



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**As toxinas urêmicas p-Cresol e p-Cresilsulfato
alteram as funções de *burst* oxidativo, fagocitose e
apresentação de antígenos em macrófagos
derivados de monócitos: potencial ligação entre a
uremia e a disfunção da imunidade inata e
adaptativa.**

Aluna: Marina Luise Viola de Azevedo

Orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral

Co-orientador: Roberto Pecoits Filho

**CURITIBA
2013**

MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO

As toxinas urêmicas p-Cresol e p-Cresilsulfato alteram as funções de *burst* oxidativo, fagocitose e apresentação de antígenos em macrófagos derivados de monócitos: potencial ligação entre a uremia e a disfunção da imunidade inata e adaptativa.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, como requisito para obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral

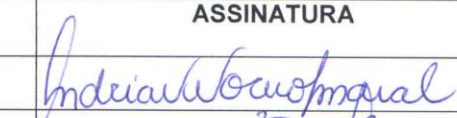
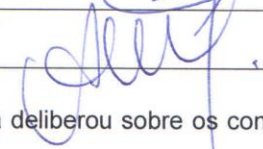
Co-orientador: Roberto Pecoits Filho

**CURITIBA
2013**

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos doze dias do mês de dezembro de 2013, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação **“AS TOXINAS URÊMICAS P-CRESOL E P-CRESILSULFATO ALTERAM AS FUNÇÕES DE BURST OXIDATIVO, FAGOCITOSE E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS EM MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONÓCITOS: POTENCIAL LIGAÇÃO ENTRE A UREMIA E A DISFUNÇÃO DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA”** apresentada por **MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profª. Drª. Andrea Novais Moreno PUCPR – Presidente	
Prof. Dr. Fellype de Carvalho Barreto PUCPR	
Profª. Drª. Andréa Emilia Marques Stinghen UFPR	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profª. Drª. Andrea Novais Moreno

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Fellype de Carvalho Barreto

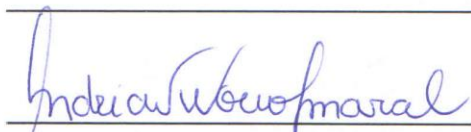
Conceito: APROVADO

Profª. Drª. Andréa Emilia Marques Stinghen

Conceito: Aprovado

Conceito Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:



Profª. Drª. Andrea Novais Moreno
Presidente da Banca Examinadora



Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

Dedico esta dissertação aos meus pais Elaine e Fernando, pelo constante incentivo, presença e amor à que me submetem por toda a vida. Por fim à minha amada Lola pela fiel companhia e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo espaço cedido e ao CNPq pelo fomento da nossa pesquisa.

À Prof^a Andréa Novais Moreno Amaral, minha orientadora e ao Prof Roberto Pecoits, co-orientador, por me receberem no programa e acreditarem em mim, além do apoio durante todo o período de realização desse trabalho.

À Prof^a Andréa Stinghen e ao Prof Wesley Souza pela sulfatação do p-cresol.

À Prof^a Lúcia de Noronha, minha mãe científica, a quem devo todas as minhas conquistas no âmbito profissional. Sempre de prontidão para aconselhar, elogiar e também corrigir. Foi essencial na conclusão dessa etapa, assim como de todo esse período.

À Alcione, secretária do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde pela paciência e prontidão em resolver o que se fazia necessário.

À equipe do laboratório de imunologia, em especial à Marcela Dias e Natália Bonan, que foram meu braço direito na bancada e se tornaram mais do que colegas de mestrado, amigas que vou levar pra sempre.

À Prof^a Selene Elíffio Esposito, sempre presente e disposta, foi fundamental nos conselhos de bancada.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Patologia Experimental, Ana Paula Camargo Martins e Seigo Nagashima, pela compreensão das ausências, pelo revezamento nas tarefas do laboratório, além do apoio emocional indescritível.

À minha tia, Mary de Azevedo Olivas, meu grande exemplo de acadêmica e inspiração para a carreira.

Aos meus pais, Elaine e Fernando pela dedicação e apoio durante toda a minha trajetória de vida, exemplos de honestidade e perseverança.

À minha avó Ingrid, por me fazer sentir tão especial.

Aos meus amigos e colegas, que fizeram desta etapa mais leve e divertida.

Por fim, mas não menos importante, ao meu amado esposo Neto, pelo incentivo em correr atrás dos meus sonhos e pelo companheirismo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
Doença Renal Crônica.....	2
Toxicidade Urêmica.....	5
P-Cresol e seus subprodutos.....	7
Disfunções Imunes na DRC.....	11
HIPÓTESE E OBJETIVOS	14
Hipótese.....	14
Objetivo Geral.....	14
Objetivos Específicos.....	14
ARTIGO.....	15
CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	34

RESUMO

Introdução: A Doença Renal Crônica (DRC) é uma doença que evolui com poucos sinais e sintomas, com perda de filtração glomerular progressiva e geração de uma toxicidade celular e tecidual como decorrência da retenção de solutos, dentre eles o p-Cresol (pC) e o p-Cresilsulfato (pCS), porém os efeitos bioquímicos do pC e do pCS não são necessariamente os mesmos.

Objetivos: O presente trabalho teve o intuito de avaliar a resposta de macrófagos às toxinas urêmicas pC e pCS, através de mecanismos celulares como o *burst* oxidativo, fagocitose a análise de moléculas de superfície relacionadas à apresentação antigênica.

Materiais e Métodos: Neste estudo foram utilizadas células da linhagem monocítica humana U937 que foram cultivadas e diferenciadas em macrófagos *in vitro* com PMA (150 nM). A ativação celular se fez com o uso de LPS (1 ng/ml controle positivo) e diferentes concentrações de pC ou pCS (10, 25 e 50 µg/ml) ou ainda, as toxinas associadas ao LPS. Os ensaios biológicos avaliados foram: (1) Estresse oxidativo celular pela detecção do óxido nítrico (NO) através de DAF-FM (2) Fagocitose através da incorporação de esferas fluorescentes. (3) Expressão de moléculas relacionadas à apresentação antigênica utilizando os anticorpos anti-HLA-DR-PE; anti-HLA-ACB-FITC; anti-CD80-FITC; anti-CD86-PE. Todas as análises foram realizadas por citometria de fluxo.

Resultados: Nossos resultados revelam intensa indução da produção de NO em células que foram incubadas com LPS após 6h e 12h de incubação. Frente ao pC, o aumento mais expressivo foi promovido pela menor concentração (10 µg/ml) enquanto na concentração máxima (50 µg/ml) não houve indução de produção. A menor concentração de pCS promoveu resposta dependente do tempo de incubação e novamente, os valores encontrados para 50 µg/ml não foram significativos. Na indução de fagocitose as células incubadas com LPS induziram aumento desta atividade biológica, já a toxina pC foi capaz de aumentar a fagocitose nas concentrações menores, porém com menor intensidade na concentração máxima. Na associação com LPS foi observado aumento em todas as concentrações de pC, mostrando que a associação promoveu um incremento na capacidade fagocítica das células. Para pCS, o perfil foi semelhante ao pC, porém com menor intensidade do que a toxina isolada e ainda menor que pC. Quando avaliamos a expressão de marcadores de apresentação antigênica, a presença das toxinas apresentou aumento na expressão de HLA-ABC, mas não quando combinado com LPS. Da mesma forma, LPS isolado foi capaz de induzir expressão de HLA-DR, mas não quando associado às toxinas; enquanto pC ou pCS não induziram expressão. Na expressão de CD80, quando avaliados pC e pCS, combinados ou não com LPS, observou-se efeito de indução da expressão. Por outro lado, para CD86, o LPS isolado induziu uma importante expressão quando comparado às toxinas e ao controle negativo. Ambas as toxinas inibiram a função do LPS associado, mantendo níveis basais da expressão.

Conclusão: Nossos resultados sugerem que: 1. A toxina urêmica pC, não apresenta citotoxicidade sobre os macrófagos nas concentrações conhecidas como máxima, média e mínima, encontradas em doentes renais crônicos. Isso leva a crer que o ambiente urêmico, ao qual o doente renal fica exposto, não parece ser suficiente para promover morte de células como os macrófagos. 2. Os macrófagos aumentam a produção de NO quando desafiados com as concentrações mínima e média de pC e pCS, em comparação ao controle negativo (macrófago não desafiado). Quando desafiados com a concentração máxima, os macrófagos diminuem significativamente a produção de NO em comparação ao controle positivo (LPS). 3. O processo de fagocitose apresentou um resultado semelhante à produção de NO. Quando desafiados com as concentrações mínima e média de pC e pCS, os macrófagos apresentaram aumento de fagocitose em comparação ao controle negativo (macrófago não desafiado). Quando desafiados com a concentração máxima, os macrófagos diminuem significativamente a fagocitose em comparação ao controle positivo (LPS). 4. Ambas as toxinas, pC e pCS em concentração máxima, diminuíram a expressão de HLA-DR e CD86 em macrófagos na presença ou não de LPS, quando comparado ao controle positivo (LPS isolado).

INTRODUÇÃO

Doença Renal Crônica

A Doença Renal Crônica (DRC) consiste na perda progressiva e irreversível da função renal, fazendo com que o organismo não consiga manter o equilíbrio metabólico e hidroeletrolítico culminando na uremia. A DRC é dividida em seis estágios funcionais (Tabela1), com base no nível de função renal (medida pela taxa de filtração glomerular (TFG)), independente do diagnóstico. O estágio 0 é a fase de função renal normal sem lesão renal, isto é, inclui pessoas que possuem TFG normal e que não apresentam lesão nos rins, porém estão no grupo de risco para desenvolvimento da DRC, como hipertensos e diabéticos. O estágio 1 é a fase de lesão renal leve, porém com TFG preservadas além de ausência completa de sinais e sintomas. O estágio 2 é a fase de insuficiência renal funcional ou leve, onde há lesão renal um pouco mais pronunciada ocasionando insuficiência renal funcional, isto é os níveis de uréia e creatinina plasmáticos ainda são normais, porém há uma pequena queda no ritmo de filtração glomerular, além de não apresentar ainda sinais e sintomas. O estágio 3 é chamado de fase laboratorial ou insuficiência renal moderada, em que os sinais e sintomas são leves ou ausentes, porém a TFG é levemente alterada. Já no estágio 4, fase clínica ou severa, os pacientes apresentam sintomas marcados de uremia e TFG significativamente baixa. O estágio 5 ou fase terminal, corresponde à severa redução da TFG e nessa fase o paciente encontra-se intensamente sintomático (Hauser *et al.*, 2008; Romão, 2004).

