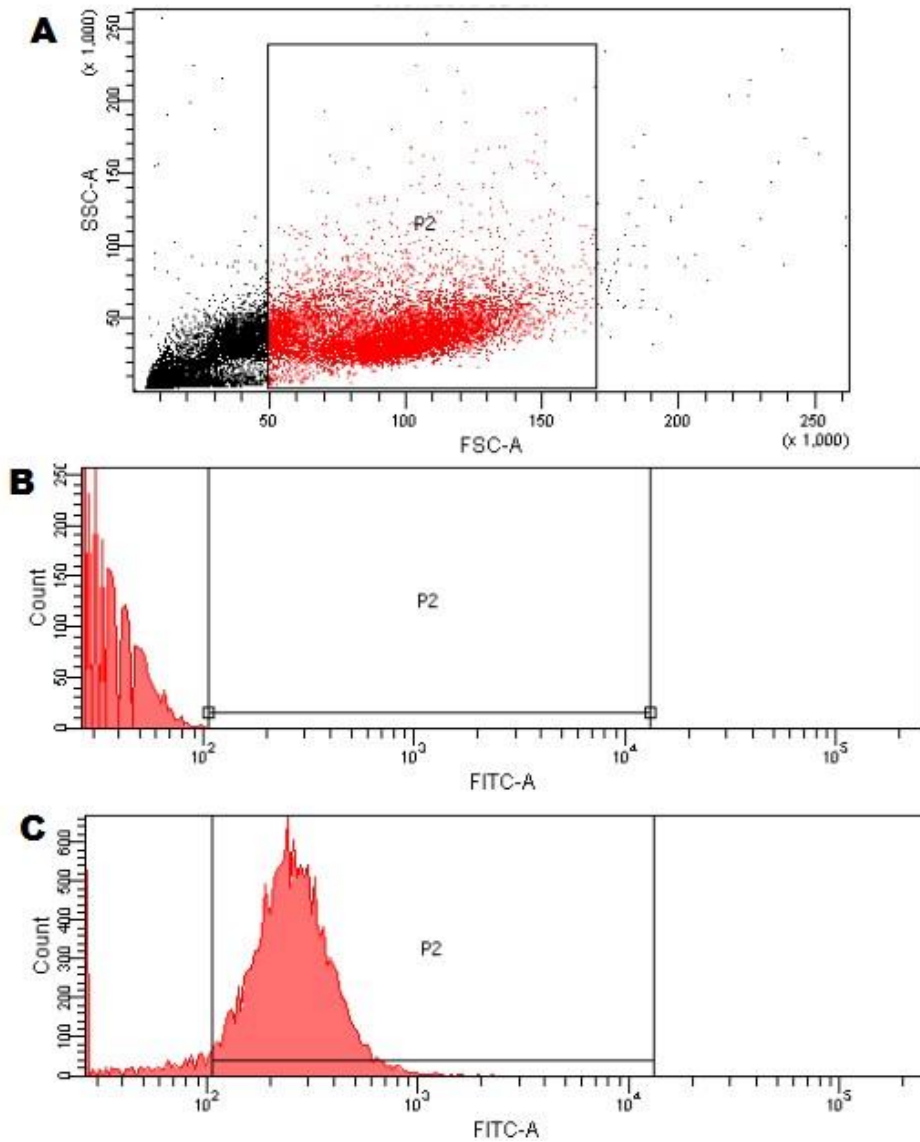


Figura 9: Demonstração do ajuste da alta fluorescência das células U937, para análise de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).

A: Gate P2 = Células U937 foram selecionadas a partir de suas características de tamanho (Foward Scatter – FSC) e complexidade interna (Side Scatter – SSC). A partir do *gate* foi criado o gráfico do tipo histograma (quantidade de células em relação a intensidade de fluorescência detectada). Figuras B: Ajuste de autofluorescência das células para o canal de detecção FITC. C: U937 positivas para DCFH demonstrado no quadrante P2.

3.6 ELISA para detecção de TNF- α , IL-6, IL-10, catelicidina, MCP-1 e NF-kB

Após o termino de cada experimento, foram armazenadas células U937 e sobrenadantes de cultura no freezer -80°C, para a realização de ensaios de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). TNF- α , IL-6, IL-10, catelicidina e MCP-1 foram mensuradas no sobrenadante de cultura. As células armazenadas 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.

Tabela 2: Descrição dos kits de ELISA utilizados.

PROTEÍNA	KIT COMERCIAL
IL-6	KIT human IL-6 High Sensitivity cat: HS600B R&D SYSTEMS
TNF- α	KIT human TNF- α High Sensitivity cat: HSTA00D R&D SYSTEMS
IL-10	KIT human IL-10 cat: 550613 BD
LL37 (CATELICIDINA)	KIT human LL37(CATELICIDINA) cat: HK321-02 Hycult biotech
CCL2 (MCP-1)	KIT human CCL2 (MCP-1) affymetrix eBioscience ref:887399-22
NFkB p65	KIT human NFkB p65 cat: 85-86083-11 eBioscience

3.7 Análise Estatística

Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis, com resultado paramétrico para todos os grupos. Os resultados foram expressos em mediana (máximo e mínimo). Para testar as diferenças entre os grupos estudados, foi utilizado o Teste ANOVA one-way com Pós-Hoc de Tukey. O teste de Pearson foi utilizado para analisar as correlações entre os parâmetros do estudo. Foi fixado o valor de $p < 0,05$ para significância estatística e as análises foram realizadas utilizando-se o software SPSS (Statistical Package Social Sciences) versão 18.0 para Windows.

4 RESULTADOS

Observamos um aumento na expressão de TLR 4, ROS, IL-6, TNF- α , IL10, catelicidina e MCP-1 em monócitos incubados com soro urêmico comparado ao soro normal (Tabela 3). Quando monócitos foram incubados com soro urêmico e previamente tratados com 25(OH)D₃, observamos redução na expressão de TLR4 e MCP-1 e catelicidina (Tabela 3).

Não foi observado diferenças entre os grupos, quanto à expressão do VDR, das enzimas intracelulares da Vitamina D CYP27 e CYP24 e NF-KB (Tabela 3).

Observou-se uma correlação positiva entre a expressão de TLR4 e ROS, IL-6, TNF- α e IL-10, MCP-1 e catelicidina (figura 17). Também se observou uma correlação positiva entre a IL-6 com ROS, IL-10, catelicidina e MCP-1 (Figura 18). Em relação ao TNF- α , houve correlação positiva entre e ROS, IL-10, catelicidina e MCP-1 (Figura 19). Houve também correlação positiva entre catelicidina e ROS, IL-10 e MCP-1(Figura 20).

Tabela 3: Efeito da suplementação com vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão de TLR4, ROS, VDR, CYP27, CYP24, IL-6, TNF- α , IL-10, Catelicidina, MCP-1 e NF-kB em monócitos de linhagem U-937 frente ao insulto com soro normal e urêmico (n =8).

	SORO NORMAL (SN)		SORO URÊMICO (SU)	
	SN	25(OH)D ₃	SU	25(OH)D ₃
Expressão (MIF)				
TRL4	716 (654 - 936)	644 (644 - 870)	2653 * (1853 - 3372)	1692 † (1022 - 2292)
ROS	343 (313 - 498)	378 (320 - 563)	550 * (394 - 607)	544 (435 - 599)
VDR	7882 (6574 - 9687)	8394 (6475 - 10708)	7657 (6670 - 9420)	7556 (5699 - 9420)
CYP27	1201 (692 - 1461)	1207 (747 - 1521)	1396 (931 - 1532)	1170 (955 - 1521)
CYP24	439 (319 - 563)	363 (329 - 501)	342 (331 - 676)	375 (333 - 485)
Citocina (pg/mL)				
IL-6	3,8 (3,3 - 4,9)	3,6 (3,1 - 5,3)	39,3 * (28,3 - 45,3)	37,3 (28,8 - 42,5)
TNF-ALFA	2,2 (1,6 - 2,7)	2,3 (2,1 - 3,2)	3,9 * (3,2 - 4,7)	3,4 (2,9 - 4,8)
IL-10	45 (41 - 62)	47 (45 - 62)	61 * (53 - 64)	60 (56 - 73)
CATELICIDINA	0,44 (0,43 - 0,46)	0,43 (0,4 - 0,49)	0,58 * (0,51 - 0,65)	0,52 † (0,48 - 0,59)
MCP-1	11076 (7899 - 11948)	7336 (4820 - 8905)	14370 * (9117 - 16936)	7697 † (5940 - 10310)
Fator de transcrição (%)				
NF-KB	4,8 (1,6 - 12,2)	3,1 (1,7 - 3,4)	3,4 (2,1 - 5,5)	4,1 (2,3 - 6,4)

* SU \neq SN: p < 0,04

† SU+ 25(OH)D₃ \neq SU: p < 0,03

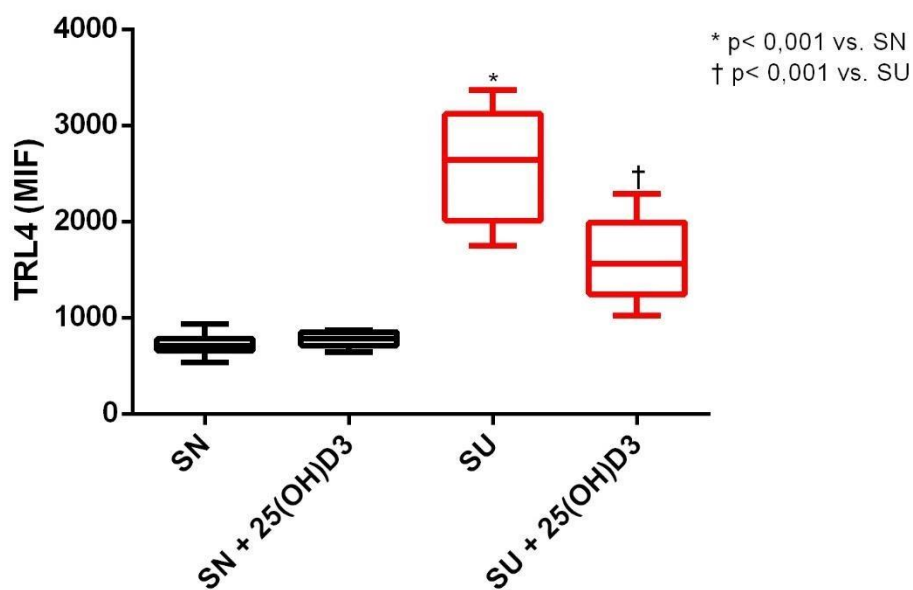


Figura 10: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão TLR-4, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U937. (n=8).

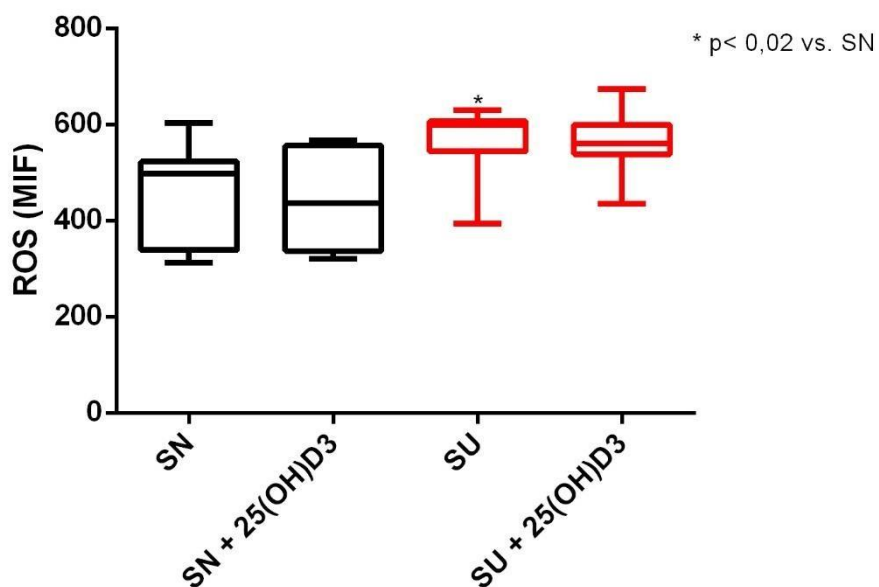


Figura 11: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão ROS, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937. (n=8).

