

Efeito *in vitro* do soro urêmico sobre a função de barreira e inflamação em colonócitos humanos

In vitro effect of uremic serum on barrier function and inflammation in human colonocytes

Autores

Laila Santos de Andrade¹
Maria Aparecida Dalboni²
José Tarcisio Giffoni de Carvalho²
Caren Cristina Grabulosa²
Natalia Barros Ferreira Pereira²
Danilo Takashi Aoike²
Lilian Cuppari^{1,2}

¹ Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, São Paulo, SP, Brasil.

² Universidade Federal de São Paulo, Departamento de medicina, Divisão de Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Introdução: Tem sido sugerido que na doença renal crônica (DRC) a uremia pode causar alterações intestinais, tais como modificações na microbiota e danos à barreira intestinal, e que estas possíveis alterações podem ter uma relação importante com o estado inflamatório e a toxicidade urêmica apresentadas por pacientes com DRC. **Objetivos:** Avaliar o efeito *in vitro* do soro urêmico sobre a permeabilidade da monocamada de células epiteliais do intestino, inflamação e apoptose. **Métodos:** Pools de soro foram preparados a partir de soros de indivíduos saudáveis, pacientes em tratamento conservador e em hemodiálise (Pré e Pós-HD). As células T84 foram incubadas por 24 horas com os diferentes pools. Em seguida a TER foi medida e as células foram submetidas às seguintes análises: apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e expressão de receptores toll-like (TLR) por citometria de fluxo e detecção de IL-6 no sobrenadante da cultura por ELISA. **Resultados:** Não foram encontradas diferenças, entre os grupos, com relação a TER, apoptose, EROs e expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9. Já a secreção de IL-6 foi maior ($p < 0,001$) pelas células incubadas com soro pré-HD e pós-HD. **Conclusão:** Os resultados obtidos a partir deste modelo sugerem que a uremia *per se* parece não comprometer a integridade das células epiteliais do intestino. O aumento da secreção de IL-6 pelas células incubadas com soro HD (pré e pós) sugere um potencial efeito da uremia sobre a resposta inflamatória intestinal.

Palavras-chave: Uremia; Intestino Grosso; Insuficiência Renal Crônica.

ABSTRACT

Introduction: In chronic kidney disease (CKD), it has been suggested that alterations within the gut are associated with an inflammatory state and uremic toxicity. Studies suggest that uremia may impair the function of the intestinal barrier via the promotion of increased intestinal permeability. To understand the mechanisms that are involved in intestinal barrier damage in the setting of uremia, we evaluated the *in vitro* effect of uremic serum on transepithelial electrical resistance (TER), inflammation, and apoptosis in intestinal epithelial cells (T84). **Methods:** Pools of serum from healthy individuals, patients not on dialysis, and patients on hemodialysis (Pre-HD and Post-HD) were prepared. T84 cells were incubated for 24 h in medium, of which 10% consisted of the pooled serum from each group. After incubation, the TER was measured and the following parameters were determined by flow cytometry: expression of toll-like receptors (TLRs), production of reactive oxygen species (ROS), and apoptosis. The level of IL-6 in the culture supernatant was determined by ELISA. **Results:** No difference was observed among the groups with respect to TER, apoptosis, and ROS or the expression of TLR-2, TLR-4, and TLR-9. IL-6 secretion was higher ($p < 0.001$) in cells that were incubated with pre- and post-HD serum. **Conclusion:** The results that were obtained from this model suggest that uremic serum *per se* does not seem to impair the integrity of intestinal epithelial cells. The increased IL-6 secretion by cells that were incubated with HD serum suggests a potential effect of uremia in the intestinal inflammatory response.

Keywords: Uremia; Intestine, Large; Renal Insufficiency, Chronic.

Data de submissão: 02/10/2017.
Data de aprovação: 24/11/2017.

Correspondência para:

Lilian Cuppari.
E-mail: lcuppari@uol.com.br

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-3949



INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal funciona como uma barreira entre o ambiente externo e o meio interno do corpo. A camada epitelial do trato gastrointestinal forma uma barreira seletivamente permeável, que permite a entrada passiva de nutrientes, íons e água, ao passo que simultaneamente restringe a entrada de patógenos nos compartimentos do tecido subjacente. Vários estímulos fisiológicos e patológicos regulam dinamicamente a permeabilidade desse epitélio por meio de alterações nas estruturas envolvidas nos mecanismos de adesão celular e formação de junções celulares^{1,2}.

