

Efeito da solução de diálise peritoneal com pH neutro e padrão sobre a proliferação de fibroblastos

Authors

André Antunes Poitevin¹
 Christian Viezzer¹
 Denise Cantarelli Machado¹
 Bartira Ercília Pinheiro da Costa¹
 Ana Elizabeth Figueiredo¹
 Domingos d'Avila¹
 Carlos Eduardo
 Poli-de-Figueiredo¹

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Submitted on: 03/29/2012.

Approved on: 12/10/2013.

Correspondence to:

Bartira Ercília Pinheiro da Costa.
 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
 Av. Ipiranga, nº 6690, Hospital São Lucas da PUCRS, 2º andar
 Laboratório de Nefrologia, Instituto de Pesquisas Biomédicas. Porto Alegre, RS, Brasil. CEP: 90610-000.
 E-mail: bart@pucls.br
 Tel: (51) 3367-700.
 Fax: (51) 3367-700.
 Bolsas de Peritosteril® e Balance® foram fornecidas pela Fresenius Medical Care.

DOI: 10.5935/0101-2800.20140024

RESUMO

Introdução: A exposição contínua da membrana peritoneal a soluções convencionais de diálise é um importante fator de risco para induzir alterações estruturais e funcionais. **Objetivo:** Comparar a viabilidade *in vitro* dos fibroblastos NIH-3T3 de camundongo após exposição à solução de diálise com pH neutro com células expostas à solução padrão. **Métodos:** Estudo experimental; ambas as soluções foram testadas em todas as concentrações de glicose comercialmente disponíveis. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio colorimétrico de sal tetrazólio. **Resultados:** A viabilidade de fibroblastos foi melhor na solução de pH neutro em relação ao controle nas três concentrações de glicose (densidade óptica em nm-médias \pm DP: 1,5% $0,295 \pm 0,047$ vs. $0,372 \pm 0,042$, $p < 0,001$; 2,3% $0,270 \pm 0,036$ vs. $0,337 \pm 0,051$, $p < 0,001$; 4,25% $0,284 \pm 0,037$ vs. $0,332 \pm 0,032$, $p < 0,001$; controle vs. pH neutro respectivamente, teste *t* de Student). Não houve diferença significativa na viabilidade celular entre as três concentrações de glicose quando solução padrão foi utilizada (ANOVA $p = 0,218$), embora a viabilidade celular tenha sido superior após exposição aos fluidos de diálise peritoneal neutros, pH 1,5% em comparação com 2,3 e 4,25% de concentrações de glicose (ANOVA $p = 0,008$: Bonferroni 1,5% vs. 2,3% $p = 0,033$, 1,5% vs. 4,25% $p = 0,014$, 2,3% vs. 4,25% $p = 1,0$). **Conclusão:** A viabilidade celular foi melhor em solução neutra de pH de diálise, especialmente nas menores concentrações de glicose. O pH fisiológico e com menos produtos de degradação de glicose podem ser responsáveis por estes resultados.

Palavras-chave: diálise peritoneal; fibroblastos; teste de materiais; técnicas de cultura de células.

INTRODUÇÃO

Diálise peritoneal (DP) de longo prazo no tratamento de doença renal terminal (DRT) somente é possível quando a estrutura e a função da membrana peritoneal são adequadamente preservadas. Soluções padrão de DP são ácidas (pH = 5,5), tamponadas com lactato, hiperosmolares (334-486 mOsm/L) e contêm altas concentrações de glicose (75-220 mmol/L) e de produtos da degradação da glicose (GDP), elementos que sabidamente afetam a função peritoneal.¹ Apesar de representar o principal vetor no desenvolvimento de soluções biocompatíveis para DP, a manutenção da integridade da membrana peritoneal em pacientes em diálise peritoneal de longa duração ainda é um objetivo não alcançado. A exposição contínua da membrana peritoneal a soluções ácidas parece ser um importante fator de risco para alterações estruturais e funcionais. Estudos de biópsia peritoneal revelaram perda de células mesoteliais, pequenas alterações vasculares e espessamento e fibrose na zona compacta da camada submesotelial.² Alterações funcionais incluíram perda de ultrafiltração e redução da depuração de solutos pequenos, além de falhas técnicas.³ A utilização de soluções de diálise biocompatíveis é fundamental para a sobrevivência de longo prazo da membrana.⁴ Uma solução de diálise com pH neutro e baixo nível de GDP apresentada em bolsa de câmara dupla foi desenvolvida com vistas à melhora no nível de biocompatibilidade.³ Estudos clínicos e experimentais anteriores indicaram seus efeitos benéficos.^{3,5,6} O objetivo do presente estudo foi comparar a viabilidade de

fibroblastos de camundongos NIH-3T3 - uma linhagem celular bem caracterizada - após exposição a ácido padrão e à solução de diálise com pH neutro.

MÉTODOS

Culturas de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 foram colocadas em meio contendo a solução convencional de DP (Controle) ou fluido de DP com pH neutro. Todas as concentrações de glicose comercialmente disponíveis (1,5%; 2,3%; 4,25%) foram testadas.

SOLUÇÕES PARA DIÁLISE

Ambas as soluções tinham glicose como agente osmótico. Peritosteril® (Fresenius Medical Care, Jaguariúna, Brasil) foi usada como solução de controle e Balance® (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Alemanha) como solução de pH neutro, fornecida em bolsa de câmara dupla. A composição de ambas as soluções de diálise é apresentada na Tabela 1. A bolsa de Balance® com glicose a 1,5% contém uma câmara alcalina com lactato de sódio (sódio: 75 mmol/L; lactato: 70 mmol/L) e uma segunda câmara com fluido ácido contendo eletrólitos e glicose (sódio: 193 mmol/L; cálcio: 3,5 mmol/L; magnésio: 1 mmol/L; cloro: 203 mmol/L; glicose: 166,5 mmol/L). A solução Balance® vem pronta para uso, bastando abrir o selo entre as duas câmaras e misturar e os seus conteúdos, resultando em fluido com pH na faixa de 6,8 a 7,4. Por sua vez, a solução Peritosteril® tem pH de 5,5. As bolsas de Peritosteril® e Balance® foram fornecidas pela Fresenius Medical Care.

TABELA 1 COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES DE DIÁLISE PERITONEAL ANTES DA MISTURA COM MEIO DE CULTURA

Componentes em mmol/L	Controle	pH Neutro
Sódio	134	134
Cálcio	1,75	1,75
Magnésio	0,5	0,5
Cloro	103,5	101,5
Lactato	35	35
pH	5,5	7,0
Osmolaridade (mOsm/L)	358	358

CULTURAS CELULARES

A linhagem celular de fibroblastos de camundongos NIH-3T3 (American Type Culture Collection CRL-1658, Manassas, VA, EUA) foi cultivada em frascos de 25 ml contendo Meio Eagle Modificado por Dulbecco

(DMEM), gentamicina a 0,025 g/L e estreptomicina/penicilina a 0,1 g/L suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As incubações foram realizadas em atmosfera úmida a 37 °C e 5% de CO₂. Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, observando-se técnicas assépticas para minimizar o risco de contaminação microbiana. O crescimento de fibroblastos em cultura ocorreu em monocamada aderente. As células foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e digeridas com solução tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco, Grand Island, NY, EUA). SFB foi utilizado para inativar a ação da tripsina. A contagem celular foi realizada numa câmara de Neubauer. As células foram semeadas em DMEM em placas de cultura de tecidos de 96 poços a uma densidade de 0,5 x 10⁴ células/poço e deixadas em cultura por 24 horas. Após este prazo, 50 µL das soluções de teste (controle/DMEM ou solução de pH neutro/DMEM) foram adicionados a cada poço, seguido de um tempo de incubação de 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata, misturando as duas soluções de DP com DMEM em proporção de 1:1 com diferentes concentrações de glicose. A proporção 1:1 para as soluções de DP e meio de cultura e o tempo de incubação de 48 horas foram definidos depois de uma série de testes-piloto em que a proliferação celular foi avaliada em soluções de diferentes proporções de soluções de teste e meio de cultura (25%, 50%, 75% e 100% de fluido de diálise peritoneal) por diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas). O crescimento de fibroblastos foi deficiente em todos os tempos de incubação na presença de soluções de DP a 75% ou 100%. Os poços de controle (DMEM 100%) com melhor viabilidade celular foram obtidos no tempo de incubação de 48 horas.

ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR COM MTT

A viabilidade celular foi avaliada com brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). Após incubação por 48 horas, a solução DP/DMEM foi removida de todos os poços e as células foram lavadas com PBS (100 µL). DMEM com 10% de solução de MTT a 5 mg/ml (50 µL/poço) foi adicionada por mais um período de incubação de quatro horas. Em seguida, o MTT foi retirado e dimetilsulfóxido (DMSO; 100 µL; Sigma Co) adicionado. A conversão do produto do MTT - uma estimativa da viabilidade celular - foi medida por densidade óptica (DO) a 570 nm através de um espectrofotômetro equipado

com um leitor de microplacas (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A DO para o controle negativo (apenas DMEM) representou 100% de viabilidade celular. Todas as experiências foram repetidas três vezes e as análises das amostras foram realizadas em triplicata.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis são apresentadas na forma de média e desvio padrão (DP). Foi utilizado o teste *t* de Student para comparar duas variáveis contínuas; normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. ANOVA, com teste ad hoc de Bonferroni, foi utilizada nas comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas para valores de *p* de 0,05 ou menos. O software Statistical Package for the Social Sciences s100 µL (SPSS, versão 17 para Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

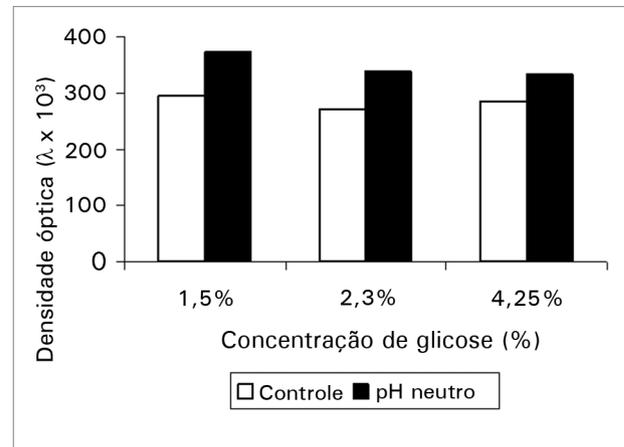
RESULTADOS

A viabilidade celular após exposição às soluções padrão (Controle) e de pH neutro com diferentes concentrações de glicose é ilustrada na Figura 1. A viabilidade celular foi significativamente maior em pH neutro do que em meio ácido, em todas as concentrações de glicose testadas, medida por densidade óptica (em nm): $0,295 \pm 0,047$ vs. $0,372 \pm 0,042$, $p < 0,001$ para glicose a 1,5% controle e pH neutro, respectivamente; $0,270 \pm 0,036$ vs. $0,337 \pm 0,051$, $p < 0,001$ para glicose a 2,3% controle e pH neutro, respectivamente; $0,284 \pm 0,037$ vs. $0,332 \pm 0,032$, $p < 0,001$ para glicose a 4,25% controle e pH neutro, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas de viabilidade celular entre as soluções de controle nas três concentrações de glicose (ANOVA para medidas repetidas: $p = 0,218$). No entanto, a viabilidade celular na solução com pH neutro foi maior após exposição a concentrações de glicose a 1,5% do que 2,3% ou 4,25% [ANOVA com Bonferroni post hoc: $p = 0,033$ (1,5% vs 2,3%); $p = 0,014$ (1,5% vs. 4,25%); $p = 1,00$ (2,3% versus 4,25%)].

DISCUSSÃO

O presente experimento revelou que a viabilidade celular foi maior quando os fibroblastos foram expostos *in vitro* à solução com pH neutro do que à solução padrão para DP. Evidenciou-se, ainda, maior viabilidade das células expostas à solução de pH neutro com glicose a

Figura 1. Viabilidade dos fibroblastos após exposição a soluções ácida e de pH neutro em diferentes concentrações de glicose.



1,5% do que a 2,3% ou 4,25%. O significado destes resultados ainda não é claro, mas é razoável supor que um pH neutro e menos produtos de degradação da glicose sejam melhores para a viabilidade celular e que tal efeito pode ser amplificado em concentrações mais baixas de glicose. A melhor viabilidade celular na solução de pH neutro não significa que a mesma não seja tóxica ou que não induza fibrose. Fibroblastos foram usados como modelo experimental.⁷⁻⁹ Seria desejável avaliar os efeitos de tal exposição em outros modelos celulares ou animais.^{10,11} O uso *in vivo* da solução de diálise com pH neutro resultou em melhoria nos marcadores de ultrafiltração peritoneal e integridade da membrana peritoneal.^{3,12} Melhorias também foram observadas na viabilidade e proliferação de células mesoteliais.¹³

A viabilidade celular foi avaliada através de ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). Seu uso permite aferir citotoxicidade, proliferação celular e ativação celular. O ensaio é baseado em desidrogenases mitocondriais de células viáveis para transformar o MTT em azul de formazano insolúvel em água. O método de ensaio é barato, não é demorado, e permite a utilização de espectrofotometria de varredura *multiwall*.¹⁴ Fibroblastos também já foram utilizados em estudo anterior, em que não foram identificadas diferenças na proliferação celular com incubação em solução de diálise glicose contendo icodextrina ou solução padrão.¹⁵ O estudo foi realizado em soluções com pH ajustado misturadas com meio de cultura, uma grande diferença em relação ao presente trabalho, em que a diferença do pH das soluções de teste foi a principal característica avaliada. Curiosamente, a solução de glicose a 4,25%

esterilizada por calor causou redução significativa no crescimento celular *in vitro*, em comparação com a solução esterilizada por filtração, supostamente por conta do aumento da nível de GDP.¹⁵ A ocorrência de GDP e baixo pH parece ser um fator importante relacionado à biocompatibilidade das soluções de DP. GDP tem sido associado à formação de produtos de glicação avançada (AGEs) ocorrida durante o processo de esterilização por calor. A presença de AGEs tem sido associada à redução do crescimento *in vitro* de células mesoteliais.¹⁶ Foi anteriormente demonstrado que as células expostas *in vitro* a concentrações mais baixas de glicose (1,5% ou 2,27%) crescem melhor do que em concentrações mais elevadas (3,86%).¹⁷ Estes resultados estão em concordância com os resultados do presente estudo, o que sugere que os GDP inibem significativamente o crescimento celular *in vitro* (17), podendo estar relacionados a consequências clínicas.^{18,19} A solução de diálise peritoneal com pH neutro foi concebida como uma bolsa de duas câmaras, uma contendo o componente alcalino com lactato e outra com eletrólitos e glicose. Tal abordagem permite um pH mais elevado e esterilização com formação reduzida de GDP. Os fluidos dos dois compartimentos são misturados imediatamente antes da infusão, através da ruptura do selo entre as câmaras.

Em conclusão, a viabilidade dos fibroblastos foi mais elevada na solução de diálise com pH neutro, especialmente nas concentrações mais baixas de glicose. É possível que um pH mais fisiológico e níveis mais baixos de GDP estejam associados a tais resultados.

AGRADECIMENTOS

As bolsas de Peritosteril® e Balance® foram fornecidas pela Fresenius Medical Care. O Laboratório de Nefrologia recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Poli-de-Figueiredo é pesquisador do CNPq.

CONFLITO DE INTERESSES

André A. Poitevin, Ana E. Figueiredo, Domingos O. d'Avila e Carlos E. Poli-de-Figueiredo receberam prêmios de viagem das duas empresas que comercializam produtos de diálise peritoneal no Brasil (Fresenius Medical Care e Baxter) no passado.

REFERÊNCIAS

1. Topley N. Membrane longevity in peritoneal dialysis: impact of infection and bio-incompatible solutions. *Adv Ren Replace Ther* 1998;5:179-84.
2. Williams JD, Craig KJ, von Ruhland C, Topley N, Williams GT; Biopsy Registry Study Group. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl* 2003;S43-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.08805.x>
3. Williams JD, Topley N, Craig KJ, Mackenzie RK, Pischetsrieder M, Lage C, et al.; Euro Balance Trial Group. The Euro-Balance Trial: the effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. *Kidney Int* 2004;66:408-18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00747.x>
4. Mackenzie R, Holmes CJ, Jones S, Williams JD, Topley N. Clinical indices of *in vivo* biocompatibility: the role of *ex vivo* cell function studies and effluent markers in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int Suppl* 2003;S84-93. PMID: 14870881 DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.08809.x>
5. Lage C, Pischetsrieder M, Aufricht C, Jörres A, Schilling H, Passlick-Deetjen J. First *in vitro* and *in vivo* experiences with Stay-Safe Balance, a pH-neutral solution in a dual-chambered bag. *Perit Dial Int* 2000;20:S28-32
6. Lee HY, Park HC, Seo BJ, