

## Soro urêmico inibe a expressão *in vitro* da quimiocina SDF-1: possível impacto da toxicidade urêmica na lesão endotelial

Uremic serum inhibits *in vitro* expression of chemokine SDF-1: impact of uremic toxicity on endothelial injury

### Autores

Vanessa Ribeiro<sup>1</sup>  
 Bruna Bosquetti<sup>1</sup>  
 Simone Mikosz Gonçalves<sup>2</sup>  
 Sérgio Gardano Elias Bucharles<sup>2</sup>  
 Lisienny Rempel<sup>1</sup>  
 Rayana Ariane Pereira Maciel<sup>1</sup>  
 Rodrigo Bueno de Oliveira<sup>3,4</sup>  
 Roberto Pecoits-Filho<sup>2</sup>  
 Andréa Emilia Marques Stinghen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Paraná.

<sup>2</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

<sup>3</sup> Universidade de São Paulo.

<sup>4</sup> Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Data de submissão: 13/03/2013.

Data de aprovação: 06/02/2014.

### Correspondência para:

Andréa Emilia Marques Stinghen.  
 Universidade Federal do Paraná.  
 Departamento de Patologia Básica.  
 Centro Politécnico, Jardim das Américas. Curitiba, PR, Brasil.  
 CEP: 81531-980.  
 E-mail: andreastinghen@ufpr.br  
 Tel: (41) 3361-1691.  
 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária.

DOI: 10.5935/0101-2800.20140021

### RESUMO

**Introdução:** A disfunção endotelial é importante na patogênese da doença cardiovascular (DCV) relacionada à doença renal crônica (DRC). *Stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) é uma quimiocina que mobiliza células endoteliais progenitoras (EPC) e em conjunto com a interleucina-8 (IL-8) podem ser usadas como marcadores de reparo e lesão tecidual. **Objetivo:** Neste trabalho, foi investigado o efeito do meio urêmico na expressão de SDF-1 e IL-8 *in vivo* e *in vitro*. **Métodos:** A inflamação sistêmica foi avaliada por meio da proteína C-reativa (PCR) e interleucina-6 (IL-6). IL-8 e SDF-1 foram avaliados por ELISA como marcadores de disfunção endotelial e reparo tecidual, respectivamente. Os estudos *in vitro* foram realizados em células endoteliais umbilicais humanas (HUVEC) expostas ao meio urêmico ou saudável. **Resultados:** Foram incluídos nesse estudo 26 pacientes em hemodiálise (HD) (17 ± 3 meses em diálise, 52 ± 2 anos, 38% homens e 11% diabéticos). As concentrações séricas de PCR, IL-6, SDF-1 e IL-8 foram 4,9 ± 4,8 mg/ml, 6,7 ± 8,1 pg/ml, 2625,9 ± 1288,6 pg/ml e 128,2 ± 206,2 pg/ml, respectivamente. Houve correlação positiva entre PCR e IL-6 ( $\rho = 0,57$ ;  $p < 0,005$ ) e entre SDF-1 e IL-8 ( $\rho = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ). Os resultados *in vitro* demonstraram que a expressão de SDF-1 pelas HUVEC após 6 horas de tratamento com meio urêmico é menor comparada ao tratamento com meio saudável ( $p < 0,05$ ). Após 12 horas de tratamento, ocorreu aumento de IL-8 quando as HUVECs foram expostas ao meio urêmico ( $p < 0,005$ ). **Conclusão:** Sugerimos que SDF-1 e IL-8 nos pacientes em HD podem ser usados para mensurar a extensão do dano e consequente ativação vascular na uremia.

**Palavras-chave:** endotélio vascular; insuficiência renal crônica; interleucina-8; quimiocina SDF-1; quimiocinas; toxicidade urêmica.

### ABSTRACT

**Introduction:** Endothelial dysfunction is important in the pathogenesis of cardiovascular disease (CVD) related to chronic kidney disease (CKD). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) is a chemokine which mobilizes endothelial progenitor cells (EPC) and together with interleukin-8 (IL-8) may be used as markers of tissue injury and repair. **Objective:** This study investigated *in vivo* and *in vitro* the effect of uremic media on SDF-1 and IL-8 expression. **Methods:** Systemic inflammation was assessed by C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6). IL-8 and SDF-1 were measured as markers of endothelial dysfunction and tissue repair, respectively, by ELISA. *In vitro* studies were performed on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) exposed to healthy or uremic media. **Results:** The study included 26 hemodialysis (HD) patients (17 ± 3 months on dialysis, 52 ± 2 years, 38% men and 11% diabetic). Serum concentrations of CRP, IL-6, SDF-1 and IL-8 were 4.9 ± 4.8 mg/ml, 6.7 ± 8.1 pg/ml, 2625.9 ± 1288.6 pg/ml and 128.2 ± 206.2 pg/ml, respectively. There was a positive correlation between CRP and IL-6 ( $\rho = 0.57$ ,  $p < 0.005$ ) and between SDF-1 and IL-8 ( $\rho = 0.45$ ,  $p < 0.05$ ). *In vitro* results showed that after 6 hours treatment, SDF-1 expression by HUVEC treated with uremic media is lower compared to cells treated with healthy media ( $p < 0.05$ ). After 12 hours of treatment there was an increase in IL-8 when HUVECs were exposed to uremic media ( $p < 0.005$ ). **Conclusion:** We suggest that SDF-1 and IL-8 in HD patients can be used to measure the extent of damage and subsequent vascular activation in uremia.