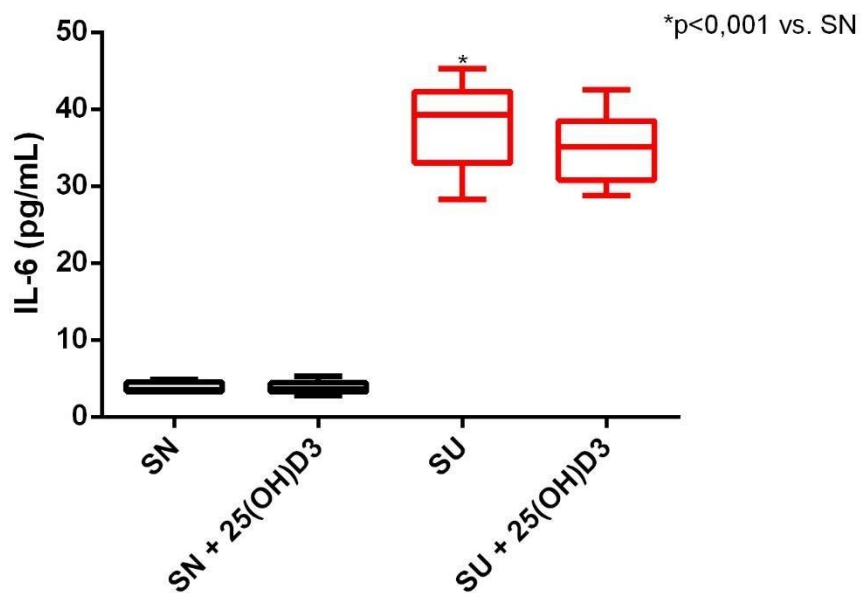


Figura 12: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão IL-6, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937. (n=8).

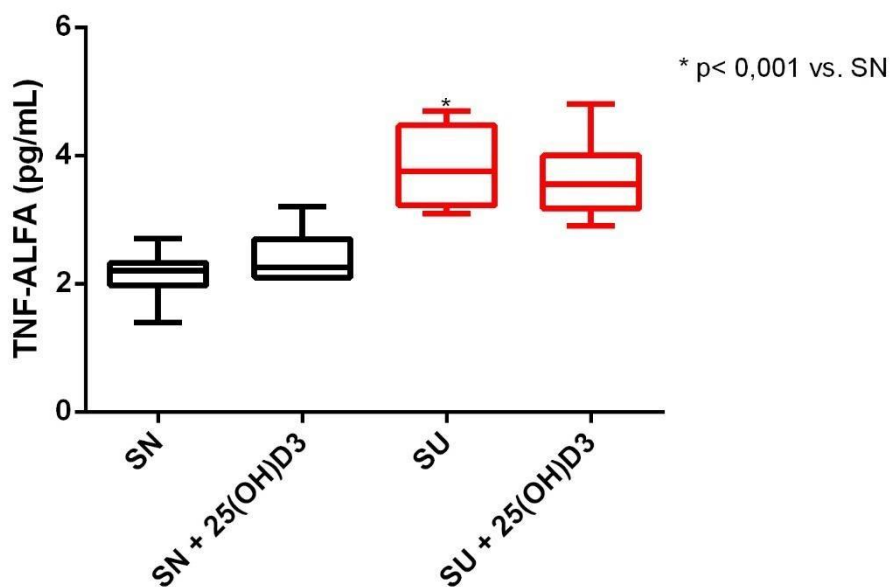


Figura 13: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão TNF α , frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U937. (n=8).

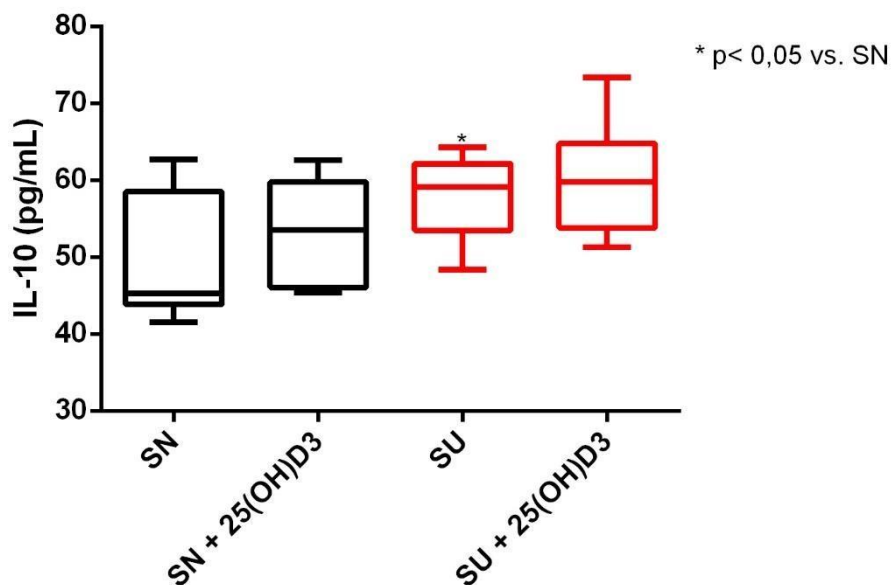


Figura 14: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão IL-10, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937. (n=8).