Tabela1: estadiamento e classificação da doença renal crônica

Estágio	Filtração Glomerular (ml/min)	Grau de Insuficiência Renal
0	> 90	Grupos de Risco, Sem lesão
1	> 90	Lesão Renal Leve e Função Normal
2	60-89	Insuficiência leve ou Funcional
3	50-59	Insuficiência Moderada ou Laboratorial
4	15-29	Insuficiência Severa ou Clínica
5	< 15	Insuficiência Terminal ou Dialítica

Adaptado de Romão, 2004

Os rins humanos tem grande capacidade de adaptação e podem manter o organismo em funcionamento com apenas 10% da sua função normal. Em vista disto, os sintomas de perda de função deste órgão, que levam o paciente a procurar ajuda médica, podem demorar anos para aparecer, geralmente só aparecendo nas fases clínica ou terminal (estágios 4 ou 5 da tabela 1). Quando esta perda acaba sendo tardiamente diagnosticada por métodos laboratoriais, esses pacientes geralmente estão em fase terminal da DRC e assim acabam tendo que ser submetidos à terapia de substituição da função do rim ou diálise (Marques, 2005), a revelia de outros tratamentos preventivos de progressão de lesão renal, menos agressivos, que podem ser implementados naqueles casos de diagnóstico mais precoce. Nos últimos anos, estratégias para a detecção precoce da DRC e medidas que podem ser implementadas para deter o avanço desta doença foram identificadas a fim de beneficiar estes pacientes com diagnóstico mais precoce e melhor suporte de tratamento. No entanto, estas medidas também acabaram por constatar que a DRC é uma doença comum, perigosa e silenciosa, mas que pode ter sua progressão protelada especialmente quando diagnosticada precocemente, o que tem sido amplamente divulgado nas campanhas de saúde renal (Klahr, 2001). Sendo assim, a DRC é considerada um problema de saúde pública, por sua prevalência e incidência elevadas, e especialmente pelo seu impacto na morbimortalidade da população, além dos enormes custos econômicos e sociais.

Na década de 80, foram estudados intensivamente os fatores responsáveis pela progressão da doença renal que levariam o paciente a fase terminal da doença e a necessidade de diálise. A compreensão de como estes fatores atuam durante a progressão da doença, tem permitido o desenvolvimento de intervenções preventivas de saúde pública apropriadas visando minimizar os danos causados pelas fases terminais desta doença e pelas medidas suportivas implementadas nesta fase tais como a diálise (Alebiosou, 2003; Klahr & Morrissey, 2003). No Brasil, a prevalência de pacientes em fase terminal da DRC submetendo-se a diálise mais que dobrou na última década, e a incidência de novos pacientes aumenta cerca de 8% ao ano (Romão, 2004). De acordo com Sesso e colaboradores (2008), a prevalência de pacientes em tratamento dialítico no Brasil

em 2008 era de 468 pacientes por milhão de habitantes. Existem no país mais de 600 unidades de diálise e o número de doentes renais crônicos vem aumentando, principalmente pelo envelhecimento da população em geral e pelo aumento no número de portadores de hipertensão arterial e diabetes *mellitus*, as duas maiores causas da doença renal crônica. Registros norte-americanos revelam que na década de 90 o crescimento anual de pacientes em diálise foi de 8,7% (Marques, 2005).

Apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos, a DRC ainda apresenta altas taxas de mortalidade, as quais são muito mais pronunciadas nos seus estágios mais avançados. As alterações cardiovasculares e a presença de infecções, frequentemente vistas em renais crônicos como co-morbidades, parecem ser os fatores mais comuns correlacionados com o aumento do risco de sua mortalidade. Além disso, a diabetes *mellitus*, outra co-morbidade muito frequente nos pacientes renais crônicos, também parece ser um fator agravante desta doença, sendo que também são diabéticos cerca de 25% dos pacientes com DRC além das alterações cardiovasculares (Marques, 2005).

O próprio estado de perda da função renal parece contribuir para o aumento da incidência de doença cardiovascular (DCV), uma vez que a doença é um fator de risco para a mesma. Alguns autores já têm relatado que baixas TFG e aumento de proteinúria estão correlacionadas com altas taxas de DCV (Vanholder *et al.*, 2011). A aterosclerose, DCV muito comum, é uma das principais causas de morte entre os pacientes com DRC em estágios avançados. Os pacientes renais crônicos possuem um estado inflamatório permanente o que propicia lesão endotelial, sendo que este fato está associado à incidência e progressão da aterosclerose (Schepers *et al.*, 2007).

No entanto, todos estes fatores são claramente insuficientes para justificar o efeito multiplicador do risco de complicações e mortalidade relacionados a esta doença (Zatz, 1996). Parece existir ainda outros fatores que predis põem estes pacientes a altas taxas de complicações e mortalidade, tais como a presença de um microambiente de toxicidade celular e tecidual permanentes decorrente da própria retenção de solutos gerada por baixas taxas de filtração glomerular. Estes

solutos retidos, responsáveis pela toxicidade urêmica no paciente renal crônico, podem ser potencialmente causadores de processos degenerativos (Carvalho, 1992).

Toxicidade Urêmica

A toxicidade urêmica gera perda progressiva da filtração glomerular, segundo a qual os rins perdem a capacidade de remoção de compostos potencialmente tóxicos do fluxo de sangue na urina, resultando no seu acúmulo no organismo (Vanholder & De Smet, 1999; Vanholder *et al.*, 2001). Estes solutos podem deteriorar as funções bioquímicas e fisiológicas e as consequências desta deterioração definem a síndrome urêmica ou uremia (Coughi *et al.*, 2012). O resultado desse acúmulo gera compostos que são chamados coletivamente de solutos de retenção urêmica e se eles são biologicamente e/ou bioquimicamente ativos, são chamados de toxinas urêmicas. Vários solutos de retenção urêmica são tóxicos e podem influenciar negativamente as funções biológicas tais como o indoxilsulfato, o *p*-Cresol (pC) e o *p*-cresilsulfato (pCS) (Figura 1), enquanto outros compostos não têm necessariamente toxicidade direta, porém podem ser marcadores úteis de função renal tais como a creatinina (revisto por Vanholder *et al.*, 2008). As toxinas, por sua vez, tem um impacto negativo sobre muitas funções do corpo e resultam em intoxicação progressiva e endógena. As toxinas urêmicas, especialmente aquelas ligadas às proteínas, parecem desempenhar um papel fisiopatológico importante durante a progressão da DRC, uma vez que são difíceis de ser removidas por diálise (Vanholder *et al.*, 2011).

Dados da literatura revelam pelo menos 90 solutos relacionados à retenção na uremia (Vanholder *et al.*, 2003). É muito provável que esta seja apenas a ponta do *iceberg*, considerando que um estudo utilizando sofisticada análise proteômica revelou a presença de pelo menos 1000 destes solutos em ultrafiltrado de doentes em diálise. Este tipo de análise proteômica representa uma nova e promissora ferramenta em que todos os peptídeos presentes podem ser registrados e potencialmente identificados, oferecendo a possibilidade de encontrar novos solutos urêmicos (Weissinger *et al.*, 2004).

Os solutos de retenção urêmica foram arbitrariamente subdivididos de acordo com sua massa molecular (Vanholder *et al.*, 1994; 1999) e este critério atualmente é aplicado na maioria das vezes. Ainda, estes solutos podem ser classificados com base nas características físico-químicas das moléculas, que influenciam sua remoção por diálise (Vanholder *et al.*, 2003). Assim, três grandes grupos podem ser identificados (Tabela 2): (i) Pequenos compostos solúveis em água, cujo peso molecular é arbitrariamente definido como 500 Da no máximo. Os protótipos são uréia e creatinina, que são facilmente removidos por qualquer estratégia de diálise. Compostos deste grupo não têm necessariamente uma atividade tóxica marcante. (ii) Moléculas solúveis médias que possuem peso molecular fixado em mais de 500 Da (chegando a 15000 Da), sendo o protótipo a beta-2-microglobulina que pode ser responsável por toxicidade direta. Estas moléculas só podem ser removidas por diálise peritoneal ou por outras estratégias de diálise que empregam dialisador com membranas contendo poros grandes o suficiente para permitir que as mesmas os atravessem (Ledebro, 1998). (iii) Solutos ligados às proteínas com qualquer peso molecular cujos protótipos são os fenóis e indóis. Este grupo de solutos urêmicos é responsável por um grande número de complicações fisiopatológicas, pois muitos deles possuem atividade tóxica e são difíceis de eliminar pela maioria das estratégias de diálise disponíveis atualmente, incluindo a diálise de alto fluxo (Lesaffer *et al.*, 2000). Particular interesse tem sido despertado na literatura recente a respeito da atividade tóxica no sistema imune

de alguns fenóis, especialmente do pC e seus subprodutos (p-cresilsulfato e p-cresilglucoronidato), moléculas que integram este grupo (Vanholder *et al.*, 1999).