Além disso, as células epiteliais intestinais (CEIs) expressam inúmeros receptores e mediadores pró-inflamatórios que permitem sua comunicação com o sistema imunológico^{3,4}. As CEIs são a primeira linha de defesa contra patógenos e desempenham um papel importante no processo de tolerância intestinal em relação a microrganismos comensais⁴⁻⁶. Através de receptores toll-like (TLR), as células epiteliais intestinais reconhecem componentes celulares bacterianos^{7,8}. Os TLRs desencadeiam respostas imunológicas contra agentes patogênicos, mas são também regulados para limitar a resposta inflamatória em direção a microbiota comensal no lúmen^{5,6}. Além disso, a atividade dos TLRs parece levar à reorganização da estrutura das junções de oclusão, o que favorece a função de barreira epitelial⁹. Portanto, o reconhecimento da microbiota comensal pelos TLRs desempenha importante papel na manutenção da homeostase intestinal^{10,11}.

A doença renal crônica (DRC) é uma patologia caracterizada pela perda gradual da função renal ao longo do tempo, com consequente retenção de uma série de compostos coletivamente denominados toxinas urêmicas. Em indivíduos com DRC, a presença de inflamação - um importante mediador de complicações associadas à doença, especialmente no sistema cardiovascular - é comum^{12,13}. Vários fatores contribuem para o estado inflamatório, incluindo a diminuição da depuração de citocinas pró-inflamatórias, toxicidade urêmica, estresse oxidativo, acidose metabólica e o próprio processo de diálise¹⁴. Recentemente foi sugerido que alterações na composição da microbiota intestinal¹⁵⁻¹⁷ e na permeabilidade intestinal¹⁸⁻²¹ em consequência da DRC também podem contribuir para a resposta inflamatória^{18,22,23}.

Portanto, há um interesse crescente em torno da investigação do papel da uremia sobre a permeabilidade

intestinal. Vaziri *et al.*²⁴ realizaram um estudo *in vivo* com ratos urêmicos e relataram uma ampla redução na expressão de proteínas das junções de oclusão, tais como claudina-1, ocludina e zônula de oclusão-1 (ZO-1) na mucosa colônica, o que indica dano acentuado na barreira intestinal. Achados semelhantes na expressão dessas proteínas também foram encontrados pelo mesmo grupo de pesquisadores em um estudo *in vitro* com colonócitos humanos incubados em meio contendo plasma de pacientes em hemodiálise. As células incubadas em plasma urêmico exibiram redução significativa na expressão de proteínas das junções de oclusão, acompanhada por diminuição na resistência elétrica transepitelial (RET). Tais eventos indicam aumento da permeabilidade da monocamada de células e sugerem que os compostos presentes no plasma urêmico podem estar envolvidos no processo de dano intestinal causado pela uremia²⁵.

Uma vez que os mecanismos envolvidos no dano à barreira intestinal causado pela uremia não são totalmente compreendidos, o presente estudo investigou o efeito do soro urêmico sobre a permeabilidade epitelial intestinal e avaliou se o soro urêmico afeta a expressão de TLRs, estresse oxidativo e a secreção de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais do cólon humano.

MÉTODOS

PREPARAÇÃO DO POOL DE SORO

Quatro pools de soro foram preparados a partir dos seguintes grupos: quatro indivíduos saudáveis, que serviram como controles (Saudável); cinco pacientes em tratamento conservador da doença renal crônica (Conservador) com taxa de filtração glomerular estimada entre 15 e 29 mL/min/1.73m²; e cinco pacientes em hemodiálise antes (Pré-HD) e após (Pós-HD) uma sessão de hemodiálise. Pacientes menores de 18 anos ou com mais de 70 anos, indivíduos em diálise por menos de três meses, pacientes com diabetes *mellitus*, doenças infecciosas ou inflamatórias, HIV, câncer ou doenças autoimunes, que utilizaram corticosteroides ou imunossupressores ou que tivessem recebido transplante renal não foram incluídos. Todas as amostras de sangue foram colhidas em condições de jejum (8 horas), com exceção das amostras pós-HD. Após a coleta de sangue, o soro foi imediatamente separado e os pools preparados e armazenados a -80 °C. Concentrações de creatinina, ureia, paratormônio,

cálcio, fósforo e potássio foram determinadas em cada pool de soro. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Paulo aprovou o estudo. Foi obtido o consentimento informado de todos os participantes do estudo.