**Keywords:** chemokine CXCL12; chemokines; endothelium, vascular; interleukin-8; renal insufficiency, chronic; uremia.

## INTRODUÇÃO

Em estágios avançados de doença renal crônica (DRC), grande parte dos pacientes é acometida por complicações, na maioria das vezes correlacionadas às doenças cardiovasculares (DCV), incluindo calcificação vascular e disfunção endotelial.<sup>1,2</sup> Acredita-se que a alta concentração de toxinas urêmicas circulantes nesta população pode desencadear uma resposta inflamatória sistêmica e vascular e, desta forma, induzir a disfunção endotelial,<sup>3</sup> fator reconhecidamente associado ao desenvolvimento e progressão da DCV.

Estudos desenvolvidos por nosso grupo demonstram que marcadores plasmáticos de ativação endotelial tais como *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1) estão aumentados e intimamente associados a outros marcadores de inflamação sistêmica nos estágios mais avançados de DRC, como PCR e IL-6. Além disso, estudos *in vitro* demonstram que a exposição de células endoteliais ao ambiente urêmico aumenta a expressão de MCP-1, interleucina-8 (IL-8) e VCAM-1, sugerindo uma relação entre lesão vascular, inflamação sistêmica e toxicidade urêmica.<sup>4</sup>

As células endoteliais têm papel importante na regulação do tônus vascular, homeostase, pressão sanguínea e remodelamento vascular, e a habilidade do endotélio em sintetizar e liberar óxido nítrico (NO) constitui um importante regulador destes processos fisiológicos.<sup>5</sup> Células endoteliais progenitoras derivadas da medula óssea (EPC) constituem um sistema endotelial endógeno de reparo, protegendo o endotélio do desenvolvimento de aterosclerose. Evidências sugerem que na uremia ocorra uma diminuição na disponibilidade e função das EPC, levando à perda da capacidade de reparo e regeneração do endotélio, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento de DCV.<sup>6</sup>

A *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) é uma quimiocina de ação pleiotrópica e expressa por vários tecidos, tais como rins, medula óssea, coração, fígado, timo, baço, músculo liso e esquelético, células endoteliais e macrófagos.<sup>7-9</sup> Originalmente, a ação da SDF-1 foi relacionada à estimulação de linfócitos T, linfócitos B e monócitos.<sup>10</sup> Entretanto, descobriu-se que esta quimiocina desempenha também papel fundamental na patofisiologia de processos como inflamação, angiogênese, cicatrização e agregação plaquetária.<sup>9,11-13</sup>

Estudos demonstram que quimiocinas como a SDF-1 e IL-8 possivelmente facilitem a migração de EPC para o endotélio lesionado. De fato, a SDF-1 tem sido descrita como indutora de neovascularização e em conjunto com a IL-8 responsável pelo recrutamento de EPC para o tecido isquêmico em DCV, tais como infarto agudo do miocárdio.<sup>14,15</sup> Recentemente, alguns trabalhos vêm demonstrando que na DRC níveis plasmáticos de SDF-1 estão aumentados, correlacionando-se com níveis diminuídos de EPCs.<sup>16</sup> Estes achados apontam para um possível papel benéfico da SDF-1 no reparo da lesão endotelial.

A partir deste panorama, hipoteticamente sugerimos que, na DRC a exposição constante do endotélio às toxinas urêmicas, com consequente dano vascular, leve a liberação de quimiocinas envolvidas na sinalização e reparo tecidual. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos do soro urêmico na expressão *in vitro* de SDF-1 e IL-8 e estudo clínico envolvendo pacientes com DRC em estágio 5 em hemodiálise (HD).

## MÉTODOS

### SELEÇÃO DE PACIENTES

Os pacientes objetos do estudo foram selecionados a partir de uma amostra populacional que contava com 104 pacientes renais crônicos em tratamento por HD de um único centro de terapia renal substitutiva na cidade de Curitiba - PR. Após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão listados abaixo, foram finalmente selecionados 26 pacientes para participarem do estudo. Todos os pacientes estavam em programa crônico de HD e realizavam três sessões de HD por semana (3,5 a 4 horas por sessão), utilizando membranas de diálise de polissulfona, e dialisato com concentração final de bicarbonato de sódio de 32 mEq/L e cálcio 3,5 mEq/L. Foram excluídos pacientes em programa de diálise peritoneal, pacientes que realizavam sessões de HD por meio de cateter venoso central como acesso vascular, portadores de doença infecciosa ou inflamatória crônica grave, doenças malignas, doença hepática ativa, doenças autoimunes, uso de imunossuppressores ou anti-inflamatórios nos últimos 3 meses antes da inclusão no estudo, e aqueles que apresentaram evento cardiovascular (i.e., infarto agudo do miocárdio, angina instável, acidente vascular cerebral ou revascularização do miocárdio) 3 meses antes do início do estudo.

Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado aceitando participar do presente estudo e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Paraná (registro CEP/SD: 974.079.10.07). Para efeito de comparação, utilizou-se como grupo controle amostras de soro de indivíduos adultos saudáveis (n = 10).

#### COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Durante o recrutamento dos pacientes, foram coletados os dados clínicos e demográficos por meio da entrevista e exame físico realizados no dia da avaliação inicial e análise dos registros do prontuário médico. Os seguintes dados foram utilizados: idade, sexo, raça, comorbidades, etiologia primária de DRC, tempo de diálise, % de pacientes em uso de estatina, vitamina D e aspirina.

#### COLETA DE DADOS LABORATORIAIS

As amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes da primeira sessão de HD da semana, centrifugadas e estocadas a -80 °C. No início do estudo, foram mensurados os níveis séricos de colesterol total, colesterol frações LDL e HDL, triglicérides, hemoglobina, albumina, cálcio total, fósforo, hormônio da paratireoide (PTH), fosfatase alcalina e PCR em todos os pacientes.

#### EXPERIMENTOS *IN VIVO*

##### NÍVEIS SÉRICOS DE MARCADORES DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, SDF-1 E IL-8

A avaliação de proteína-C reativa (PCR) foi realizada pelo método imunoturbidimétrico automatizado de ultrasensibilidade (ADVIA Sistema Química 1200, Siemens Healthcare, Deerfield, Illinois, EUA), com limite de detecção de 0,5 a 15 mg/L. A dosagem de IL-6 foi realizada pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) *sandwich* (R&D Systems, Minneapolis, USA), com limite de detecção do método de 0,5 a 15 mg/L. As dosagens de SDF-1 foram realizadas utilizando-se o método de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA), com limite de detecção do método de 1,0 pg/ml a 47 pg/ml. As absorvâncias foram detectadas em leitor de microplaca (Tecan, North, Caroline, USA) a 570 nm. As dosagens de IL-8 foram realizadas utilizando-se o método de ELISA *in house* (anticorpos R&D Systems, Minneapolis, USA), com limite de detecção de 31,25

a 2.000 pg/ml. As absorvâncias foram detectadas em leitor de microplaca (Tecan, North, Caroline, USA) a 570 nm. Os coeficientes de variação intra e interensaio para IL-8 foram de 8,0% e 7,7%, respectivamente.

#### EXPERIMENTOS *IN VITRO*

##### EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS HUMANAS DE VEIA DE CORDÃO UMBILICAL (HUVEC)

Os cordões umbilicais foram coletados logo após o nascimento e processados dentro de 24 horas. As células endoteliais foram extraídas e cultivadas de acordo com Jaffe *et al.*<sup>17</sup> adaptado.<sup>4</sup> Brevemente, o cordão umbilical foi canulado, lavado com tampão salino fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich, USA) e perfundido com colagenase tipo II (Sigma-Aldrich, USA) a 0,3% em PBS por 7 minutos, a 37 °C. A suspensão foi centrifugada e ressuspendida e o pellet ressuspendido em meio 199 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado com glutamina 2 mM (Gibco, Grand Island, NY, USA), soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, USA) 10%, heparina 5.000 UI/ml (Sigma-Aldrich, USA), hidrocortisona 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, USA), *endothelial cell growth supplement* 15 g/ml (Sigma-Aldrich, USA), *β-endothelial cell growth factor human* 25 µg/ml (Sigma-Aldrich, USA), penicilina 10.000 UI/ml e estreptomicina 50 µg/ml (Gibco, Grand Island, NY, USA). As HUVEC foram cultivadas até subconfluência em frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> pré-tratados com gelatina 1% (Sigma-Aldrich, USA) e incubados a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram utilizadas para os experimentos entre as passagens 3 e 4, quando então foram tripsinizadas com tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, USA) e subcultivadas em placas de 96 poços (10.000 células/ml/poço) pré-tratadas com gelatina 1% nas mesmas condições descritas acima. A origem endotelial foi confirmada pela morfologia celular e através de imunocitoquímica com o anticorpo monoclonal anti-CD31 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca).

##### CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS COM SORO HUMANO

Para preparo do meio urêmico e do meio saudável, foram utilizados os soros dos pacientes/indivíduos na forma de *pool*. Para tanto, volumes iguais de soro de todos os pacientes da amostra (i.e., n = 26) formaram um único *pool* urêmico, assim como volumes iguais de soro de indivíduos saudáveis (i.e., n = 10) formaram um único *pool* controle.

As HUVEC foram inicialmente cultivadas em placas de 96 poços até atingirem subconfluência quando, então, foram mantidas por um período de 12 horas em meio de supressão (meio 199 acrescido de 3% de SFB), sem a presença de fatores de crescimento. Posteriormente, foram incubadas com o meio saudável (meio 199 + 10% de *pool* saudável) e ou meio urêmico (meio 199 + 10% de *pool* urêmico). Foram realizados cinco experimentos em duplicata. Os sobrenadantes foram coletados nos tempos: 0, 6 e 12 horas de cultivo e em seguida estocados a -80 °C até o processamento. A média de cada duplicata foi utilizada nas análises estatísticas.

#### ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRYPAN

O número de células endoteliais foi determinado pela contagem direta em câmara de Neubauer pelo método de exclusão de azul de Trypan (Sigma-Aldrich, USA). Basicamente, após cultivo as células endoteliais foram tratadas com meio urêmico e meio saudável nas mesmas condições descritas acima, tripsinizadas e ressuspensas em 1 ml de meio 199. Em seguida, 10 µL da suspensão foram acrescidos de 10 µL de solução de azul de Trypan 0,4%, quando, então, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia de luz (Nikon, Tokyo, Japan). As células que assimilavam o corante eram consideradas inviáveis e o número de células viáveis era calculado por subtração do número de células inviáveis do total de células contadas.<sup>18</sup>

#### ENSAIO DE VIABILIDADE PELO 3-[4,5-DIMETIAZOL-2YL]-2,5-IFENILTETRAZOLIUM BROMIDE (MTT)

Neste ensaio as HUVEC (10<sup>4</sup> células/ml/poço) foram cultivadas em placa de cultivo de 96 poços e submetidas aos mesmos tratamentos anteriormente descritos com volume final de tratamento de 100 µL/poço. O MTT (Sigma-Aldrich, USA) foi solubilizado em PBS na concentração de 5 mg/ml. Posteriormente, a solução de MTT foi diluída na proporção de 1:10 com meio MEM 199 (concentração final de 0,5 mg/ml), e adicionada às células (100 µL/poço). A placa foi incubada por 4 horas a 37 °C. Após este período, 100 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) foram adicionados em cada poço e a absorbância foi mensurada em 570 nm.<sup>19</sup>

#### NÍVEIS DE SDF-1 E IL-8 EM SOBRENADANTE CELULAR

As amostras de sobrenadante foram coletadas nos tempos: 0, 6 e 12 horas de incubação e estocadas a -80 °C até o processamento. Os níveis de SDF-1 e IL-8 foram mensurados por ELISA como descrito acima.

#### ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística foi realizada usando os pacotes estatísticos para *Windows JMP* versão 7.0 (SAS *Institut Inc*, USA) e *SigmaStat* versão 3.5 (*Systat software, Inc.*, Germany). Os dados foram apresentados como médias ± erro padrão médio (EPM) ou mediana (percentis 25 e 75) para dados clínicos e laboratoriais de cada parâmetro analisado, conforme simetria ou não dos dados. Os resultados foram analisados pelo teste *t* ou *one-way* ANOVA para dados paramétricos e Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para comparações múltiplas entre os grupos, foi utilizado o teste de ANOVA on Rank's seguido pelo teste de Dunnett. As análises de correlações foram efetuadas pelo teste de *Spearman* ( $\rho$ ). Um  $p \leq 0,05$  foi considerado como significativo.

#### RESULTADOS

As principais características clínicas e laboratoriais dos 26 pacientes incluídos no estudo estão descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

A média de idade foi de  $52 \pm 2$  anos, sendo 38% de homens. Nefroesclerose hipertensiva foi a principal causa de DRC, e todos os pacientes da amostra eram hipertensos. Somente 11% dos pacientes apresentavam o diagnóstico de *diabetes mellitus* como comorbidade associada. Os pacientes estavam em tratamento com estatinas, aspirina e anti-hipertensivos em 30%, 43% e 100% dos casos, respectivamente.

A mediana dos valores observados para cálcio total, PTH, kt/V, albumina e colesterol total encontrou-se dentro dos valores de referência para pacientes com DRC estágio 5.

#### EXPERIMENTOS IN VIVO

##### MARCADORES DE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E QUIMIOCINAS

As medianas das concentrações séricas dos marcadores de inflamação sistêmica PCR e IL-6 foram, respectivamente,  $4,9 \pm 4,8$  mg/ml e  $6,7 \pm 8,1$  pg/ml. Houve correlação positiva entre PCR e IL-6 ( $\rho = 0,57$ ,  $p < 0,005$ ). Para SDF-1 e IL-8, as concentrações foram, respectivamente,  $2.625,9 \pm$

**TABELA 1** PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

| Parâmetros                    |        |
|-------------------------------|--------|
| Número de pacientes           | 26     |
| Idade (anos)                  | 52 ± 2 |
| Sexo (% homens)               | 38     |
| Raça (% caucasianos)          | 81     |
| Comorbidades (%)              |        |
| <i>Diabete mellitus</i>       | 11     |
| Doenças cardiovasculares      | 15     |
| Hipertensão                   | 100    |
| Doença renal primária (%)     |        |
| Nefrosclerose hipertensiva    | 30     |
| Nefropatia diabética          | 11     |
| Glomerulopatia crônica        | 50     |
| Outras                        | 9      |
| Vitamina D (% de uso)         | 45     |
| Estatinas (% de uso)          | 30     |
| Aspirina (% de uso)           | 43     |
| Anti-hipertensivos (% de uso) | 100    |
| Tempo de diálise (meses)      | 17 ± 3 |

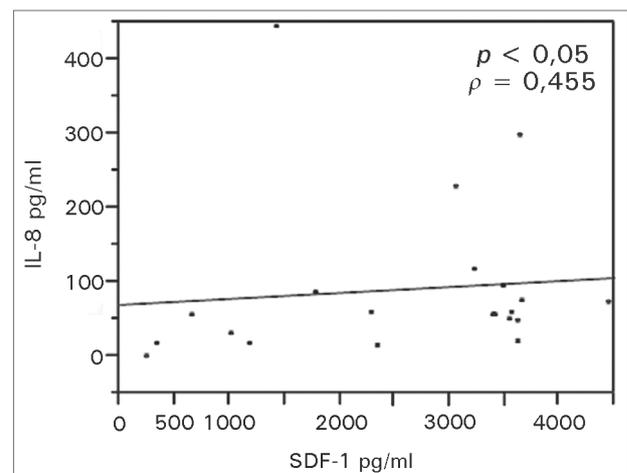
Valores expressos em média ± DP.