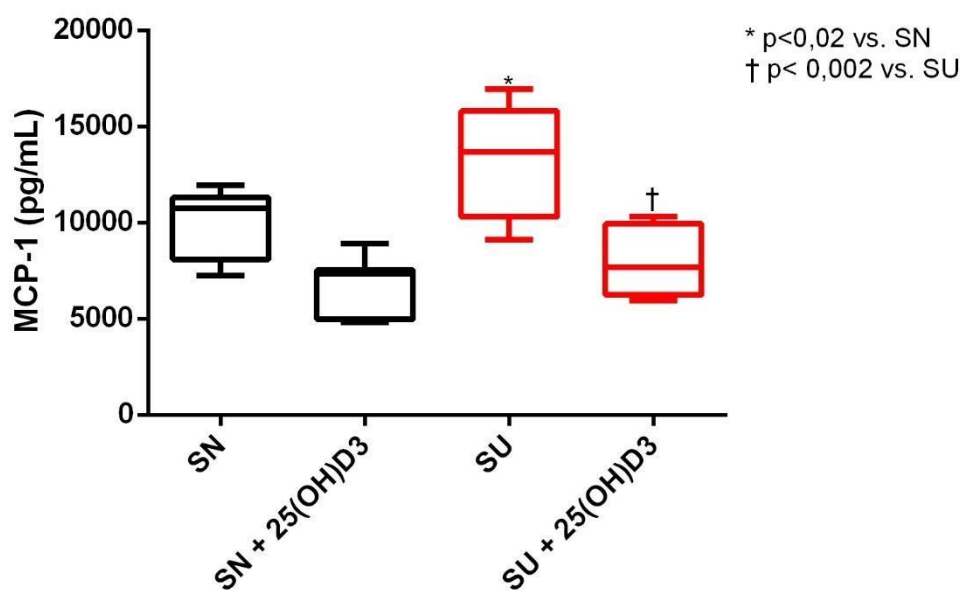


Figura 15: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão MCP-1, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U937. (n=8).

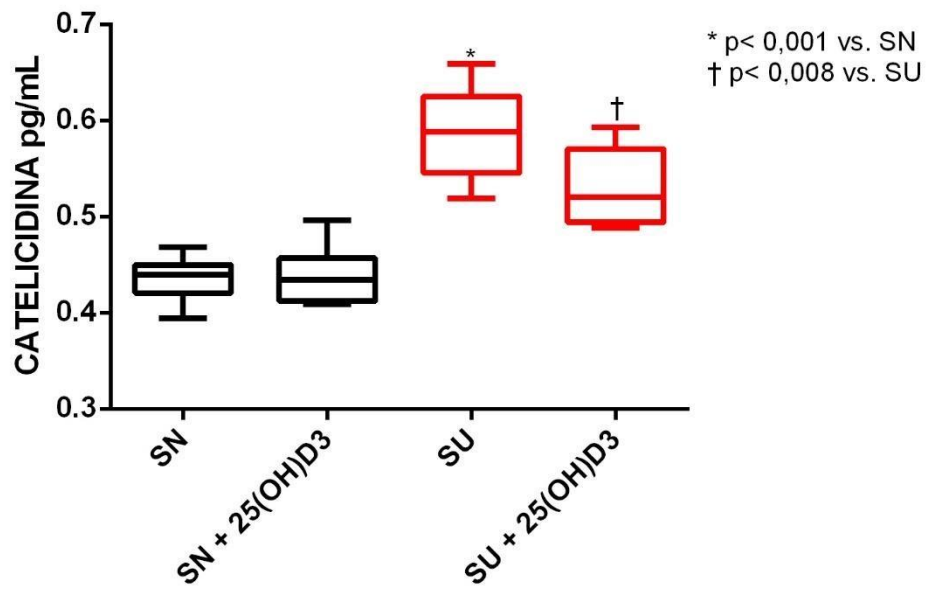


Figura 16: Efeito do tratamento da vitamina 25(OH)D₃ sobre a expressão Catelelicidina, frente ao insulto com soro normal e urêmico em monócitos de linhagem U-937. (n=8).

Tabela 4: Análises de correlação Pearson entre TR4, VDR, CYP24, CYP27, ROS, Catelicidina, IL-10, IL-6, TNF- α e MCP-1.

		TRL4	VDR	CYP24	CYP27	ROS	CATELICIDINA	IL-10	IL-6	TNF- α	MCP-1
TRL4	r		-0,2	0,05	0,2	0,5	0,8	0,4	0,8	0,7	0,6
	p		0,2	0,8	0,2	0,003	0,0001	0,01	0,0001	0,0001	0,002
VDR	r			-0,19	0,35	-0,08	-0,2	-0,2	-0,3	-0,1	0,1
	p			0,2	0,06	0,6	0,2	0,1	0,1	0,5	0,6
CYP24	r				-0,03	-0,4	0,05	-0,1	-0,007	0,6	-0,55
	p				0,9	0,05	0,7	0,5	0,9	0,7	0,8
CYP27	r					0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1
	p					0,2	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3
ROS	r						0,4	0,3	0,5	0,4	0,2
	p						0,01	0,1	0,003	0,01	0,3
CATELICIDINA	r							0,5	0,8	0,7	0,4
	p							0,001	0,001	0,0001	0,04
IL-10	r								0,6	0,6	0,2
	p								0,001	0,001	0,4
IL-6	r									0,8	0,4
	p									0,0001	0,03
TNF-α	r										0,5
	p										0,007
MCP-1	r										
	p										