CULTURA CELULAR E ESTUDOS DE INCUBAÇÃO

Células T84 foram obtidas da American Type Culture Collection (Manassas, VA, EUA) e cultivadas em frascos para cultura de tecidos de 75 cm² em meio DMEM/F12 (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, EUA). O meio foi suplementado com bicarbonato de sódio 1,2 g/L, L-glutamina 2,5 mM, HEPES 15 mM, piruvato de sódio 0,5 mM, 10% de soro bovino fetal e penicilina/estreptomicina 0,5% (10.000 UI/mL e 10 mg/mL, respectivamente) e as células foram mantidas em incubadora a 37°C, umidificada com 5% de CO₂.

De forma a estabelecer um sistema de cultura celular em monocamada polarizada, as células foram cultivadas em placas de 12 poços com insertos de cultura celular suspensos Millicell com diâmetro de 12 mm e poro de 0,4 µm (EMD Millipore Inc., Billerica, MA, EUA) com 400.000 células/inserto. De maneira a determinar qualitativamente se as células T84 atingiram a confluência, formaram as junções de oclusão e estabeleceram polaridade celular, foi monitorada a resistência elétrica transepitelial (RET) através da monocamada usando um medidor Millicell ERS-2 (EMD Millipore Inc., Billerica, MA, EUA). As monocamadas de T84 foram mantidas por aproximadamente 10 dias em meio completo. O meio foi trocado a cada dois dias e a RET medida regularmente. Quando a RET ultrapassou 1.000 Ω/cm², as monocamadas foram incubadas por 24 h em meio DMEM/F12, suplementado com 10% de pool de soro (Saudável, Conservador, Pré-HD e Pós-HD). A RET foi medida na conclusão do período de 24 horas de incubação. Em seguida, as células foram processadas para análise de citometria de fluxo e os sobrenadantes foram centrifugados por cinco minutos a 4°C; os sobrenadantes livres de células foram armazenados a -80 °C até serem utilizados na análise de citocinas. Nove experimentos foram realizados. Seus resultados foram utilizados na análise estatística.

EXPRESSÃO DE TLR-2, TLR-4 E TLR-9

Após incubação nas condições descritas anteriormente, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas.

Para detectar a expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 na superfície celular, 1 × 10⁵ células T84 foram incubadas no escuro por 15 min em temperatura ambiente com anticorpos correspondentes marcados por fluorescência: anti-TLR2 humano conjugado com APC (TL2.1, eBioscience, San Diego, CA, EUA), anti-TLR-4 humano conjugado com PE-Cy7 (HTA125, eBioscience, San Diego, CA, EUA) e anti-TLR9 humano conjugado com PE (EB72-1665, BD - Pharmingen, San Diego, CA, EUA). As células foram então lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento final foi ressuspenso em PBS. A detecção de todos os anticorpos foi realizada por citometria de fluxo (FacsCanto I, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As dispersões frontal e lateral da luz foram utilizadas para estabelecer o gate das células T84 e excluir detrito celular. As expressões de TLR2, TLR4 e TLR9 foram apresentadas em médias de intensidade de fluorescência (MIF) e em porcentagens (%). O método de controle Fluorescência Menos Um (FMO control) foi utilizado para identificar e estabelecer os gates das células a serem analisadas e controlar a sobreposição de fluoróforos.

DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) INTRACELULARES

Os níveis intracelulares de EROs foram detectados pela conversão do 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), composto que fica fluorescente na presença de radicais de oxigênio²⁶. Antes da incubação em DCFH-DA, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Para detectar EROs, 1 × 10⁵ células T84 foram incubadas no escuro por 30 min a 37°C com DCFH-DA na concentração de 0,3 mM. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, o sobrenadante foi descartado e o sedimento final foi ressuspenso em EDTA a 3 nM. A detecção de EROs foi realizada por citometria de fluxo (FacsCanto I, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As dispersões frontal e lateral da luz foram utilizadas para estabelecer o gate das células T84 e excluir detrito celular. A expressão de EROs foi apresentada em média de intensidade de fluorescência (MIF) e em porcentagem (%).

DETECÇÃO DE IL-6

A concentração de IL-6 nos sobrenadantes livres de células condicionados da monocamada de células T84 foi determinada por ensaio ELISA (HS Human

IL-6 kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

ANÁLISE DA APOPTOSE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após incubação, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. Para detectar apoptose e necrose, 1×10^5 células T84 foram incubadas no escuro por 20 min em temperatura ambiente com anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídio (PI) (BD - Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Células apoptóticas precoces foram positivas para anexina V e negativas para PI; células apoptóticas tardias foram positivas tanto para anexina V como para PI; e células necróticas foram positivas para PI e negativas para anexina V²⁷. As leituras foram realizadas em um citômetro de fluxo (FACSCANTO I, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As dispersões frontal e lateral da luz foram utilizadas para estabelecer o gate das células T84 e excluir detrito celular. Os dados foram apresentados em porcentagens (%).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

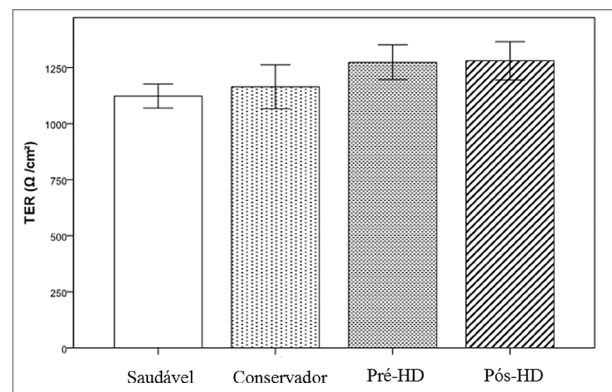
Os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil, conforme o apropriado. Foi utilizado um modelo linear geral (MLG) para efetuar comparações entre os grupos, seguido de análise da diferença mínima significativa (DMS) usando o software SPSS® versão 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Significância estatística foi atribuída para diferenças com $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os dados laboratoriais de cada pool de soro utilizado nos experimentos. Os valores

ficaram dentro do esperado para cada condição. Como visto na Figura 1, o soro urêmico das três diferentes condições não promoveu mudanças na resistência elétrica transepitelial (RET) em relação ao grupo saudável ou nas comparações entre os demais grupos.

Figura 1. Resistência elétrica transepitelial (RET) através da monocamada de células T84 após incubação sob diferentes condições. Dados apresentados em média \pm EP. $p > 0,05$ entre grupos. Pool de soro: Saudável - controles saudáveis; Conservador- indivíduos com doença renal crônica em tratamento conservador; HD- hemodiálise.



Além disso, como mostra a Tabela 2, o soro urêmico das três condições não promoveu alterações na expressão de TLR-2, TLR-4 ou TLR-9 ou na produção de EROs em relação ao grupo saudável ou nas comparações entre os demais grupos. A Figura 2 ilustra a estratégia utilizada para detectar a expressão dessas proteínas e a produção de EROs por citometria de fluxo. Contrariamente, secreção mais elevada de IL-6 foi identificada nas células incubadas com soro pré e pós-HD em comparação às condições de incubação saudável e conservador (Figura 3).

Como ilustra a Tabela 3, boa viabilidade celular (> 80%) foi observada em todas as condições de incubação. O soro urêmico não promoveu alterações no tocante a apoptose.

TABELA 1 DADOS DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES INCLUÍDOS NOS POOLS DE SORO UTILIZADOS NO ESTUDO

Variáveis	Saudável	Conservador	Pré-HD	Pós-HD
Idade (anos)	31,4 \pm 8,98	57,4 \pm 11,43	58 \pm 9,67	-
Sexo masculino [n (%)]	2 (40)	3 (60)	1 (20)	-
Creatinina (mg/dL)	0,82	2,9	11,54	3,33
Ureia (mg/dL)	33	108	149	32,0
PTH (pg/mL)	23	161	763	381
Cálcio (mg/dL)	9,7	9,2	9,0	10,5
Fósforo (mg/dL)	3,4	4,1	4,8	2,3
Potássio (mEq/L)	3,8	4,7	4,8	2,8

Pool de soro: Saudável- controles saudáveis; Conservador- indivíduos com doença renal crônica em tratamento conservador; HD- hemodiálise; PTH-paratormônio.