Tabela 2: Classificação dos solutos de retenção urêmica

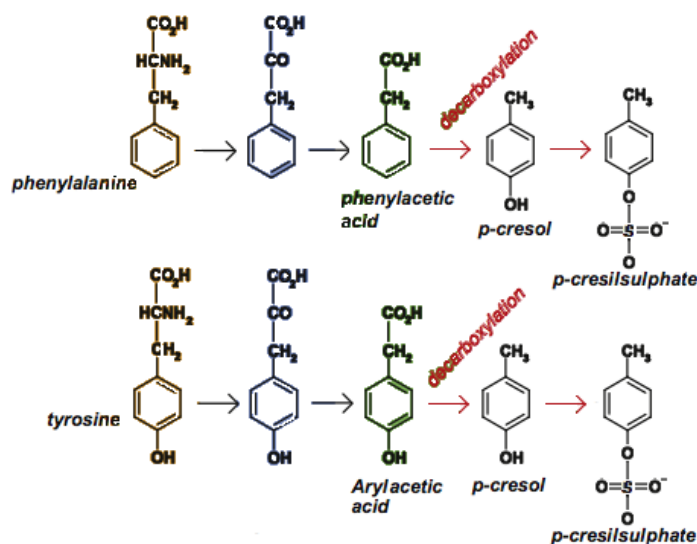
Classificação	Características	Protótipos	Toxicidade
Moléculas pequenas solúveis em água	PM < 500 Da, facilmente removido por estratégias de diálise.	Uréia e creatinina	Não necessariamente tóxicas.
Moléculas médias	PM > 500 Da, removidas somente com membranas de grandes poros.	B2-microglobulina	Efeitos biológicos
Moléculas Ligadas à proteínas	Qualquer PM, difíceis de remover com qualquer estratégia de diálise.	Fenóis e Indóis	Amplos efeitos biológicos

PM = peso molecular. Adaptado de Vanholder *et al.*, 2008.

p-Cresol e seus subprodutos

O pC e seus subprodutos, da família dos fenóis, são derivados dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, compostos normais da nossa dieta, e quimicamente caracterizados por uma estrutura de anel cíclico contendo seis átomos de carbono, no qual pelo menos um grupo hidroxila está ligado. O pC é, portanto, um fenol caracterizado por um grupo metil na posição para e é fisiologicamente metabolizado a partir de proteínas alimentares (que contêm aminoácido tirosina) até ácido 4-hidroxifenilacetico, o qual é descarboxilado gerando o pC (Figura 1). Este processo fisiológico de metabolização do pC ocorre na luz intestinal e é executado pela flora bacteriana normal, sendo assim absorvido pelos enterócitos, caindo na corrente sanguínea. Sendo assim, pessoas saudáveis, não renais crônicos, possuem níveis sanguíneos de pC de 1 µg/ml de sangue (Faure, *et al.*, 2006), o qual será eliminado por uma filtração glomerular normal.

Figura 1: Fórmula estrutural da formação de p-Cresol e p-Cresilsulfato



Adaptado de Clayton, 2012

Outra informação relevante sobre o pC é que esta molécula quando livre não é solúvel no plasma, somente quando ligada à proteína é que esta se solubiliza, sendo que a proteína mais comumente ligada a este composto é a albumina. O pC pode ainda ser sulfatado na flora intestinal por bactérias que contêm sulfatases citosólicas, o que também o torna solúvel, gerando o pCS. Além disso, uma fração menor do pC também pode ser metabolizado no fígado em p-Cresilglucoronidato, o qual ainda não têm quantificação direta e avaliação por seu impacto biológico (Martinez *et al.*, 2005; De Loor *et al.*, 2005; Schepers *et al.*, 2007). Por isto, as concentrações sanguíneas do pC propriamente dito devem ser muito baixas, uma vez que a sua forma solúvel mais comum é o pCS ou o pC ligado à albumina, e estes sim devem estar em concentrações um pouco maiores. A dificuldade em se determinar as concentrações plasmáticas de pC livre ou conjugado está no fato de que, para se proceder a sua determinação, há necessidade de acidificação do meio a fim de desliga-lo da albumina. Sendo assim, não se sabe, ao final do método de determinação de sua concentração, a fração que estava conjugada e aquela que estava livre (Schepers *et al.*, 2007).

Em pacientes com DRC, o pC se acumula por aumento da produção intestinal e também por perda da filtração glomerular. Segundo Vanholder e colaboradores, 1999 na uremia, modificações na flora intestinal devido ao estado inflamatório

peculiar destes pacientes, resultam em uma proliferação específica de bactérias que são mais produtoras de pC. Além disso, fatores ambientais, substâncias derivadas de plantas e medicamentos alternativos ou tradicionais, aos quais estes pacientes podem estar submetidos, podem ser fontes adicionais de fenóis e consequentemente de pC, aumento por si só a produção do mesmo (Vanholder *et al.*, 2011). Agravando este fato, as baixas taxas de filtração glomerular destes pacientes parecem não ser o suficiente para eliminar a aumentada produção deste soluto.

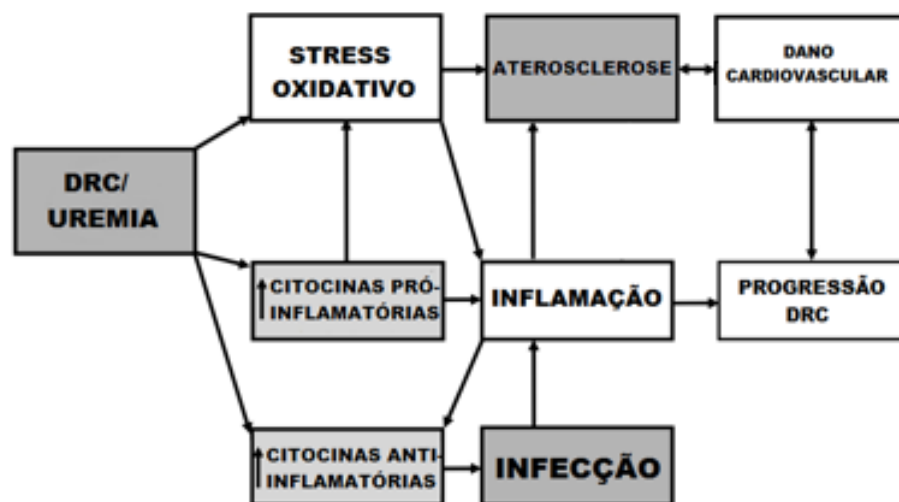
Embora a maioria das pesquisas pioneiras sobre os compostos fenólicos tenha incidido sobre a concentração e a toxicidade do pC, sabe-se hoje que o p-Cresol propriamente dito está presente apenas em concentrações muito baixas também em pacientes com DRC, uma vez que as suas formas plasmáticas mais comuns são a conjugada a albumina e a sulfatada (pCS). Praticamente todas as determinações de concentração de p-Cresol em soro de pacientes renais foram realizadas após forte acidificação para proceder a esta desproteinização. Autores tem relatado uma concentração de pC em pacientes renais crônicos terminais girando em torno de 50 µg/mL (Faure *et al.*, 2006). Estudos demonstram que apenas 30% do pC é removido na diálise, enquanto a uréia e creatinina tem 70% de remoção. Esses dados sugerem que o pC conjugado não consegue ser eliminado e que mesmo nos pacientes em diálise este composto se acumula, promovendo ação nociva permanentemente (Lesaffer *et al.*, 2000).

O pC e seus subprodutos parecem estar envolvidos em diversas formas de toxicidade direta, especialmente quando se fala em alterações no sistema imune. Estudos demonstram que estes solutos podem estar envolvidos na depressão imune por reduzir a produção de radicais livres por fagócitos (De Smet *et al.*, 1998; Vanholder *et al.*, 1995). Ainda outros trabalhos indicam que os efeitos bioquímicos do p-Cresol livre não são necessariamente os mesmos que os do conjugado ou sulfatado. O pC parece suprimir a atividade dos leucócitos, já o pCS, contrariamente ao que acontece com o pC, parece ter sua ação ligada à ativação dos leucócitos, fato este que foi determinado pelo aumento do *burst* oxidativo (Schepers *et al.*, 2007). O pC e seus subprodutos parecem influenciar diretamente

na reparação do endotélio vascular e os mecanismos para este fim permanecem ainda desconhecidos. Esta toxina parece modificar a organização do citoesqueleto de actina em células endoteliais, inibindo a mitose, o que leva a crer que o seu efeito inibitório sobre a proliferação de células endoteliais e de reparação da ferida podem ser relacionadas, em parte, aos seus efeitos sobre o citoesqueleto de actina endotelial (Dou *et al.*, 2004).

A DRC está invariavelmente associada com o aumento do stress oxidativo e dano endotelial e com um estado peculiar de inflamação sistêmica com perda do equilíbrio entre a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias. Estes dois fatores parecem ser os principais fatores de risco para o surgimento e a progressão da aterosclerose e, conseqüentemente, da DCV. Além disso, estes pacientes podem estar mais susceptíveis às infecções, sendo que tudo isto pode contribuir para o agravamento da própria DRC (Figura 2). Em vista disso, pacientes renais crônicos com altas taxas de pC acabam por agravar este desequilíbrio do processo inflamatório, do stress oxidativo e do reparo do dano endotelial pela própria toxicidade desta substância, contribuindo para o surgimento e progressão de comorbidades, tais como a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares.

Figura 2: Fluxograma da doença renal crônica



Adaptado de Coughi *et al.*, 2012

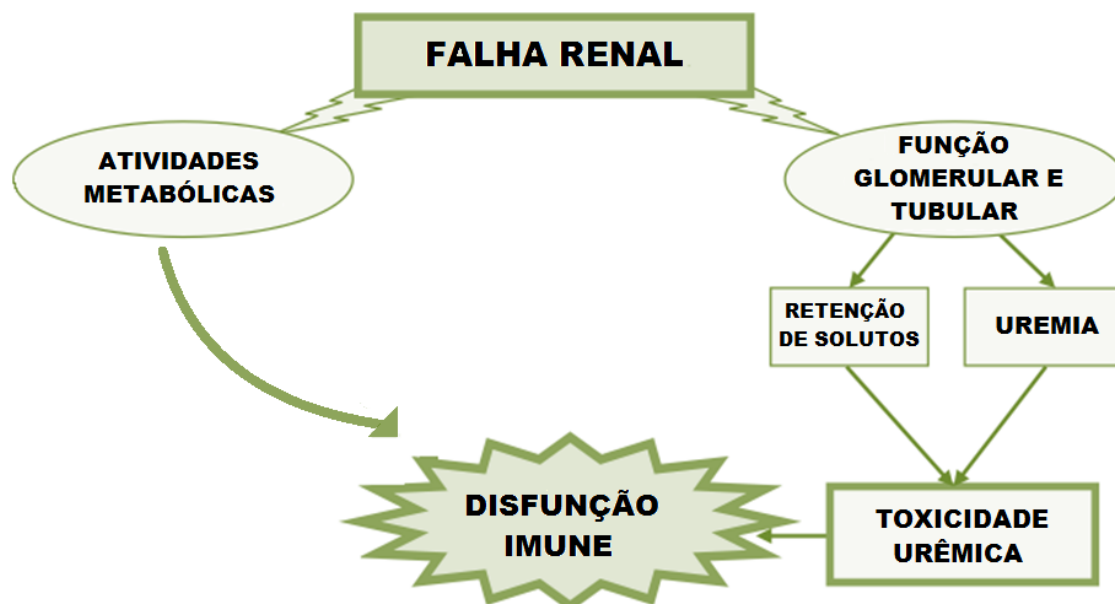
A fractalcina foi identificada como um marcador plasmático do desequilíbrio

inflamatório causado pelo pC. A fractalcina é uma quimiocina que promove o recrutamento de leucócitos através do receptor transmembrana CXCR1. Demonstrou-se, em processos inflamatórios, a elevação dos níveis plasmáticos da fractalcina relacionados à presença do p-Cresol em concentrações urêmicas (Faure *et al.*, 2006).

Disfunções imunes na DRC

A DRC em estágio terminal é caracterizada, do ponto de vista imunológico, por distúrbios da imunidade inata e da imunidade adaptativa, que geram um complexo e ainda não totalmente compreendido desequilíbrio da função imune. Esses pacientes apresentam uma crônica ativação do sistema imunológico, que pode ser observada através do aumento das concentrações plasmáticas de proteína C reativa (PCR) e de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e anti-inflamatórias (como IL-4 e IL-10). Além disso, os pacientes também respondem mal a vacinação e a desafios como infecção bacteriana, já que apresentam uma diminuição de fagocitose pelos neutrófilos. Esse processo de inflamação crônica e de imunodeficiência aumenta a incidência de processos degenerativos tais como a aterosclerose e também influencia negativamente nas taxas de infecção (Figura 3) (Hauser *et al.*, 2008; Karkar, 2008; Cohen & Hörl, 2012).

Figura 3: Disfunção Imune causada por múltiplos fatores



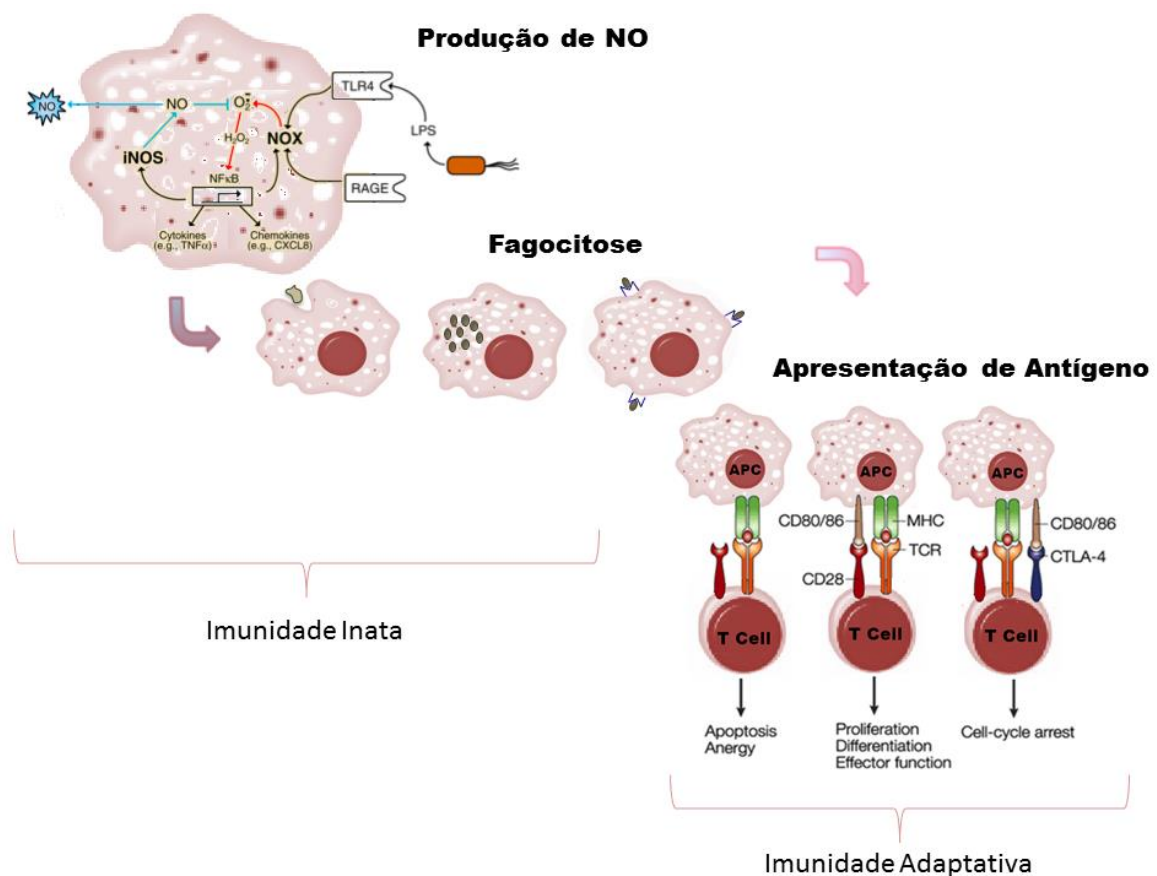
A inflamação associada à DRC é devido a esta ativação do sistema imune inato, orquestrada por monócitos, macrófagos, granulócitos e constituintes celulares de quase todos os órgãos e tecidos do corpo. A deficiência imunitária geral é causada pela depleção das células apresentadoras de antígeno, as células T de memória e as células B, e pela capacidade fagocítica diminuída dos monócitos e dos polimorfonucleares (Vaziri *et al.*, 2012).

As citocinas pró-inflamatórias têm papel importante no recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, e como citado anteriormente, elas estão aumentadas no paciente com DRC. Uma das funções de citocinas como TNF- α e IL-1 β é a indução da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais, promovendo o rolamento e a internalização das células imunes da corrente sanguínea para os tecidos. No entanto, mesmo com o aumento da secreção dessas citocinas, a presença de toxinas urêmicas, como o p-Cresol, parecem diminuir a expressão de algumas dessas moléculas de adesão, como por exemplo I-CAM e V-CAM pelas células endoteliais, impedindo a adesão das células imunes (Dou *et al.*, 2002). Por outro lado, reforçando a tese do aumento da migração celular em condições urêmicas, estudos com pacientes em diálise mostram que após os primeiros minutos de sessão dialítica, os monócitos ativados aderem rapidamente ao endotélio, evidenciando que no âmbito da DRC, múltiplos fatores agem sobre o sistema imune (Girndt *et al.*, 2001).

A apresentação de antígenos corresponde a um dos principais eventos da iniciação da resposta imune inata para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa ou específica (Figura 4). As células apresentadoras de antígenos (APCs), monócitos/macrófagos e células dendríticas por exemplo, oferecem ao menos dois sinais essenciais para ativação da célula T. O primeiro sinal antígeno-específico é mediado pela apresentação de antígenos derivados de peptídeos nas moléculas HLA de classe I ou II que são reconhecidos pelo receptor de célula T (TCR) específico. Este sinal é acompanhado por um segundo sinal, ou co-estimulação, mediado por moléculas de CD80 ou CD86 que por sua vez são reconhecidos pela molécula CD28 presente constitutivamente na superfície das células T. A apresentação na ausência de um destes sinais pode levar a não

resposta ou mesmo a anergia da célula T (Bhatia *et al.*, 2006). Uma das principais características do comprometimento imunológico no ambiente urêmico é a redução da co-estimulação pelas células apresentadoras de antígenos. Foi observado em pacientes com DRC que não há diminuição da expressão de moléculas HLA de classe II nos pacientes em relação a controles saudáveis, no entanto, foram encontradas significantes diminuições na expressão de CD86, uma das mais importantes moléculas co-estimulatórias na ativação de células T (Girndt *et al.*, 1999).

Figura 4: Processo Imunológico protagonizado pelos macrófagos



Fonte: O autor

Finalizando, existem fortes evidências de que desordens tanto no sistema imune inato quanto no sistema imune adaptativo contribuem para o aumento na taxa de infecção no curso da DRC, bem como no surgimento e progressão da própria doença e de suas co-morbidades (Kato *et al.*, 2008).

HIPÓTESE E OBJETIVOS

Estudos recentes sugerem que o desequilíbrio do processo inflamatório em pacientes com DRC pode contribuir para a progressão da doença e que parece ser fator importante no prognóstico desses pacientes. Além disso, parece haver uma forte associação entre o desequilíbrio imune e a uremia através da presença de altas concentrações de toxinas urêmicas, dentre elas o p-Cresol e p-Cresilsulfato. A partir deste cenário o intuito do presente trabalho foi de:

OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta funcional de macrófagos derivados de monócitos promovida pelas toxinas urêmicas pC e pCS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a citotoxicidade de pC e pCS sobre os macrófagos.
2. Avaliar a produção de NO por macrófagos quando desafiados com pC ou pCS.
3. Avaliar o processo de fagocitose promovida pelos macrófagos em meio contendo as toxinas pC e pCS.
4. Avaliar a resposta de apresentação antigênica pelos macrófagos quando em meio contendo as toxinas urêmicas pC ou pCS.

ARTIGO

Esta dissertação será apresentada na forma de artigo, intitulado: **p-Cresol and p-Cresylsulphate affects the oxidative burst, phagocytosis process and antigen presentation on monocyte-derived macrophages: potential link between uremia and adaptive immune dysfunction**, a ser submetido à revista *NDT – Nephrology Dialysis Transplantation*. O artigo está formatado conforme normas de submissão exigidos pela revista.

p-Cresol and p-Cresylsulphate affects the oxidative burst, phagocytosis process and antigen presentation on monocyte-derived macrophages: potential link between uremia and adaptive immune dysfunction.

Azevedo MLV¹, Bonan NB¹, Bortolini BM¹, Brehm F¹, Steiner TM¹, Souza WA²,
Stinghen AE³, Barreto FC¹, Pecoits-Filho R¹, Moreno-Amaral AN^{1*}

¹ School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

² Laboratory of Pharmacognosy, Department of Pharmacy, UFPR, Brazil

³ Basic Pathology Department, Laboratory of Experimental Nephrology, UFPR,
Brazil

* Correspondent author

School of Medicine – PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1500

Prado Velho – Curitiba – Paraná

CEP: 80215-901

ABSTRACT

Background: The immune system in chronic kidney disease (CKD) is characterized by disorders on immune activation established by an increased susceptibility to infections and poor response to vaccination. The aim of this study was to investigate the role of uremic toxins p-Cresol (pC) and p-Cresylsulphate (pCS) on nitric oxide (NO) production, phagocytosis and antigen presentation marker expression on U937 monocyte derived-macrophage (MDM). **Methods:** MDM was incubated with pC or pCS and NO production was evaluated through DAF-FM incubation. Phagocytosis was evaluated after stimuli incubation by engulf of fluorescent beads. Cell surface markers expression related to antigen presentation were evaluated using mAb anti -HLA-ABC-FITC, -HLA-DR-PE, and to co-stimulatory molecules using -CD80-FITC and -CD86-PE. All analysis was made by flow cytometry. **Results:** Our results showed that both uremic toxins were able to induce increase in NO production and phagocytosis by MDM, but only with lower and intermediate concentrations. The maximum concentration of both toxins **was not able** to induce any changes in the cells baseline. Also, pC and pCS were able to increase HLA-ABC and CD80 expression in the same level when compared to the LPS. Interestingly, pC and pCS showed slight effect on HLA-DR expression. Equally results were observed for CD86, where basal expression was the same after MDM incubation with pC or pCS. **Conclusions:** Our results suggest that the uremic toxins can induce macrophage dysfunction causing increase oxidative stress and also an important factor for the increased incidence of infections in uremia, since no modulation on HLA-DR and CD86 expression, suggesting a possible negative signal to T cells during antigen presentation.

KEYWORDS: Innate Immune Response; Monocyte-derived Macrophage; Protein-bound molecules; Uremia; Uremic Toxins

INTRODUCTION

The uremic toxicity is caused by the progressive decline in the kidney function, resulting in the accumulation of potentially toxic compounds in the body with biological and/or biochemical activity, that are collectively called uremic retention solutes or uremic toxins [1,2]. Various of these compounds are toxic and can adversely affect the biological functions, such as indoxyl sulfate and p-Cresylsulphate (pCS), while others are not necessarily direct toxicity, but may be useful markers of renal function such as creatinine [3]. The uremic toxins can be classified according to their physicochemical characteristics and removal by dialysis in three main groups: small water-soluble, middle molecules and protein-bound compounds [4,5]. The later compounds have gain great interest in the last few years, since (i) they have been linked to a large number of uremic complications and (ii) they are difficult to remove by dialysis [6]. Phenols and indoles are considered prototypes of this group of compounds. pC and its conjugated-products are generated from tyrosine and phenylalanine metabolism by bacterial microbiota fermentation in the large intestine. pCS levels increase with the worsening of renal function [7] and, as pC, have been associated with imbalance of the immune system response, atherosclerosis and cardiovascular disease [8,9]. Studies have also shown that these solutes may be involved in immune depression by reducing the production of free radicals by phagocytes [10, 11]. Studies indicate that the biochemical effects of free pC are not necessarily the same as the sulfated conjugate, since pC appears to suppress the oxidative burst activity of leukocytes while pCS seems to induce leukocytes activation [12].

The disturbances of the immune system in CKD patients are accompanied by susceptibility to infections and unresponsiveness to vaccination. These events are initiated by antigen presenting cells (APCs), monocytes/macrophages and dendritic cells that provide at least two essential signals for T cell activation. The first signal is the engagement of the antigen-specific T-cell receptor (TCR) by the major histocompatibility complex (MHC) class I or II antigen-peptide complex. This signal is followed by a second signal or co-stimulation mediated by CD80 or CD86 molecules, which in turn are recognized by the CD28 molecule present

constitutively on the T cell surface. The presentation in the absence of one of these signs can lead to non-response or T cell anergy [13]. Although adaptive immunity makes a significant contribution in the CKD disturbances, innate immunity, mainly monocytes and neutrophils, play an important role [14,15]. Monocytes isolated from HD patients express less MHC class II molecules than those from healthy individuals and their expression is impaired after stimulation [16,17]. Still, these immune disturbances may be caused partially by the co-receptors CD80/CD86, since through flow cytometry was showed that CD86 expression in monocytes obtained from HD patients is decreased. Clinically, CD86 expression correlates with poor immune response to hepatitis B virus (HBV) vaccination in dialysis patients. In addition, CD80 expression does not differ between HD patients and healthy subjects [18]. Even though the disturbances observed in HD patients involve mainly the APC and consequently T-lymphocytes, many pieces are missing to complete the puzzle of the immune response in CKD. A better understanding of the causes of the immune system dysfunction is necessary to lead to increased survival and better quality of life in HD patients. Thus, this study aimed to evaluate the monocyte-derived macrophages (MDM) response to uremic toxins pC and pCS, as well as determine the cellular events involved in the innate immune response of CKD. The identification of specific pathways of immune response process to CKD may help identify new targets for treatments to potentially reduce the morbidity and mortality of these patients.

MATERIAL AND METHODS

U937 cell culture, differentiation and stimulation - Human monocytic cells line U937 were maintained in RPMI 1640 medium (Gibco BRL) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) 100 IU/ml penicillin and 0.1 µg/ml streptomycin in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C and cell viability was estimated with trypan blue dye. To monocytes cell line U937 differentiation into adherent macrophages (monocyte-derived macrophage – MDM), cells were (1x10⁶ cells/ml) cultured in the presence of 150 nM PMA (Sigma) [19] for 48h at 37°C. After incubation, cells were kept on incubator for more 48h

only in RPMI supplemented with 2% FBS (2% RPMI) (resting). To stimulation, MDM were incubated with minimum (10 µg/ml), intermediate (25 µg/ml) and maximum (50 µg/ml) concentrations of p-Cresol (pC) reported in HD patients [1]. p-Cresylsulphate (pCS) was synthesized as a potassium salt as described previously [20] and was used in the same concentrations of pC. Each concentration for both uremic toxins was analyzed in presence or absence of LPS (1 ng/ml) and for positive control cells were incubated only with LPS (1 ng/ml). Negative control was obtained from cells that were incubating only with 2% RPMI.

Cytotoxicity Assay (MTT) – 96-well plates containing stimulated MDM were added MTT (Sigma, 5 µg/ml: (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) for 3h incubation at 37°C. Cells were lysed with DMSO (Sigma) and analyzed on microplate reader at 550nm. MDM viability in response to toxins treatment was calculated as: (OD Control – OD treated/OD Control) x 100.

Oxidative Stress Production by Intracellular Nitric Oxide Detection (NO) - After stimulation cells were stained with DAF-FM, at the dark for 40 min at 37°C, washed with PBS and incubate with RPMI for 30 min at 37°C to allow complete de-esterification of intracellular diacetates. Cells were analyzed by flow cytometry (FACs Calibur).

Phagocytosis Assay - Stimulated MDM were incubated fluorescent beads (FluoSpheres® polystyrene Invitrogen - Molecular Probes) for 4h at 37°C, washed 3 times with PBS fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. Cells were analyzed by flow cytometry (FACs Calibur).

Antigenic Presentation Molecules Markers on MDM surface - Stimulated MDM were stained with HU anti-HLA-DR PE (marker of MHC-II molecule); HU anti-HLA-ACB FITC mAb (to mark MHC-I molecule); HU anti-CD80 FITC mAb and HU anti-CD86 PE mAb (markers of co-stimuli molecule) for 45 min at 4°C. All reagents

were acquired from BD Bioscience. Cells were analyzed by flow cytometry (FACs Calibur).

Statistical Analysis - All results are reported as percentage or mean $\pm$ standard deviation (SD). The differences were analyzed by parametric (ANOVA and t-test) or non-parametric (Mann-Whitney and Kruskal-Wallis) methods, as appropriate. Statistical analyzes were performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 13.0 for Windows. Results were considered significant with $p < 0.05$.

RESULTS

Effect of pC or pCS on MDM viability

To measure the metabolic activity of viable cells, MTT reduction was evaluated after 24h incubation with all pC or pCS concentrations. No cytotoxic effect was observed after incubation with both toxins at any concentration tested when compared to the control (Fig 1). The intermediate concentration of pC showed a tendency to increase cell proliferation when compared to control (Fig 1). Thus, both uremic toxins had no cytotoxic effect on MDM after 24h of incubation.

Effect of pC and pCS on NO production by MDM

The NO production was evaluated after 6 or 12h incubation with both toxins with or without LPS. The lowest concentration (10 $\mu\text{g/ml}$) caused a significant increase in intracellular NO production, while the intermediate and maximum concentrations (25 and 50 $\mu\text{g/ml}$, respectively) led to an increase NO production, but in a lesser degree when compared to the lowest one, in a time-dependent manner (Fig 2A). In the presence of LPS, (i) the lowest and the intermediate concentrations of pC induced a stimulation of NO production similar to that observed after 6h of incubation, and a decrease of the NO production after 12h of incubation by MDM; while (ii), the highest pC concentration was able to induce NO production but was less pronounced compared to the lower concentration at any time evaluated (Fig 2B). The analysis of the same incubation protocol with pCS after 6h showed the

NO production by MDM was less pronounced (Fig 2C) compared to that observed at lower concentrations of pC (Fig 2A). After 12h the lowest concentration of pCS increased the NO production similar to that observed for LPS, but higher concentrations did not cause the same effect (Fig 2C). Again, as observed for pC (Fig 2B), in the presence of LPS combined with pCS the NO production was to a lesser extent than that observed in lowest concentrations (Fig 2D).

Evaluation of phagocytosis induced by pC and pCS

MDM incubated with all stimuli described above were evaluated through phagocytic activity after 12h of incubation. LPS induced a significant increase of phagocytosis (25%) as compared to the negative control. In the same way, the lowest concentration of pC (10 µg/ml) induced 30% of phagocytosis and the intermediate concentration (25 µg/ml) promoted 26%. There were a lower proportion of phagocytized-beads by MDM (18%) after incubation with the maximum pC concentration (50 µg/ml) and this less activity was significant when compared with the lowest concentration (Fig 3A). A decrease in phagocytic capacity of MDM was also observed with increasing pCS concentrations, as observed by 23% of phagocytized-beads in the highest concentration (Figure 3A). Similar results were found when pC were associated with LPS in the MDM incubation, being the highest increase in phagocytosis at the lowest concentration of pC (35%) (Fig 3B). Otherwise, in the presence of LPS all concentrations tested of pCS showed a similar capacity of inducing phagocytosis by MDM, but lower when compared with toxin isolated and smaller when compared to pC (Fig. 3B).

Expression of antigen-presenting molecules on MDM induced by uremic toxins

The expression of surface molecules HLA-DR, HLA-ABC, CD80 and CD86 was determined by flow cytometer. The baseline expression of HLA-ABC was observed on non-activated MDM. After incubation with LPS, pC or pCS (50 µg/ml), its expression increased approximately 2 times compared to the negative control. The presence of both toxins (pC or pCS) was not resulted in an amplification

expression of HLA-ABC when combined with LPS (Table 1). On the other hand, when evaluating the expression of HLA-DR, we observe that toxins, pC or pCS promoted a 1-fold increase HLA-DR expression compared to the negative control, while LPS induces nearly 2-fold increase of this molecule on MDM cells surface. Interestingly, when we added LPS to the toxins incubation, no additive effect was observed on HLA-DR expression (Table 1).

Surface molecules CD-80 and CD-86 are expressed as co-stimulation on antigen-presenting cells (APCs). Our results show that MDM cells exhibit low basal expressions of these markers, but their expressions were increased when stimulated with LPS (Table 1). Regarding CD80 expression, both toxins were capable of inducing its expression; while no additive effect was observed when toxins were incubated in association with LPS (Table 1). When the CD86 expression was evaluated, as expected LPS has important action in the induction this marker expression, around 2 times compared to negative control. However, none of uremic toxin (pC or pCS) was able to induce increased CD86 expression when compared to the negative control, even in the presence of LPS (Table 1).

DISCUSSION

There are several factors that may influence the immune dysfunction in patients with CKD, such as aspects related to uremic toxins or to dialysis process, vitamin D deficiency and constant systemic inflammatory state, mainly characterized by elevated CRP and albumin. In addition, there is also evidence of an association between increased susceptibility to infections, endothelial damage (due to exacerbation of proinflammatory cytokines) [21], apoptosis of leukocytes [22,23] and expanded CD14+/CD16+ monocytes population with decreased HLA-DR expression [24] into the inflamed state in patients with CKD. One hypothesis is that the immune system recognizes the uremic state as a continuous injury to cells and tissues causing immune dysfunction, which can be closely related to inflammation and infection. In this context, it has been suggested that uremic toxins may play a part in this contradictory profile that the immune system shows in patients with CKD, on the one hand a constant inflammatory condition [25,26] and, otherwise an

immunosuppression in innate immune response [27,28]. The uremic toxins pC and pCS are involved in cellular events related with innate immune response and CKD progression. Both uremic toxins used in this study were not considered cytotoxic to the MDM after 24 h incubation with the same plasma concentrations found during disease progression [1,29]. None apoptosis assay was used in this study, but based on the viability result we could demonstrate that no changes in cellular respiration of these cells were induced by pC or pCS and, therefore, no biological activity has been changed due to cell death.

Furthermore, our results demonstrate that both uremic toxins tested, pC or pCS, in lowest concentrations (10 and 25 µg/ml) and low exposure time (6 hours) induce NO production by MDM in a manner similar to that seen with macrophages activated only with LPS. Interestingly, when highest concentration of toxins (50 µg/ml) was evaluated, the oxidative stress response by MDM was comparable to those obtained with non-activated MDM. Nonetheless, the most interesting result was observed after MDM-incubated with the toxins combined with LPS, since both pC as well pCS have the inductive action in NO production by MDM inhibited in the presence of LPS. One of the most important function of macrophages in the immune response it is the ability to phagocytize foreign particles and this ability is related to the kidney function [30]. Studies show decreased phagocytosis by macrophages when challenged with either pC, as when incubated in uremic serum [31,32]. However, contrary to found in the literature, the minimum and intermediate concentrations of pC and pCS, were able to promote increased phagocytosis compared to the negative control and similar to the LPS-activated MDM, and again, decrease of this function was only observed in the highest concentration and when combined with LPS.

Schepers and cols [12] using only the maximum concentration for both toxins, showed that pCS enhanced the percentage of free radical producing by leukocytes and this result was more relevant than that demonstrated by pC, which was inert at baseline. The non-stimulated release of reactive oxygen species (ROS) and superoxide (SO) is increased in patients on dialysis and it represents a pre-stimulation of leukocytes [33-35]. The release of ROS antigen-dependent

manner is, however, decreased in all patients with CKD [33-34, 36-37]. The ROS production induced by mitogens such as phorbol myristate acetate (PMA) is also reduced in patients on hemodialysis [30]. The maximum concentration of pC or pCS found in the patient's plasma with CKD coincides with the progression of the disease. In the other hand, the increased production of NO and other reactive oxygen species lead to an innate immunity pre-activation, which is responsible for the chronically inflammatory state, so characteristic in these patients [25]. Our results demonstrate that early toxins accumulation induce an exacerbated immune response by macrophages observed by NO production and phagocytic ability. In the course of disease progression and, consequently, more toxins accumulation, innate immunity undergoes immunosuppression, leaving respond to stimuli known as LPS. Some studies have shown the inability of macrophages to promote phagocytosis after contact with uremic toxins, however the mechanism involved in the reduction of this capacity is still unknown [32,38].

The most dramatic changes in cellular immunity in patients with CKD are observed in T lymphocytes and antigen presenting cells (APC). The present study observed baseline expression of HLA-DR (MHC class II) on macrophages challenged with pC and pCS (50 µg/ml) compared to LPS-activated MDM. Moreover, even pC or pCS combined with LPS were not able to promote increased HLA-DR expression similar to that observed with LPS. According with Girndt and cols [18], the surface expression of molecules involved in antigen presentation may be compromised in CKD patients. Stachowski and cols [17] also described the reduction of HLA-DR expression in cells from CKD patients and also supported by Agrawal and cols [39]. The expression of HLA-ABC (MHC class I), constitutive of all nucleated cells, were increased on MDM surface after stimuli with both toxins pC and pCS, compared to LPS-stimulated MDM. This result is also reported by other studies that show that MHC class I are not altered in CKD patients, which is the opposite for MHC class II [39,40].

The costimulatory molecules CD80 and CD86 correspond to the second specific signal in antigen presentation. Our results show that both toxins pC and pCS associated or not with LPS, induced an increase in CD80 expression on MDM

surface comparable with the LPS stimulus. Otherwise, as expected the CD86 expression was significantly increased after LPS stimulus, but not altered by pC or pCS challenge. Lim and cols [41] observed that uremic serum from hemodialyzed patients decreased the expression of costimulatory molecules on monocytes after stimulation with LPS *in vitro*, corroborating our findings. The failure of immune function in CKD patients by deficiency of costimulatory signal has been observed in several studies as reviewed by Eleftheriadis and cols [40].

Concisely, the functional disorders of the immune system that are found in uremia can lead to an imbalance in the production of reactive oxygen species and the process of phagocytosis in the early stages of the disease, a fact revealed in our study with the increased production of free radicals and phagocytosis related with challenges in minimum and intermediate doses of toxins pC and pCS. This could, at least partially, explain the constant inflammatory state present in uremia. With CKD progression and consequent accumulation of toxins, this state can be change. Our results suggest the maximum dose of pC and pCS promoted a decreased in NO production and phagocytosis process, which maybe could lead the patient to a decreased inflammatory response against bacteria, increasing their susceptibility to systemic infections. We can also note that can occur erroneous communication between cells involved in antigen presentation and T cells in patients with CKD. In the present study, the toxins pC and pCS decreased expression of HLA-DR and CD86 on maximum doses, suggesting a possible negative signal to T cells during antigen presentation in advanced stages of CKD. With this, patients with CKD may show decreased biological function of antigen presentation leading to increased susceptibility to bacterial infections.

REFERENCES

1. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003; 63(5): 1934–1943.
2. Yavuz A, Tetta C, Ersoy FF, D'intini V, Ratanarat R, De Cal M, Bonello M, Bordoni V, Salvatori G, Andrikos E, Yakupoglu G, Levin NW, Ronco C.

Uremic toxins: a new focus on an old subject. *Semin Dial* 2005; 18(3): 203-211.

3. Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol* 2008; 23(8): 1211–1221.

4. Vanholder R, De Smet R, Hsu C. et al. Uremic toxicity: the middle molecule hypothesis revisited. *Semin Nephrol* 1994; 14: 205–218.

5. Vanholder R, De Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(8): 1815–1823.

6. Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(1): 50–57.

7. Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Protein-bound uremic toxins: new insight from clinical studies. *Toxins (Basel)* 2011; 3(7): 911-919.

8. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-Cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 2004; 65(2): 442-451.

9. Vanholder R, Bammens B, de Loor H, Glorieux G, Meijers B, Schepers E, Massy Z, Evenepoel P. Warning: the unfortunate end of p-Cresol as a uraemic toxin. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(5): 1464-1467.

10. De Smet R, David F, Sandra P, et al. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-Cresol in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 1998; 278:1-21.

11. Vanholder R, De Smet R, Vogeleere P, Ringoir S. Middle molecules: toxicity and removal by hemodialysis and related strategies. *Artif Organs* 1995; 19: 1120–1125.

12. 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(2): 592–596.

13. Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett* 2006; 104: 70–75.
14. Haag-Weber M, Hörl WH. Uremia and infection: mechanisms of impaired cellular host defense. *Nephron* 1993; 63(2): 125-131.
15. Lewis DM, Tooke JE, Beaman M, Gamble J, Shore AC. Peripheral microvascular parameters in the nephrotic syndrome. *Kidney Int* 1998; 54(4): 1261-1266.
16. Stachowski J, Pollok M, Burrichter H, Spithaler C, Baldamus CA. Signalling via the TCR/CD3 antigen receptor complex in uremia is limited by the receptors number. *Nephron* 1993; 64(3): 369-375.
17. Stachowski J, Pollok M, Barth C, Maciejewski J, Baldamus CA. Non-responsiveness to hepatitis B vaccination in haemodialysis patients: association with impaired TCR/CD3 antigen receptor expression regulating co-stimulatory processes in antigen presentation and recognition. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9(2): 144-152.
18. Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney Int* 2001; 59(4): 1382-1389.
19. Picone R, Kajtaniak EL, Nielsen LS, Behrendt N, Mastronicola MR, Cubellis MV, Stoppelli MP, Pedersen S, Danø K, Blasi F. Regulation of urokinase receptors in monocytelike U937 cells by phorbol ester phorbol myristate acetate. *J Cell Biol* 1989; 108(2): 693-702.
20. Feigenbaum J, Neuberg CA. Simplified method for the preparation of aromatic sulfuric acid esters. *J Am Chem Soc* 1941; 63(12): 3529–3530.
21. Mansouri L, Paulsson JM, Moshfegh A, Jacobson SH, Lundahl J. Leukocyte proliferation and immune modulator production in patients with chronic kidney disease. *PLoS One* 2013; 9(8): 1-9.
22. Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ. Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia. *Kidney Int Suppl* 2001; 78: 197-205.

23. Cohen IR. T-cell vaccination for autoimmune disease: a panorama. *Vaccine* 2001; 12: 20(5-6): 706-710.
24. Nockher WA, Scherberich JE. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect Immun* 1998; 66(6): 2782-2790.
25. Cohen G, Hörl WH. Immune dysfunction in uremia - an update. *Toxins (Basel)* 2012; 24-4(11): 962-990.
26. 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(14): 1771-1779.
27. Lowrie EG, Lazarus JM, Mocelin AJ, Bailey GL, Hampers CL, Wilson RE, Merrill JP. Survival of patients undergoing chronic hemodialysis and renal transplantation. *N Engl J Med* 1973; 288(17): 863-867.
28. Mailloux LU, Bellucci AG, Wilkes BM, Napolitano B, Mossey RT, Lesser M, Bluestone PA. Mortality in dialysis patients: analysis of the causes of death. *Am J Kidney Dis* 1991; 18(3): 326-335.
29. Faure V, Cerini C, Paul P et al. The uremic solute p-Cresol decreases leukocyte transendothelial migration in vitro. *Int Immunol* 2006; 18:1453-1459.
30. Vanholder R, Ringoir S, Dhondt A, Hakim RM. Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: a prospective and cross sectional study. *Kidney Int* 1991; 39: 320-327.
31. Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(5): 1526-1533.
32. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr* 2012; 22(1): 149-156.
33. Sela S, Shurtz-Swirski R, Cohen-Mazor M, Mazor R, Chezari J, Shapiro G, Hassan K, Shkolnik G, Geron R, Kristal B. Primed peripheral polymorphonuclear leukocyte: a culprit underlying chronic low-grade inflammation and systemic oxidative stress in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(8): 2431-2438.

34. Sardenberg C, Suassuna P, Andreoli MC, Watanabe R, Dalboni MA, Manfredi SR, dos Santos OP, Kallas EG, Draibe SA, Cendoroglo M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(1): 160-165.
35. Adesso S, Popolo A, Bianco G, Sorrentino R, Pinto A, Autore G, Marzocco S. The uremic toxin indoxyl sulphate enhances macrophage response to LPS. *PLoS One* 2013; 30: 8(9): 1-12.
36. Cendoroglo M, Jaber BL, Balakrishnan VS, Perianayagam M, King AJ, Pereira BJ. Neutrophil apoptosis and dysfunction in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(1): 93-100.
37. Rao M, Guo D, Jaber BL, Tighiouart H, Pereira BJ, Balakrishnan VS. Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms and cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 66(1): 419-427.
38. Alexiewicz JM, Smogorzewski M, Fadda GZ, Massry SG. Impaired phagocytosis in dialysis patients: studies on mechanisms. *Am J Nephrol* 1991; 11(2): 102-111.
39. Agrawal S, Gollapudi P, Elahimehr R, Pahl MV, Vaziri ND. Effects of end-stage renal disease and haemodialysis on dendritic cell subsets and basal and LPS-stimulated cytokine production. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(3): 737-746.
40. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial* 2007; 20(5): 440-451.
41. Lim WH, Kireta S, Leedham E, Russ GR, Coates PT. Uremia impairs monocyte and monocyte-derived dendritic cell function in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; 72(9): 1138-1148.

LEGENDS

Figure 1 – Cytotoxicity analysis of pC or pCs was evaluated through MTT method. MDM (1×10^4 /well) were incubated for 24h at 37°C in 96-well plate in the presence of pC or pCS at 10, 25 and 50 μ g/ml. MTT was added and incubated for an additional 3h. After cell lysis, plates were read on microplate reader (550nm). Data are presented as % of MTT reduction of 5 independent experiments in triplicate (*p <0.05 vs. negative control).

Figure 2 – Evaluation of NO production by MDM. Cells (1×10^5 /ml) were incubated (A) with pC (10, 25 or 50 μ g/ml); (B) different concentrations of pC combined with LPS (1 ng/ml); (C) with pCS (10, 25 or 50 μ g/ml); and (D) different concentrations of pCS combined with LPS (1 ng/ml). Negative control was cells incubated only with 2% RPMI and positive control incubated only with LPS. Incubation was performed for 6 or 12h in an incubator. After incubation, was added DAF-FM for 30 min and then cells were evaluated by flow cytometer. Data are presented as % of Fluorescence of 5 independent assays (*p <0.05 and **p <0.01 vs. negative control).

Figure 3 – Evaluation of MDM phagocytosis induced by uremic toxins. Cells (1×10^5 /ml) were incubated with (A) pC (10, 25 or 50 μ g/ml) (dark gray bars) or pCS in the same concentrations (gray bars) or (B) both toxins pC (dark gray bars) or pCS (gray bars) associated with LPS (1 ng/ml). Negative control was performed by cell incubated only with 2% RPMI (black bars) and positive control cells incubated only with LPS (1 ng/ml) (light gray bars). Data are presented as % of phagocytosis of 5 independent assays (*p <0.05 vs. negative control).

FIGURES

Figure 1

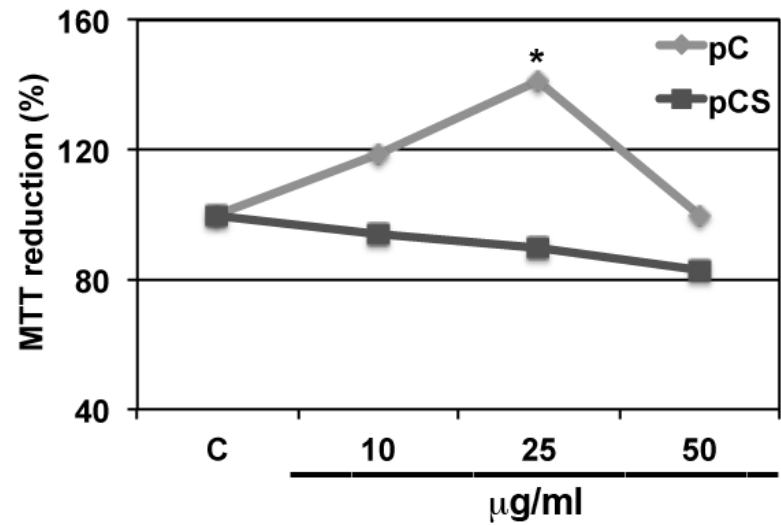


Figure 2

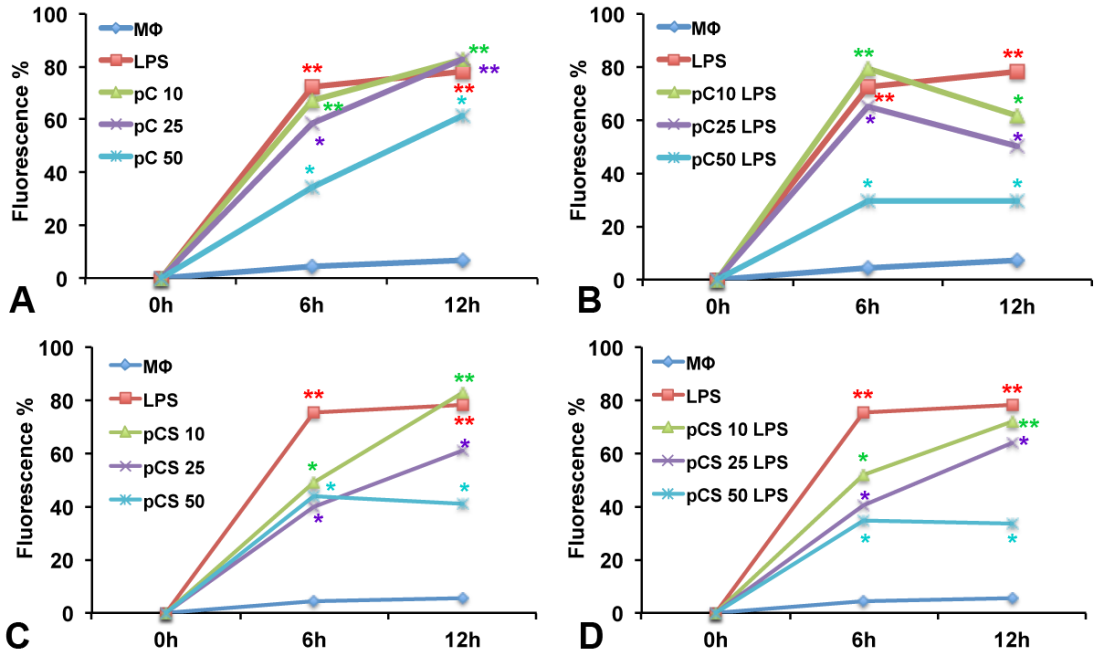


Figure 3

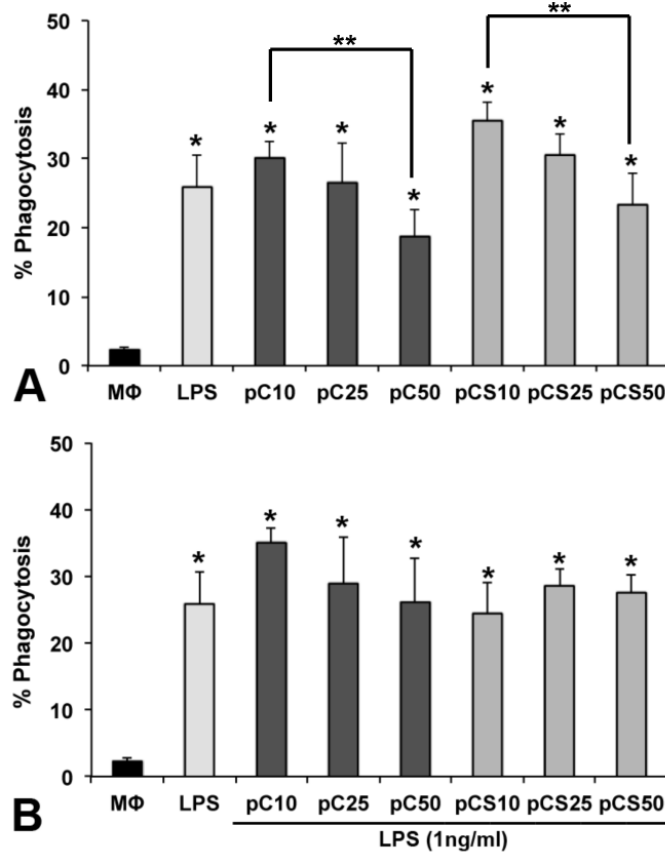


TABLE 1

	Control	LPS	pC	pC + LPS	pCS	pCS + LPS
HLA-ABC	6,94 ± 2,52	17,2 ± 1,44 *	23,13 ± 1,6 **	23,68 ± 8,7 *	18,75 ± 4 **	21,63 ± 3,6 *
HLA-DR	5,07 ± 0,69	19,63 ± 3,58 **	9,67 ± 0,6 *	13,1 ± 1,7 *	10,37 ± 0,4 **	12,93 ± 3 *
CD-80	3,32 ± 1,11	9,35 ± 0,94 **	10,70 ± 2,4 *	11,88 ± 3 *	9,64 ± 3,3 *	9,73 ± 1,5 *
CD-86	11,66 ± 1,12	24,2 ± 1,56 **	14,4 ± 3,1	14,16 ± 3,2	16,01 ± 0,6	15,93 ± 1,9

Mean ± SD. Statistical significance at ** $p < 0.01$ or * $p < 0.05$ when compared with Control cells.

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que:

1. As toxinas urêmicas pC e pCS não apresentam citotoxicidade sobre os MDMs nas concentrações conhecidas como máxima, média e mínima, encontradas no soro de doentes renais crônicos.
2. Os MDMs aumentam a produção de NO quando desafiados com as concentrações mínima e média de pC e pCS, em comparação ao controle negativo. Quando desafiados com a concentração máxima, os MDMs produzem significativamente menos NO em comparação ao LPS.
3. O processo de fagocitose apresentou um resultado semelhante à produção de NO. Quando desafiados com as concentrações mínima e média de pC e pCS, os MDMs apresentaram aumento de fagocitose em comparação ao controle negativo. Quando desafiados com a concentração máxima, os MDMs diminuem significativamente a fagocitose em comparação ao controle positivo (LPS).
4. Ambas as toxinas pC e pCS em concentração máxima promoveram diminuição na expressão de HLA-DR e CD86 em MDMs na presença ou não de LPS, quando comparado ao controle positivo LPS.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

Alebiosou CO. An update on “progression promoters” in renal diseases. *J Natl Med Assoc* 2003; 95 (1): 30-42.

Bhatia S, Edidin M, Almo SC, Nathenson SG. B7-1 and B7-2: Similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. *Immunol Lett* 2006; 104: 70–75.

Carvalho, JGR de; Mulinari, RA; Pachaly, MA *et al.* Manual do Renal Crônico. Imprensa Universitária 1992.

Clayton TA. Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible

connection to autism. FEBS Lett 2012; 586 (7): 956-961.

Cohen G, Hörl WH. Immune dysfunction in uremia - an update. Toxins (Basel) 2012; 24-4(11): 962-990.

Cuoghi A, Caiazzo M, Bellei E, Monari E, Bergamini S, Palladino G, Ozben T, Tomasi A. Quantification of p-Cresol sulphate in human plasma by selected reaction monitoring. Anal Bioanal Chem 2012; 404(6-7): 2097-2104.

De Loor H, Bammens B, Evenepoel P, De Preter V, Verbeke K. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis for measurement of p-Cresol and its conjugated metabolites in uremic and normal serum. Clin Chem 2005; 51(8):1535–1538.

De Smet R, David F, Sandra P, et al. A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-Cresol in patients with chronic renal failure. Clin. Chim Acta 1998; 278:1-21.

Dou L, Cerini C, Brunet P, Guilianelli C, Moal V, Grau G, De Smet R, Vanholder R, SAMPOL J, Berland Y. P-Cresol, a uremic toxin, decreases endothelial cell response to inflammatory cytokines. Kidney Int 2002; 62(6): 1999-2009.

Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-Cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. Kidney Int 2004; 65(2): 442-451.

Faure V, Cerini C, Paul P et al. The uremic solute p-Cresol decreases leukocyte transendothelial migration in vitro. Int Immunol 2006; 18:1453–1459.

Girndt M, Sester U, Sester M, Kaul H, Köhler H. Impaired cellular immune function in patients with end-stage renal failure. Nephrol Dial Transplant 1999;14(12): 2807-

2810.

Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Köhler H. Defective expression of B7-2 (CD86) on monocytes of dialysis patients correlates to the uremia-associated immune defect. *Kidney Int* 2001; 59(4): 1382-1389.

Hauser, A. B.; Stinghen, A.E.; Kato, S.; Aita, C.; Yuzawa, Y.; Pecoits-filho, R. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit dial int* 2008; 28(3): 183-187.

Karkar, A. Modulation of renal inflammation: therapeutic strategies. *Saudi Kidney dis transpl* 2008; 19(1): 1-19.

Kato S, Chmielewski M, Honda H, Pecoits-Filho R, Matsuo S, Yuzawa Y, Tranaeus A, Stenvinkel P, Lindholm B. Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(5): 1526-1533.

Klahr S. Progression of chronic renal disease. *Heart Dis* 2001; 3(3): 205-209.

Klahr S, Morrissey J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(3) s 2: 3-7.

Ledebo I. Principles and practice of hemofiltration and hemodiafiltration. *Artif Organs* 1998; 22(1): 20–25.

Lesaffer G, De Smet R, Lameire N, Dhondt A, Duym P, Vanholder R. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15(1): 50–57.

Marques AB, Pereira DC, Ribeiro RCHM. Motivo e frequência de internação dos pacientes com IRC em tratamento hemodialítico. *ArqCiêncSaúde* 2005; 12(2): 67-

72.

Martinez AW, Recht NS, Hostetter TH, Meyer TW. Removal of P-Cresol sulfate by hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(11): 3430–3436.

Romão Junior JE. Doença renal crônica: Definição, epidemiologia e classificação. *J BrasNefrol* 2004; 26(3): 1-3.

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(2): 592–596.

Sesso RLA, Thomé FS, Bevilacqua JL, Romão Junior JE, Lugon J. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise. *J Bras Nefrol* 2008; 30: 233-238.

Vanholder R, De Smet R, Hsu C. et al. Uremic toxicity: the middle molecule hypothesis revisited. *Semin Nephrol* 1994; 14: 205–218.

Vanholder R, De Smet R, Vogeleere P, Ringoir S. Middle molecules: toxicity and removal by hemodialysis and related strategies. *Artif Organs* 1995; 19: 1120–1125.

Vanholder R, De Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(8): 1815–1823.

Vanholder R, De Smet R, Lesaffer G. P-Cresol: a toxin revealing many neglected but relevant aspects of ureamic toxicity. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(12): 2813-2815.

Vanholder R, Argiles A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Massy ZA, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Wratten ML. Uremic toxicity: present state of the art. *Int*

J Artif Organs 2001; 24(10): 695–725.

Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, et al. European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. Kidney Int 2003; 63(5): 1934–1943.

Vanholder R, Van Laecke S, Glorieux G. What is new in uremic toxicity? Pediatr Nephrol 2008; 23(8): 1211–1221.

Vanholder R, Bammens B, de Loor H, Glorieux G, Meijers B, Schepers E, Massy Z, Evenepoel P. Warning: the unfortunate end of p-Cresol as a uraemic toxin. Nephrol Dial Transplant 2011; 26(5): 1464-1467.

Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. J Ren Nutr 2012; 22(1): 149-156.

Weissinger EM, Kaiser T, Meert N, et al. Proteomics: a novel tool to unravel the patho-physiology of uraemia. Nephrol Dial Transplant 2004; 19: 3068-3077.

Zatz R. Insuficiência renal crônica: mecanismos de adaptação e progressão. In: Riella MC. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. 3ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 1996; 450-455.