**TABELA 2** PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

| Parâmetros                |                   |
|---------------------------|-------------------|
| Colesterol (mg/dL)        | 180 (108-248)     |
| Colesterol LDL (mg/dL)    | 106 (42-176)      |
| Colesterol HDL (mg/dL)    | 44 (21-80)        |
| Triglicérides (mg/dL)     | 150 (73-240)      |
| Hemoglobina (g/dL)        | 11,5 (10,8-12,0)  |
| Albumina (g/dL)           | 3,9 (3,3-4,7)     |
| Cálcio (mg/dL)            | 9,0 (7,6-10,3)    |
| Fósforo (mg/dL)           | 6,7 (4,1-9,6)     |
| PTH (pg/ml)               | 446 (11-1.666)    |
| Fosfatase alcalina (UI/L) | 149 (65-602)      |
| kt/V                      | 1,5 (1,1-1,8)     |
| PCR (mg/ml)               | 4,9 ± 4,8         |
| IL-6 (pg/ml)              | 6,7 ± 8,1         |
| IL-8 (pg/ml)              | 128,2 ± 206,2     |
| SDF-1 (pg/ml)             | 2.625,9 ± 1.288,6 |

Valores expressos em média ± EPM ou mediana (percentis 25 a 75). LDL: *Low density lipoprotein*; HDL: *High density lipoprotein*; PTH: Hormônio paratiroideo; PCR: Proteína-C reativa; IL-6: Interleucina-6; IL-8: Interleucina-8; SDF-1: *Stromal cell-derived factor-1*.

1.288,6 pg/ml e 128,2 ± 206,2 pg/ml. A correlação entre as duas quimiocinas está apresentada na Figura 1 ( $\rho = 0,455$ ,  $p < 0,05$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre as medianas das concentrações séricas de SDF-1 e IL-8 considerando as variáveis sexo, raça, doença renal primária e comorbidades. (dados não mostrados). Para o grupo controle, os valores séricos de SDF-1 e IL-8 foram 1.996,6 ± 259,7 pg/ml e 55,1 ± 33,9 pg/ml, respectivamente. Não houve diferença significativa entre os níveis séricos destas duas quimiocinas entre os pacientes em HD e o grupo controle.

**Figura 1.** Correlação entre os níveis séricos de IL-8 e SDF-1 em pacientes urêmicos em tratamento hemodialítico. IL-8: Interleucina 8; SDF-1: *Stromal cell-derived factor-1*.

#### EXPERIMENTOS *IN VITRO*

##### ENSAIO DE VIABILIDADE PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO COM AZUL DE TRYPAN

A análise da viabilidade celular através do método de exclusão pelo Azul de Trypan mostrou 95% de viabilidade para as HUVEC sem tratamento (grupo controle, células cultivadas com meio normal), 90% de viabilidade para as HUVEC tratadas com meio saudável e 84% de viabilidade para as células tratadas com meio urêmico. Não houve diferença significativa entre os tratamentos quando comparados ao grupo controle.

##### ENSAIOS DE VIABILIDADE PELO MTT

A análise da viabilidade celular por meio do MTT não mostrou diferenças significativas (teste *t* ou *one-way ANOVA*) entre os tratamentos com meio de cultivo normal, meio saudável ou meio urêmico para todos os tratamentos aplicados.

EXPRESSÃO *IN VITRO* DE SDF-1 E IL-8

A Figura 2 mostra o efeito do ambiente urêmico na expressão *in vitro* de SDF-1 (A) e IL-8 (B) (pg/ml) pelas HUVEC. Após 6 horas de tratamento, há uma menor expressão de SDF-1 quando as HUVEC são tratadas com meio urêmico ( $p < 0,05$ ) em comparação ao tratamento com meio saudável (teste *t* ou *one-way* ANOVA). Para IL-8 após 12 horas de tratamento, há um aumento significativo de IL-8 quando as HUVEC são tratadas com meio urêmico em comparação ao tratamento com meio saudável ( $p < 0,005$ ).

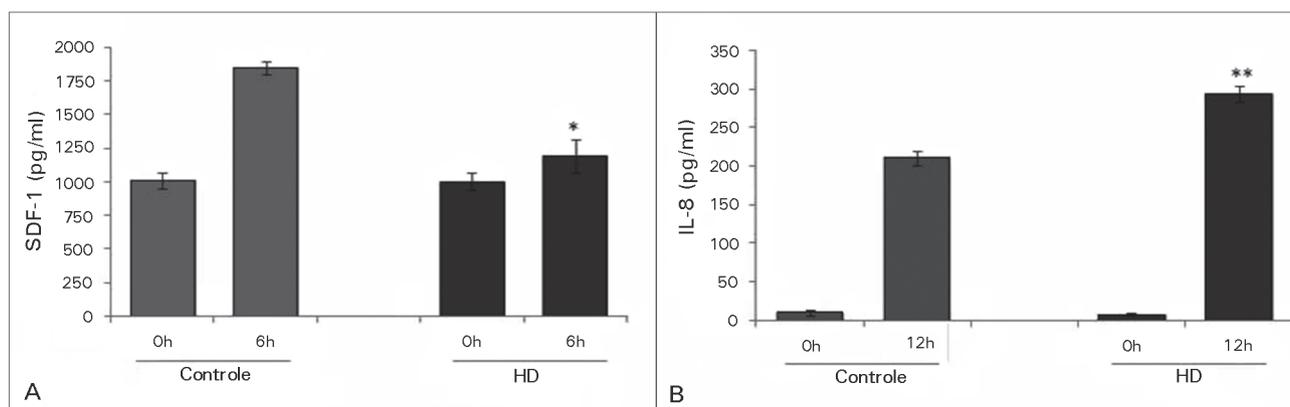
## DISCUSSÃO

Durante a última década, vários trabalhos vêm demonstrando a ação das toxinas urêmicas como efectoras da disfunção endotelial, contribuindo para a progressão da DCV nos pacientes com DRC.<sup>20-22</sup> Pacientes com DRC apresentam um desequilíbrio na vasodilatação endotélio dependente e níveis circulantes aumentados de marcadores de disfunção endotelial e estresse oxidativo. Além disso, apresentam um balanço anormal entre lesão celular ocasionada pela toxicidade urêmica e reparo tecidual (representado pela diminuição de migração de EPC), ocasionando grave injúria endotelial.<sup>23</sup> Os principais achados do presente trabalho demonstram níveis séricos aumentados das quimiocinas IL-8 e SDF-1, marcadores de lesão e regeneração tecidual respectivamente, em pacientes em HD. De forma oposta, demonstrou-se, ainda, que *in vitro*, quando células endoteliais são tratadas com soro urêmico, apresentam expressão diminuída de SDF-1, porém, aumentada de IL-8, sugerindo uma possível ligação entre ativação vascular e reparo tecidual nestes pacientes.

A população incluída neste estudo compreendia pacientes em HD, com glomerulopatia crônica, nefrosclerose e nefropatia diabética como principais causas de DRC, e alta prevalência de fatores de risco para DCV, tais como hipertensão. Quanto ao uso de medicamentos, 45% estavam em uso de vitamina D, 30% em uso de estatinas, 43% em uso de aspirina e 100% em uso de anti-hipertensivos. Não foram observadas diferenças significativas entre a população estudada e outros estudos prévios desenvolvidos em pacientes em HD,<sup>24,25</sup> excetuando-se a baixa prevalência de *diabetes mellitus* e dislipidemia observada em nosso estudo. Os níveis séricos de marcadores de inflamação sistêmica, tais como PCR e IL-6, estavam aumentados, e também foram similares aos encontrados em outros estudos, demonstrando que a inflamação sistêmica é um achado comum nos pacientes em HD.<sup>26,27</sup> Ainda, os níveis das quimiocinas SDF-1 e IL-8 também estavam em concordância com outros estudos prévios.<sup>4,16,28,29</sup>

O endotélio vascular tem sido reconhecido como um órgão endócrino complexo, que regula diversas funções fisiológicas, tais como tônus vascular, migração e crescimento de células de músculo liso, permeabilidade vascular a solutos e células sanguíneas, regulação da homeostase, entre outras funções.<sup>30,31</sup> A disfunção endotelial pode ser mais amplamente definida como um estado pró-inflamatório e pró-trombótico<sup>32</sup> e é um achado frequente nos pacientes com DRC em virtude da constante exposição do endotélio a toxinas urêmicas, sendo considerada como precursora na patogênese da aterosclerose e doença arterial obstrutiva<sup>33,34</sup> Desta forma, pode-se dizer que nestes pacientes tais patologias são intimamente relacionadas, mas,

**Figura 2.** A: Expressão *in vitro* de SDF-1 (pg/ml) pelas HUVEC antes e após (0 e 6 horas) tratamento com meio urêmico (HD). \*  $p < 0,05$  - Controle 6 horas vs. HD 6 horas (teste *t*); B: Expressão *in vitro* de IL-8 (pg/ml) pelas HUVECs antes e após (0 e 12 horas) tratamento com meio urêmico (HD). \*  $p < 0,005$  - Controle 12 horas vs. HD 12 horas (teste *t*).



sobretudo, mutuamente afetadas uma pela outra.<sup>35</sup> De fato, em resposta a injúria celular, recentemente demonstramos em estudos *in vivo* e *in vitro*, que a exposição do endotélio ao plasma urêmico em tempo e níveis de uremia dependentes, aumenta a expressão de MCP-1, VCAM-1 solúvel (sVCAM-1) e IL-8, sugerindo uma ligação entre ativação vascular e toxicidade urêmica.<sup>4</sup> Alguns estudos, ainda, sugerem que em pacientes com DRC, ocorra uma resposta angiogênica deficiente em virtude da diminuição da produção de células tronco mesenquimais mediada pela quimiocina SDF-1, *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *VEGF receptor 1* (VEGFR1).<sup>36</sup>

O SDF-1 é um importante fator angiogênico liberado na circulação em processos inflamatórios e responsável pela mobilização de EPC da medula óssea para a circulação. O presente estudo demonstra que em pacientes em HD os níveis séricos de SDF-1 estão aumentados quando comparados a controles saudáveis, correlacionando-se positivamente com a IL-8. Tal correlação ocorre em paralelo ao aumento dos marcadores de inflamação sistêmica PCR e IL-6. Em concordância com nossos dados, Jie *et al.*,<sup>6</sup> em estudos envolvendo pacientes com diferentes graus de DRC, sugeriram que mesmo nos estágios iniciais de DRC, a regeneração vascular é deficiente, com níveis de células musculares progenitoras aumentadas de acordo com o declínio da função renal; isto se dá concomitantemente a um aumento nos níveis plasmáticos de SDF-1. Ainda trabalhos demonstram que após transplante renal os níveis de EPC se restabelecem em paralelo ao declínio dos níveis de SDF-1, demonstrando claramente o papel da uremia na injúria celular e na regulação nos níveis de SDF-1.<sup>37</sup>

No que se refere à ativação da resposta vascular e produção de IL-8, nossos dados *in vitro* confirmam os resultados *in vivo*, e verificamos que as células endoteliais expostas ao ambiente urêmico respondem aumentando os níveis desta quimiocina, confirmando a uremia como efetora da injúria celular. De forma oposta, os resultados *in vitro* demonstram que a expressão de SDF-1 é diminuída em células endoteliais após exposição ao meio urêmico quando comparada às células expostas ao meio saudável, sugerindo que a uremia atue de certa forma inibindo a expressão desta quimiocina. De fato, Noh *et al.*,<sup>36</sup> verificaram a interferência da uremia na transcrição do gene CXCL12 (SDF-1), inibindo a síntese de RNA mensageiro (mRNA)

e conseqüentemente diminuindo a produção da proteína SDF-1. Ainda, Zaza *et al.*<sup>38</sup> observaram em estudos genômicos em células polimorfonucleares (PMN) de pacientes em HD, que a expressão do gene CXCL12 está diminuída, o que poderia resultar em acúmulo de células PMN senescentes na circulação.

Nossos resultados *in vitro* demonstram que após 6 horas de exposição ao meio urêmico as células endoteliais apresentam níveis de SDF-1 diminuídos quando comparados às células tratadas com meio saudável. Em parte, este resultado pode ser explicado em virtude da SDF-1 ser produzida também por outras células, tais como células de medula óssea, coração, fígado, timo, baço, músculo liso e esquelético, macrófagos e rins, além de células endoteliais, atuando de forma pleiotrópica;<sup>7,8,39</sup> esta produção múltipla certamente reflete os níveis séricos de SDF-1 encontrados nos pacientes. Ainda, alguns estudos demonstram que após infarto agudo do miocárdio, grande parte do processo angiogênico subsequente é devido à ação conjunta de SDF-1 e IL-8 no recrutamento de EPC para o local da lesão.<sup>14,15</sup> Estes achados poderiam explicar a má adaptação vascular encontrada nos pacientes com DRC após eventos isquêmicos.<sup>40,41</sup>

Concluindo, com base em nossos resultados *in vivo* demonstramos que a ação da uremia em pacientes em HD pode estar associada a danos vasculares intensos, refletindo os níveis circulantes aumentados das quimiocinas IL-8 e SDF-1, o que sugere uma correlação entre disfunção endotelial e reparo tecidual. Entretanto, nosso estudo limitou-se a um número pequeno de pacientes e entendemos que estudos com um maior número de pacientes e ensaios adicionais *in vitro* são necessários para avaliar quais as possíveis causas na diminuição nos níveis *in vitro* de SDF-1.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 471282/2010-3 e pela Fundação Araucária, convenio 183-10, protocolo 19488. Os autores gostariam de expressar sua gratidão a Liandra Kondrat, Guilherme Fabri Pereira e Júlio César Francisco por suas contribuições neste estudo.

## REFERÊNCIAS

- Drüeke TB, Massy ZA. Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol* 2010;6:723-35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2010.143>
- de Oliveira RB, Okazaki H, Stingham AE, Drüeke TB, Massy ZA, Jorgetti V. Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *J Bras Nefrol* 2013;35:147-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20130024>
- Stingham AE, Pecoits-Filho R. Vascular damage in kidney disease: beyond hypertension. *Int J Hypertens* 2011;2011:232683. PMID: 21876786 DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/232683>
- Stingham AE, Gonçalves SM, Martines EG, Nakao LS, Riella MC, Aita CA, et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2009;111:c117-26. PMID: 19147993 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000191205>
- Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005;26:33-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>
- Jie KE, Zaikova MA, Bergevoet MW, Westerweel PE, Rastmanesh M, Blankestijn PJ, et al. Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:1875-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfp749>
- Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2007;97:714-21. PMID: 17479181
- Ghadge SK, Mühlstedt S, Ozcelik C, Bader M. SDF-1  $\alpha$  as a therapeutic stem cell homing factor in myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2011;129:97-108. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.09.011>
- Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol* 2010;88:463-73.
- Barbieri F, Bajetto A, Porcile C, Pattarozzi A, Schettini G, Florio T. Role of stromal cell-derived factor 1 (SDF1/CXCL12) in regulating anterior pituitary function. *J Mol Endocrinol* 2007;38:383-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1677/JME-06-0014>
- Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic. *Circ Res* 2000;86:131-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.86.2.131>
- Bonavia R, Bajetto A, Barbero S, Pirani P, Florio T, Schettini G. Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol Lett* 2003;139:181-9. PMID: 12628753 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00432-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00432-0)
- Apostolakis S, Papadakis EG, Krambovitis E, Spandidos DA. Chemokines in vascular pathology (review). *Int J Mol Med* 2006;17:691-701.
- Gössl M, Mödder UI, Gulati R, Rihal CS, Prasad A, Loeffler D, et al. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with coronary retention of osteogenic endothelial progenitor cells. *Eur Heart J* 2010;31:2909-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehq373>
- Elmadbouh I, Haider HKh, Jiang S, Idris NM, Lu G, Ashraf M. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:792-803. PMID: 17350033
- Chen YT, Cheng BC, Ko SF, Chen CH, Tsai TH, Leu S, et al. Value and level of circulating endothelial progenitor cells, angiogenesis factors and mononuclear cell apoptosis in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2013;17:83-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10157-012-0664-9>
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56. PMID: 4355998 DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI107470>
- Chitalia VC, Murikipudi S, Indolfi L, Rabadi L, Valdez R, Franses JW, et al. Matrix-embedded endothelial cells are protected from the uremic milieu. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:3858-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr337>
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63. PMID: 6606682 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- de la Sierra A, Larrousse M. Endothelial dysfunction is associated with increased levels of biomarkers in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2010;24:373-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/jhh.2009.91>
- Burger D, Levin A. 'Shedding' light on mechanisms of hyperphosphatemic vascular dysfunction. *Kidney Int* 2013;83:187-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2012.416>
- Stenvinkel P. Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link? *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1968-71.
- Jourde-Chiche N, Dou L, Cerini C, Dignat-George F, Brunet P. Vascular incompetence in dialysis patients-protein-bound uremic toxins and endothelial dysfunction. *Semin Dial* 2011;24:327-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1525-139X.2011.00925.x>
- de Moraes TP, Fortes PC, Ribeiro SC, Riella MC, Pecoits-Filho R. Comparative analysis of lipid and glucose metabolism biomarkers in non-diabetic hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *J Bras Nefrol* 2011;33:173-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002011000200009>
- Bucharles S, Barberato SH, Stingham AE, Gruber B, Piekala L, Dambiski AC, et al. Impact of cholecalciferol treatment on biomarkers of inflammation and myocardial structure in hemodialysis patients without hyperparathyroidism. *J Ren Nutr* 2012;22:284-91. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2011.07.001>
- Rattanasompattikul M, Molnar MZ, Zaritsky JJ, Hatamizadeh P, Jing J, Norris KC, et al. Association of malnutrition-inflammation complex and responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in long-term hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:1936-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfs368>
- Stenvinkel P, Heimbürger O, Jøgestrand T. Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: association with Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Am J Kidney Dis* 2002;39:274-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/ajkd.2002.30546>
- Jie KE, van der Putten K, Bergevoet MW, Doevendans PA, Gaillard CA, Braam B, et al. Short- and long-term effects of erythropoietin treatment on endothelial progenitor cell levels in patients with cardiorenal syndrome. *Heart* 2011;97:60-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2010.194654>
- Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger M, Heimbürger O. Elevated serum levels of soluble adhesion molecules predict death in pre-dialysis patients: association with malnutrition, inflammation, and cardiovascular disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1624-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/15.10.1624>
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527-61.
- Malyszko J. Mechanism of endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Clin Chim Acta* 2010;411:1412-20. PMID: 20598675 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.06.019>
- Moody WE, Edwards NC, Madhani M, Chue CD, Steeds RP, Ferro CJ, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association? *Atherosclerosis* 2012;223:86-94.
- Shlipak MG, Massie BM. The clinical challenge of cardiorenal syndrome. *Circulation* 2004;110:1514-7. PMID: 15381655 DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000143547.55093.17>

34. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.87.10.840>
35. Ronco C, Chionh CY, Haapio M, Anavekar NS, House A, Bellomo R. The cardiorenal syndrome. *Blood Purif* 2009;27:114-26. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000167018>
36. Noh H, Yu MR, Kim HJ, Jeon JS, Kwon SH, Jin SY, et al. Uremia induces functional incompetence of bone marrow-derived stromal cells. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:218-25. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr267>
37. Herbrig K, Gebler K, Oelschlaegel U, Pistrosch F, Foerster S, Wagner A, et al. Kidney transplantation substantially improves endothelial progenitor cell dysfunction in patients with end-stage renal disease. *Am J Transplant* 2006;6:2922-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01555.x>
38. Zaza G, Pontrelli P, Pertosa G, Granata S, Rossini M, Porreca S, et al. Dialysis-related systemic microinflammation is associated with specific genomic patterns. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:1673-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfm804>
39. Karin N. The multiple faces of CXCL12 (SDF-1alpha) in the regulation of immunity during health and disease. *J Leukoc Biol* 2010;88:463-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0909602>
40. Becherucci F, Mazzinghi B, Ronconi E, Peired A, Lazzeri E, Sagrinati C, et al. The role of endothelial progenitor cells in acute kidney injury. *Blood Purif* 2009;27:261-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000202005>
41. Yuen DA, Kuliszewski MA, Liao C, Rudenko D, Leong-Poi H, Chan CT. Nocturnal hemodialysis is associated with restoration of early-outgrowth endothelial progenitor-like cell function. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:1345-53. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.10911210>