TABELA 2 EXPRESSÃO DE TLR-2, TLR-4 E TLR-9; PRODUÇÃO DE EROs E IL-6 EM CÉLULAS T84

Variáveis	Saudável	Conservador	Pré-HD	Pós-HD	<i>p</i>
TLR-2 (MIF)	10.227 ± 2.653	10.391 ± 3.266	11.826 ± 3.422	14.940 ± 9.032	0,493
TLR-2 (%)	94,6 (89,9-96,9)	93,3 (85,1-97,7)	94 (88,4-98,2)	94,8 (87,2-96,8)	0,827
TLR-4 (MIF)	6.030 (5.537-8.727)	6.504 (5.609-8.364)	7.668 (6.263-9.834)	9.119 (5.743-15.812)	0,418
TLR-4 (%)	82,6 (76,2-91)	80,6 (76-92,5)	82 (77,2-93,4)	84,9 (78,8-91)	0,851
TLR-9 (MIF)	3.773 (2.149-9.303)	2.995 (2.115-12.856)	2.789 (2.111-7.273)	3.580 (2.980-8.425)	0,937
TLR-9 (%)	4,8 (1,15-7,7)	4,6 (1,07-8,72)	4,15 (0,82-6,8)	4,45 (1,15-8,65)	0,971
EROs (MIF)	293,4 ± 72,7	289,2 ± 54,83	291 ± 65,2	294,6 ± 44,8	0,999
EROs (%)	40,8 (34,5-65,7)	46,2 (35,9-62,8)	38,4 (32,3-57,5)	33,6 (25,3-50,5)	0,628
IL-6 (pg/mL)	0,76 ± 0,35	1,14 ± 0,53	2,27 ± 0,46*	2,85 ± 0,93*†	< 0,001

Dados apresentados como média ± DP ou mediana (intervalo interquartil). **p* < 0,01 vs. Saudável e Conservador; †*p* = 0,07 vs. Pré-HD. MIF- média da intensidade de fluorescência; TLR-2- receptor toll-like 2; TLR-4- receptor toll-like 4; TLR-9- receptor toll-like 9; IL-6- interleucina 6. Pool de soro: Saudável- controles saudáveis; Conservador- indivíduos com doença renal crônica em tratamento conservador; HD- hemodiálise.

Figura 2. Ilustração da estratégia utilizada para detectar a expressão de receptores toll-like, produção de EROs e apoptose por citometria de fluxo. (A) Dispersões frontais e laterais da luz foram utilizadas para estabelecer o gate das células T84 e excluir detrito celular. (B) Exemplo de expressão de receptor toll-like 4 (TLR-4) em cada condição de incubação. Saudável- controles saudáveis; Conservador- indivíduos com doença renal crônica em tratamento conservador; HD- hemodiálise. TLR-4- receptor toll-like 4.

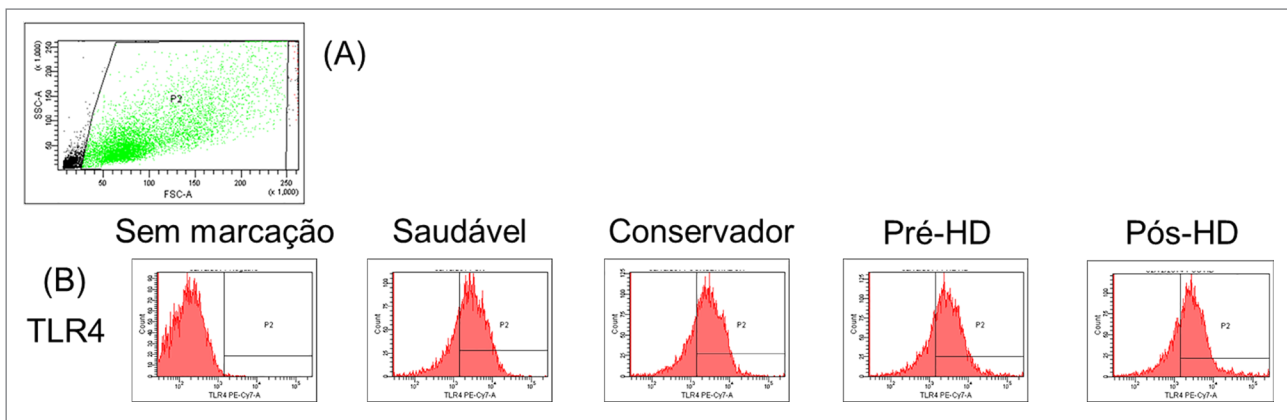
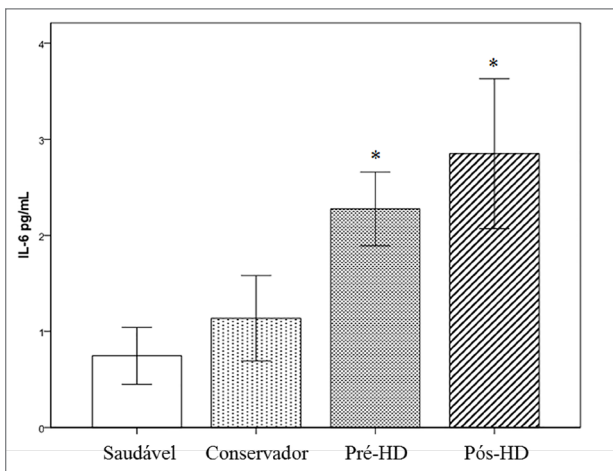