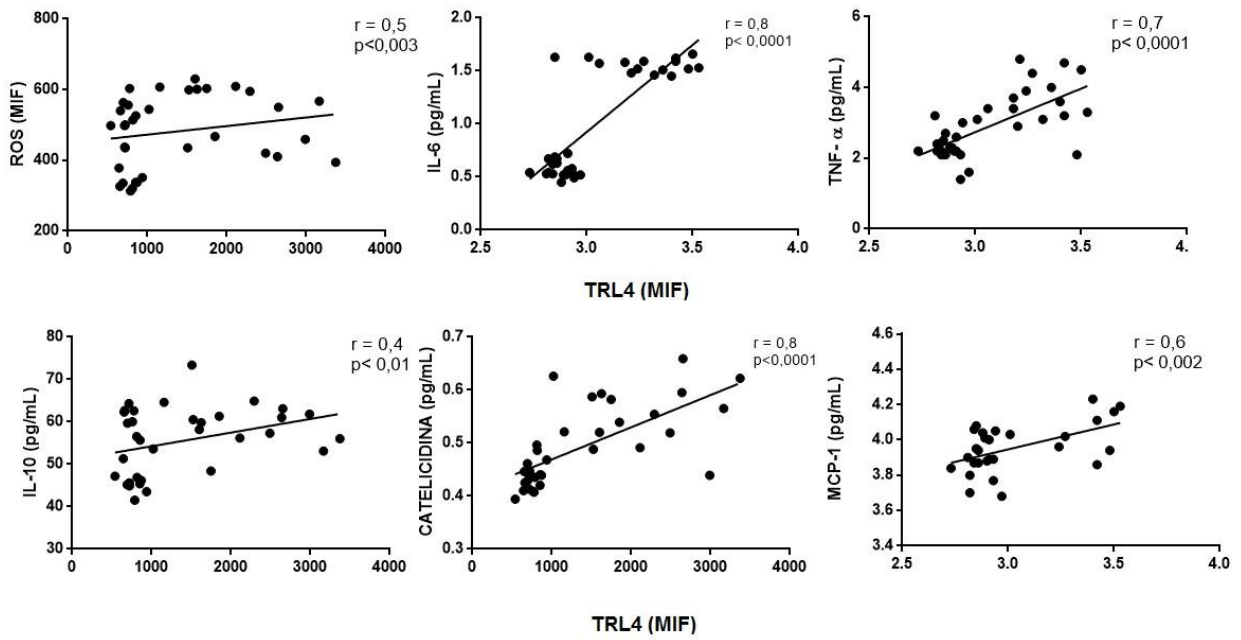


Figura 17: Correlação entre a expressão de TLR4 e ROS, IL-6, TNF- α , IL-10, Cateelicidina e MCP-1 em monócitos de linhagem U937.

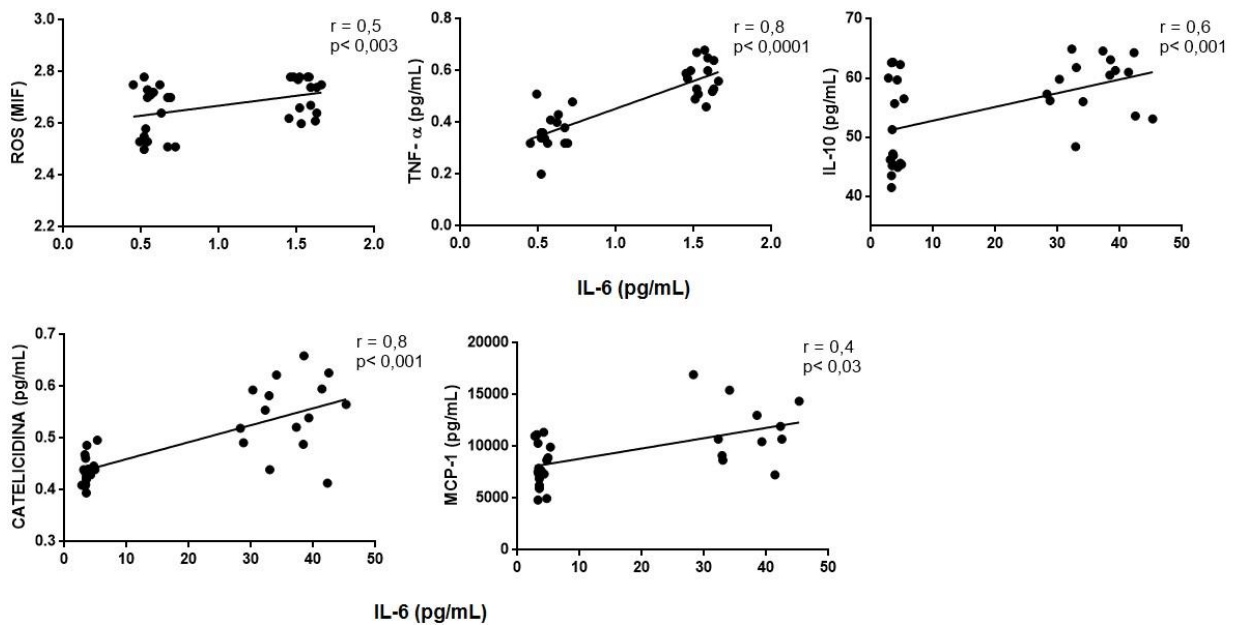


Figura 18: Correlação entre a expressão de IL-6 e ROS, TNF- α , IL-10, Cateelicidina e MCP-1 em monócitos de linhagem U937.

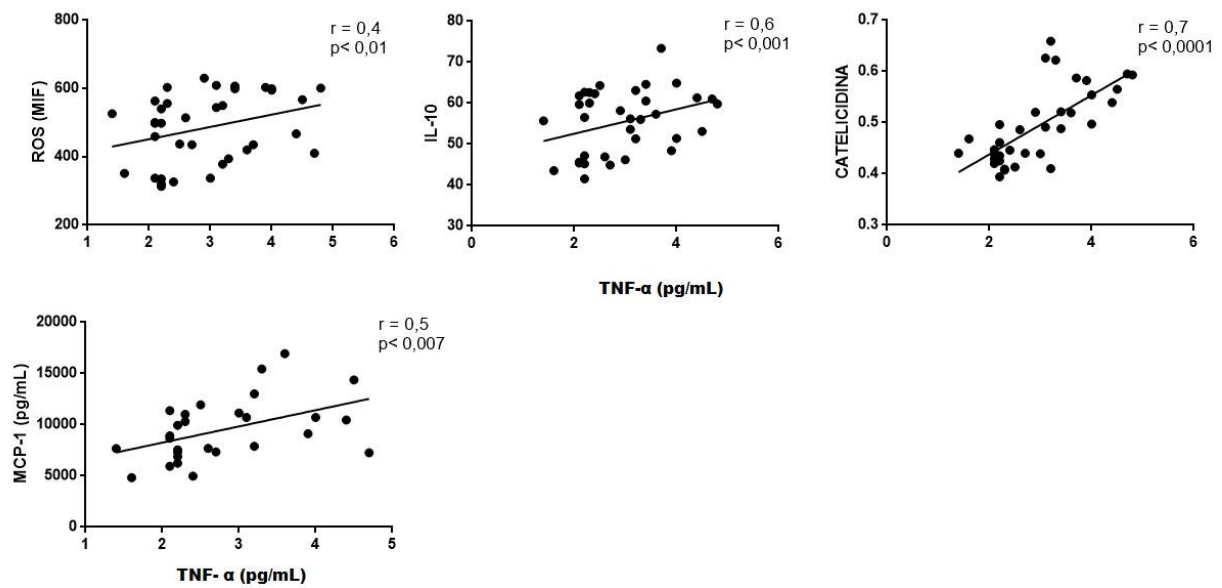


Figura 19: Correlação entre a expressão de TNF- α e ROS, IL-10, catelicidina e MCP-1 em monócitos de linhagem U937.

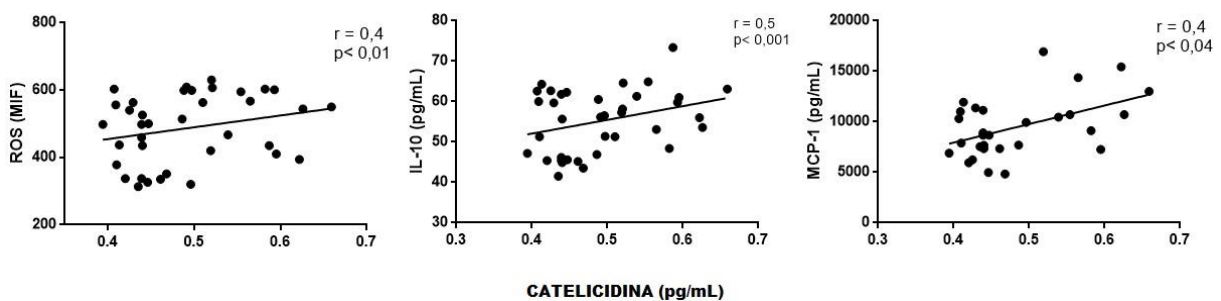


Figura 20: Correlação entre a expressão de Catelicidina e ROS, IL-10 e MCP-1 em monócitos de linhagem U937.

5 DISCUSSÃO

Neste presente estudo, avaliamos o efeito da suplementação de vitamina 25(OH)D₃, sobre parâmetros inflamatórios em monócitos submetidos ao ambiente urêmico, já que tem sido descrito que a vitamina 25(OH)D₃ possui propriedade imunomoduladora.

No nosso estudo utilizamos células que mimetizam os monócitos no ambiente urêmico, e tratamos com 25(OH)D₃. Observamos que a uremia leva a alteração de alguns marcadores inflamatórios, como maior expressão de TRL4, estresse oxidativo, IL-6, TNF- α , IL-10, catelicidina e MCP-1. Desta forma, reforçamos ideia, que o ambiente urêmico sinaliza monócitos a expressarem uma serie de mediadores inflamatórios (Wallquist et al., 2016).

Estes mediadores inflamatórios estão envolvidos na fisiopatologia de uma serie de comorbidades associadas a própria doença renal crônica, com distúrbios cardiovasculares, anemia e distúrbios mineral ósseo (David et al., 2016). Assim, se faz importante a busca de estratégias terapêuticas, seja ela medicamentosa ou não, para tentar minimizar a inflamação nestes pacientes; assim, nos últimos anos tem se investigado o papel da vitamina D.

Ando H et al., demonstrou que há diminuição da expressão de TRL4 em monócitos de paciente com doença renal crônica, sugerindo um ambiente mais susceptível a infecções. Por outro lado, Zikou et al., demonstrou que, monócitos de paciente com nefropatia diabética aumentam a expressão de TRL4 na DCR, sugerindo aumento da inflamação.

Quando tratamos com 25(OH)D₃, os monócitos frente a uremia, observamos redução de TRL4, sugerindo um possível mecanismo de regulação da inflamação. Na literatura não é bem descrito ação da vitamina D em monócitos

de paciente com DCR, mas paciente com pré-eclâmpsia, quando tratados com vitamina D diminuir a expressão de TRL4, diminuindo a expressão de IL6 e TNF- α , reduzindo a inflamação (Qian et al.).

Barisione et al., descreveu que o indúxil sulfato isolado, induz aumento de Ros e MCP-1 em monócitos de linhagem THP-1. Quando comparado com este estudo, o soro com o pool de toxinas uremias, também promoveu o aumento destes mediadores. Levando a um maior estado inflamatório, associados a lesão endotelial (STINGHEN et al.).

A suplementação com vitamina D foi capaz de reduzir a expressão de MCP-1 nos monócitos frente ao ambiente urêmico. Alvarez et al., observou este efeito em monócitos pacientes, quando foram suplementados com 50 000 UL por semana de colecalciferol, reduzindo a expressão de MCP-1 por 12 semanas. Mas este efeito não se manteve por um ano.

A suplementação com a 25(OH)D₃ em paciente pré - dialíticos, aumenta a produção de catelicidina por macrófagos peritoneais (Bacchetta et al.). Na uremia, a catelicidina se comportou como um marcador inflamatório, se correlacionando com TRL4, IL6, TNF- α e Ros. Após o tratamento com a vitamina D, houve redução da produção da catelicidina, sugerindo diminuição da inflamação.

Monócitos, quando insultados com soro urêmico, aumentam a produção de mediadores inflamatórios como IL-6 e TNF- α . Este aumento também foi observado por Meireles et al., em monócitos de pacientes com DCR em pré diálise, sugerindo um aumento da inflamação, levando a complicações cardiovasculares.

Neste modelo de células monocíticas a vitamina D não foi capaz de reduzir a expressão de IL-6 e TNF- α frente a uremia. Entretanto Meireles et al., demonstraram que o tratamento com 25(OH)D₃ é efetivo em diminuir esses mediadores inflamatórios frente a uremia. A diferença entre nosso trabalho e o destes autores, é que no estudo de Meireles et al. o tratamento foi realizado em monócitos de pacientes por um período de três meses; diferentemente do nosso estudo “in vitro” com tratamento por 24 horas.

Em relação aos mecanismos intracelulares da vitamina D, já que fornecemos o substrato, poderia haver melhorar na expressão de VDR e CYP27, conseqüentemente aumentar a quantidade de vitamina D intracelular. Entretanto nos monócitos originados da cultura de U937 não se mostraram alteradas. Por outro lado, Giffoni et al., demonstrou que linfócitos uma vez que tratado com vitamina D, ocorre aumento dos mecanismos intracelulares de vitamina D e conseqüentemente diminuição de citocinas pro-inflamatórias.

Entretanto, podemos concluir que a diminuição da expressão de TRL4, catelicidina e MCP-1 podem melhorar os mecanismos inflamatórios no paciente com doença renal ou pelo menos em relação aos monócitos. Mas se o efeito da diminuição destes mecanismos inflamatórios com a vitamina D têm impacto sobre desfechos como doenças cardiovasculares ou lesão vascular ou outras comorbidades, não pode ser extrapolado com este estudo “in vitro”. Outros futuros estudos devem ser conduzidos “in vivo” avaliando a médio e longo prazo o tratamento com vitamina 25(OH)D e seus desfechos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ando H , Shibuya Um, Tsuchiya K, Akiba T, Nitta K . Redução da expressão de Toll - como receptor 4 contribui para a resposta de citocinas prejudicada demonstrada em urêmicos pacientes. *Kidney Int.* 2006 julho; 70 (2): 358-62. Epub 2006 31 de maio.

A.M.M. Vaes E.M. Brouwer-Brolsma N.L. van der Zwaluw J.P. van Wijngaarden A.A.M. Berendsen N. van Schoo Food sources of vitamin D and their association with 25-hydroxyvitamin D status in Dutch older adults r N. van der Velde A. Uitterlinden P. Lips R.A.M. Dhonukshe-Rutten L.C.P.G.M. de Groot. [J Steroid Biochem Mol Biol.](#) 2016 Oct 21. pii: S0960-0760(16)30264-3. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.10.004.

Arnaud CD & Sanchez SD: Calcium and phosphorus. In: Ziegler EE & Jr. Filer LJ. Present knowledge in nutrition. Washington, DC. ILSI Press; 1996. p.245-55.

Alvarez JA , Zughair SM, Lei J, Hao L, Wasse H, Ziegler TR, Tangpricha V. Effects of high-dose cholecalciferol on serum markers of inflammation and immunity in patients with early chronic kidney disease. *Eur J Clin Nutr.* 2013 Mar;67(3):264-9. doi: 10.1038/ejcn.2012.217. Epub 2013 Jan 30.

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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbn/v36n2/01012800-jbn-36-02-0221.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2016.

Barisione Chiara, Silvano Garibaldi, Anna Lisa Furfaro, Mariapaola Nitti, Daniela Palmieri, Mario Passalacqua, Anna Garuti, Daniela Verzola, Alessia Parodi, Pietro Ameri, Paola Altieri, Patrizia Fabbi, Pier Francesco Ferrar, Claudio Brunelli, Violeta Arsenescu, Manrico Balbi, Domenico Palombo, Giorgio Ghigliotti. Moderate Increase of Indoxyl Sulfate Promotes Monocyte Transition into Profibrotic Macrophages . *PLoS One* 2016 29 de fevereiro; 11 (2): e0149276. doi: 10.1371 / journal.pone.0149276. eCollection de 2016.

Bacchetta J, Chun RF, Gales B, Zaritsky JJ, Leroy S, Wesseling-Perry K, Boregaard N, Rastogi A, Salusky IB, Hewison M. Antibacterial responses by peritoneal macrophages are enhanced following vitamin D supplementation. *PLoS One.* 2014 Dec 30;9(12):e116530. doi: 10.1371/journal.pone.0116530. eCollection 2014.

Bell NH: Vitamin D-endocrine system. *J Clin Invest* 76:1-6, 1985.

Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med*, 229::1136-1142, 2004.

Carvalho Junior, José Tarcísio Giffoni. EFEITO DA VITAMINA D NA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TOLL-LIKE RECEPTORS (TLR-7 e TLR9), EXPRESSÃO DE

IL-6 E INF- γ EM LINFÓCITOS B E T NA UREMIAxi p., 79 p. Tese de doutorado UNIFESP.

Charytan David M, Steven Fishbane, Jolanta malyszko, Peter A. Mccullough and David Goldsmith. Cardiorenal Syndrome and the Role of the Bone-Mineral Axis and Anemia. AJKD perspective 2015.

Capusa C, Gabriel Stefan, Simina Stancu, Andrea Llyes, Bicoleta Dorobantu e Gabriel Mircescu. Subclinical cardiovascular disease markers and vitamin D deficiency in non-dialysis chronic kidney disease patients. 2016 oct 1, 12(5):1015-1022.

Clemens TL, Holick MF, Krane SM. 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 57:1308-1310, 1983.

Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D – its role and uses in immunology. FASEB Journal 2001; 15:2579-85.

Descamps-Latscha B. The immune system in end-stage renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens.;2(6):883-91, 1993.

EUROPEAN UREMIC TOXINS WORK GROUP (EUTox). Disponível em: <<http://eutoxdb.odeesoft.com/index.php>>. Acesso em: 25 out. 2016.

LeFevre, Michael L., MD. Screening for Vitamin D Deficiency in Adults: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. Ann Intern Med. 2015;162:133-140. doi:10.7326/M14-2450

Flanagan JN, Young MV, Persons Ks. Vitamin D metabolism in human prostate cells: implications for prostatic cancer chemoprevention by vitamin D. Anticancer Res, 26:2567-2572, 2006.

Gerald Cohen and walter H. horrl. Immune Dysfunction in Uremia - An Update. Toxins 2012, 4, 962-990.

George Hajishengallis and John D. Lambris. More than complementing tolls: Complement toll like receptor synergy and crosstalk in innate immunity and inflammation. Wiley immunological reviews, doi: 10.1111/amr.12467, 2016.

Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, et al: Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. J Intern Med 247:260-268, 2000.

Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, et al: Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. Am J Nephrol 24:503-510, 2004.

Gomart AF, O'Kelly J, Saito T, Koeffler HP. Regulation of the CAMP gene by 1,25 (OH)₂ D in various tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 103:552-557, 2007.

Haag-Weber M, Horl WH. Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia. *Seminars in nephrology*. 16(3):192-201, 1996.

Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, et al: Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 22:142-146, 2003.

Holick MF. Vitamina D. In: Shils ME, Olson JA., Shike M., Ross AC. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. 9ª ed. São Paulo: Manole; 2003. p.351 - 68.

Holick MF: Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80:1678S-1688S, 2004.

Holick MF: Vitamin D for health and in chronic kidney disease. *Semin Dial* 18:266-275, 2005

Holick MF: Vitamin D deficiency in CKD: why should we care? *Am J Kidney Dis* 45:1119-1121, 2005.

Holick MF. Vitamin D: biosynthesis, metabolism, and mode of action. In: DeGroot LJ, ed. *Endocrinology*. vol 2. New York: Grune & Stratton; 1989. p. 902-26.

Holick MF: The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites. *J Nutr* 120 Suppl 11:1464-1469, 1990.

Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M, et al: Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialyzed patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 55:1019-1027, 1999.

Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437; 7-11, 2013.

K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 42:S1-201, 2003.

Kamen D, Aranow C. Vitamin D in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20:532-7.

Kayabasi H, Sit D, Kadiroglu AK, Kara IH, Yilmaz ME. Infectious complications in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 13(3):199-204, 2006.

Liu PT, Stenger S, Li H. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311:1770-1773, 2006

Qian L, Wang H, Wu F, Li M, Chen W, Lv L. Vitamin D3 alters Toll-like receptor 4 signaling in monocytes of pregnant women at risk for preeclampsia. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Oct 15;8(10):18041-9. eCollection 2015.

Meireles, Marion Schneider, Maria Ayako Kamimura, Maria Aparecida Dalboni, José Tarcísio Giffoni de Carvalho, Danilo Takashu Aoike, Lilian Cuppari. Effect of cholecalciferol and vitamin D-regulatory proteins in monocytes and on inflammatory markers in dialysis patients: A randomized controlled trial. *Clinical nutrition* (2016) 1-8.

Morton, AR & 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*. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p. 341-69.

Nosratola D. Vaziri. Effect of Uremia on Structure and Function of Immune System. *J Ren Nutr*, 22(1): 149-156.

Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect*, 4:361-372, 2002.

Reichel H, Koeffler HP, Norman AW: The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 320:980-991, 1989.

Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, 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* 82: 8213-17, 1985.

Sarnak MJ, Jaber BL: Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Int* 58:1758-1764, 2000.

Saudi J Kidney Dis Transpl. 20(2):254-9, 2009.

Sarnak MJ, Jaber BL. Pulmonary infectious mortality among patients with ESRD. *Chest*, 120:1883-1887, 2001.

Sela S, Shurtz-Swirski, Cohen-Mazor M, Mazor R, Chezar et al. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic lowgrade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *JAm Soc Nephrol*. 16 (8): 2431-8. 2005.

Pilz S, Verheyen N, Grübler MR, Tomaschitz A März W. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nat Rev Cardiol*. 2016 Jul;13(7):404-17. doi: 10.1038/nrcardio.2016.73. Epub 2016 May 6.

Stump WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y, DeLuca HF. Target cells for 1,25 (OH)₂ D in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. *Science* 206:1118-1190, 1979.

STINGHEN, A. E. M.; PECOITS-FILHO, R. Vascular na doença renal: para além da hipertensão. *Int. J. Hypertens.*, v. 2011, Article ID 232683, 2011.

Sorensen OF, Follin P, Johnsen AH. Human cathelicidin, hCAP18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*, 97:3951-9, 2001.

Theofan G, Nguyen AP, Norman AW: Regulation of calbindin-D28K gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 is correlated to receptor occupancy. *J Biol Chem* 261:16943-16947, 1986.

US Renal Data System (USRDS). USRDS 2007 Annual Data Report, 2007.

Usam Abdel Azim El Din, Mona Mansour Salem, Dina Ossama Abdulazim. Vascular calcification: When should we interfere in chronic kidney disease patients and how? *World Journal of Nephrology*, 2016 September 6; 5(5): 398-417.

Wallquist C, Mansouri L, Norrbäck M, Hylander B, Jacobson S.H, Lundahl J. Early Changes in Monocyte Adhesion Molecule Expression and Tumor Necrosis Factor- α Levels in Chronic Kidney Disease - A 5-Year Prospective Study. *Am J Nephrol* 2016;44:268-275 (DOI:10.1159/000449290)

Vanholder, R. C.; GLORIEUX, G. L. An overview of uremic toxicity. *Hemodial. Int.*, v. 7, n. 2, p. 156-161, 2003. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19379356. Acesso em: 25 out. 2016.

Yamshcilov A, Desai NS, Blumberg HM, Ziegler RZ, Tangpricha V. Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocr Pract* 15(5):438-449, 2009.

Yong Zhang, Donald Y. M. Leung, Brittany N. Richers, Yusen Liu, Linda K. Remigio, David W. Riches, and Elena Goleva. Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. *The Journal of Immunology*, 188: 2127–2135, 2012.

Zikou Xanthi, Constantinos C, Tellis, Kleopatra Rousouli, Evangelia Dounousi, Kostas C, Siamopoulos, Alexandros D, Tselepis. Differential Membrane Expression of Toll-Like Receptors and Intracellular Cytokine Induction in Peripheral Blood Monocytes of Patients with Chronic Kidney Disease and Diabetic Nephropathy. *Nephron Clin Pract*. DOI: 10.1159/000369815.

ANEXOS

Aprovação do comitê de ética em Pesquisa

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CNPq - R\$ 105095,00.

CRONOGRAMA: 60 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 21/11/2011 e 20/11/2012.

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

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

Atenciosamente,



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

12/0/11



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

Atenciosamente,

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