Figura 3. Produção de IL-6 por células T84 após incubação sob diferentes condições. Dados apresentados como média (IC 95%). * *p* < 0,01 vs. Saudável e Conservador. Pool de soro: Saudável- controles saudáveis; Conservador- indivíduos com doença renal crônica em tratamento conservador; HD- hemodiálise.



DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* com células epiteliais intestinais mostrou que o soro urêmico nas três condições testadas não promoveu alterações na resistência elétrica transepitelial (RET), no estresse oxidativo ou na expressão de receptores toll-like. No entanto, foi observada elevação na secreção de IL-6 nas células incubadas com soro pré e pós-HD. Até onde sabemos, apenas um estudo avaliou o efeito do plasma urêmico sobre a permeabilidade da monocamada de células epiteliais intestinais. Em contraste com os nossos achados, Vaziri *et al.*²⁵ identificaram que o plasma urêmico (pré e pós-HD) promoveu redução da RET e diminuição concomitante na expressão de proteínas das junções de oclusão em células T84. Embora tenhamos seguido atentamente as etapas descritas nos métodos desse estudo publicado anteriormente, não conseguimos reproduzir os resultados deles. As razões

TABELA 3 VIABILIDADE, APOPTOSE E NECROSE CELULAR

Variáveis	Saudável	Conservador	Pré-HD	Pós-HD	p
Viabilidade (%)	80,5 ± 5,2	82,9 ± 4,35	82,7 ± 4,8	82,1 ± 3,7	0,841
Apoptose precoce (%)	6,8 ± 2,35	5,8 ± 1,6	5,5 ± 1,95	6,2 ± 2,3	0,751
Apoptose tardia (%)	6,5 (6,1-8,4)	6,3 (5,4-7,4)	6,5 (5,7-7,4)	6,4 (6,0-8,3)	0,755
Necrose (%)	4,6 (2,7-9,1)	3,3 (2,1-8,7)	3,9 (1,8-9,9)	5,0 (2,3-7,0)	0,984

Dados apresentados como média ± DP ou mediana (intervalo interquartil). $p > 0,05$ entre grupos. Pool de soro: Saudável- controles saudáveis; Conservador- indivíduos com doença renal crônica em tratamento conservador; HD- hemodiálise.

para a discrepância nos resultados são desconhecidas, mas algumas diferenças nos protocolos dos estudos podem estar na raiz da questão. Primeiro, usamos um pool de soro para cada condição de incubação, enquanto Vaziri *et al.* relataram que as células foram incubadas separadamente com o plasma de cinco pacientes. Em segundo lugar, os critérios que utilizamos para a seleção dos pacientes para preparar os pools de soro podem diferir em alguns aspectos dos critérios adotados por Vaziri *et al.* Contudo, como mostra a Tabela 1, os parâmetros laboratoriais dos pools preparados em nosso estudo foram consistentes com aqueles esperados para cada grupo experimental.

A ausência de alteração nos marcadores de integridade celular intestinal em nosso estudo indica que o soro urêmico pode não ter prejudicado a permeabilidade paracelular se um efeito direto fosse esperado. Embora o período de incubação possa ter alguma influência na permeabilidade intestinal, decidimos usar o período de 24 horas como feito no estudo anteriormente citado²⁵. Contudo, antes de iniciar os experimentos, também testamos dois outros períodos de incubação (6 h e 48 h), mas os resultados foram semelhantes aos obtidos com o período de 24 horas. Além do mais, deve-se considerar que o dano às células epiteliais intestinais causado pela uremia pode ocorrer indiretamente em função dos seus efeitos no ambiente intestinal, que envolve a elevação do influxo de ureia para o trato gastrointestinal. Tal contexto favorece o aumento da fermentação de compostos nitrogenados, gerando um grande número de produtos que podem afetar negativamente o epitélio intestinal²⁸⁻³¹. Com efeito, um estudo *in vitro* com células T84 incubadas com ureia mais urease (enzima bacteriana) relatou grandes reduções na RET e na expressão de proteínas das junções de oclusão, o que indica o efeito deletério de tal atividade enzimática sobre as células epiteliais intestinais³². Alterações no meio bioquímico podem resultar em alterações na composição e na atividade metabólica da microbiota intestinal³⁰. De fato, um estudo realizado com pacientes com DRC descreveu

importantes alterações na composição da microbiota intestinal. Essas modificações são caracterizadas pela expansão de famílias bacterianas que possuem urease e enzimas formadoras de indol e p-cresol, além de redução nas famílias que possuem enzimas produtoras de butirato¹⁶. O importante papel do ambiente intestinal na preservação da permeabilidade intestinal foi demonstrado em estudo recente. Uma atenuação significativa nas alterações das proteínas das junções de oclusão do tecido colônico foi identificada quando ratos urêmicos foram tratados com fibra alimentar fermentável, conhecida pelo seu efeito benéfico sobre a atividade enzimática e a composição da microbiota³³. Portanto, o efeito da uremia no intestino parece ser complexo e envolve a interação tanto das células quanto da microbiota intestinal. Assim, a ausência de impacto negativo do soro urêmico no presente estudo pode ser atribuída à ausência de microbiota.

O rompimento do equilíbrio inflamatório no intestino representa um fator potencial que contribui com danos à barreira intestinal³⁴. Como foi demonstrado em vários tipos celulares que as toxinas urêmicas têm efeito estimulante sobre as vias inflamatórias³⁵⁻³⁹, levantamos a hipótese de que tal efeito possa ocorrer também nas células epiteliais intestinais. Portanto, investigamos pela primeira vez se o soro urêmico modificaria a expressão de receptores toll-like (TLRs) e a produção de IL-6. Apesar da ausência de alteração nos TLRs nas condições urêmicas de nossos experimentos, foi observada elevação da secreção de IL-6 quando as células foram incubadas com soro de pacientes em hemodiálise (HD). Aparentemente, a ativação de TLR-2, TLR-4 e TLR-9 não esteve ligada à estimulação da liberação de IL-6 pelo soro urêmico. Embora não tenha sido testado em nosso estudo, a elevação observada da IL-6 pode ser consequência do efeito estimulante de outras citocinas, tais como TNF- α e IL-1, que frequentemente estão mais elevadas no soro de pacientes em HD^{40, 41}. Tal suposição é um tanto plausível se considerarmos que a produção de IL-6 não se elevou quando as células foram incubadas com

soro urêmico de pacientes não dependentes de diálise. Com efeito, a presença de algum grau de função renal nesses pacientes pode permitir, pelo menos até certo ponto, a remoção de toxinas urêmicas, incluindo citocinas. Por outro lado, a remoção de vários tipos de moléculas tais como as citocinas é relativamente ineficiente no processo de hemodiálise⁴². A secreção aumentada de IL-6 pelas células incubadas com soro de HD não pareceu produzir efeitos deletérios sobre a integridade da monocamada de células, uma vez que nenhuma alteração na RET foi observada. Contudo, é importante considerar que o potencial dano à função da barreira, causado por distúrbios na resposta inflamatória, é complexo e envolve as relações entre diferentes tipos de células, particularmente as do sistema imunológico. Portanto, o modelo experimental utilizado no presente estudo não permite concluir se a IL-6 secretada pelas células epiteliais contribui para o processo inflamatório geral. Esse achado merece ser investigado mais profundamente de forma a fazer avançar o conhecimento atual sobre a relação entre DRC, inflamação e função da barreira intestinal.

Em conclusão, demonstramos que o meio urêmico não afetou a integridade da barreira intestinal, a expressão de TLRs ou a produção de espécies reativas de oxigênio. O soro de HD estimulou a secreção de IL-6 pelas células epiteliais intestinais. Uma vez que a uremia pode afetar a homeostase intestinal por diferentes vias, mais estudos são necessários para melhor explicar a relação entre a DRC e o intestino.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Otoniel S Ribas pelo apoio técnico. **Apoio financeiro:** LS. Andrade recebeu bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A presente pesquisa recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (# 2013/21380-6).

REFERÊNCIAS

- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G851-7.
- Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *J Membr Biol* 1987;100:123-36.
- Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 1997;273:G769-75.
- Pitman RS, Blumberg RS. First line of defense: the role of the intestinal epithelium as an active component of the mucosal immune system. *J Gastroenterol* 2000;35:805-14.
- Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10:131-44.
- Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1327-36.
- Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54:1182-93.
- Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeier J, Kraehenbuhl JP. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr* 2007;137:756S-72S.
- Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007;132:1359-74.
- Lee J, Mo JH, Shen C, Rucker AN, Raz E. Toll-like receptor signaling in intestinal epithelial cells contributes to colonic homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:27-31.
- de Kivit S, van Hoffen E, Korthagen N, Garssen J, Willemsen LE. Apical TLR ligation of intestinal epithelial cells drives a Th1-polarized regulatory or inflammatory type effector response *in vitro*. *Immunobiology* 2011;216:518-27.
- Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl* 2008(111):S4-9.
- Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009;4:S49-55.
- Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif* 2015;39:84-92.
- Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int* 2013;83:308-15.
- Wong J, Piceno YM, Desantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am J Nephrol* 2014;39:230-7.
- Wang IK, Lai HC, Yu CJ, Liang CC, Chang CT, Kuo HL, et al. Real-time PCR analysis of the intestinal microbiotas in peritoneal dialysis patients. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:1107-12.
- Wang F, Jiang H, Shi K, Ren Y, Zhang P, Cheng S. Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients. *Nephrology (Carlton)* 2012;17:733-8.
- de Almeida Duarte JB, de Aguiar-Nascimento JE, Nascimento M, Nochi RJ Jr. Bacterial translocation in experimental uremia. *Urol Res* 2004;32:266-70.
- Wang F, Zhang P, Jiang H, Cheng S. Gut bacterial translocation contributes to microinflammation in experimental uremia. *Dig Dis Sci* 2012;57:2856-62.
- Magnusson M, Magnusson KE, Sundqvist T, Denneberg T. Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut* 1991;32:754-9.
- Shi K, Wang F, Jiang H, Liu H, Wei M, Wang Z, et al. Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig Dis Sci* 2014;59:2109-17.
- Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int* 2013;83:1010-6.
- Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS. Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:2686-93.
- Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, Jellbauer S, Moradi H, Rafatellu M, et al. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol* 2012;36:438-43.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992;5:227-31.

27. Dong HP, Kleinberg L, Davidson B, Risberg B. Methods for simultaneous measurement of apoptosis and cell surface phenotype of epithelial cells in effusions by flow cytometry. *Nat Protoc* 2008;3:955-64.
28. Birkett A, Muir J, Phillips J, Jones G, O'Dea K. Resistant starch lowers fecal concentrations of ammonia and phenols in humans. *Am J Clin Nutr* 1996;63:766-72.
29. Macfarlane GT, Macfarlane S. Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:156-62.
30. Smith EA, Macfarlane GT. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 1996;81:288-302.
31. Kang JY. The gastrointestinal tract in uremia. *Dig Dis Sci* 1993;38:257-68.
32. Vaziri ND, Yuan J, Norris K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 2013;37:1-6.
33. Vaziri ND, Liu SM, Lau WL, Khazaeli M, Nazertehrani S, Farzaneh SH, et al. High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease. *PLoS One* 2014;9:e114881.
34. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011;474:298-306.
35. Adesso S, Popolo A, Bianco G, Sorrentino R, Pinto A, Autore G, et al. The uremic toxin indoxyl sulphate enhances macrophage response to LPS. *PLoS One* 2013;8:e76778.
36. Dou L, Jourde-Chiche N, Faure V, Cerini C, Berland Y, Dignat-George F, et al. The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J Thromb Haemost* 2007;5:1302-8.
37. Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, Kompa AR, Wang BH, Krum H. Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur Heart J* 2010;31:1771-9.
38. Schepers E, Meert N, Glorieux G, Goeman J, Van der Eycken J, Vanholder R. P-cresylsulphate, the main in vivo metabolite of p-cresol, activates leucocyte free radical production. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:592-6.
39. Watanabe H, Miyamoto Y, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, et al. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress by activation of NADPH oxidase. *Kidney Int* 2013;83:582-92.
40. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005;67:1216-33.
41. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, et al.; European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63:1934-43.
42. Neiryck N, Vanholder R, Schepers E, Eloit S, Pletinck A, Glorieux G. An update on uremic toxins. *Int Urol Nephrol* 2013;45:139-50.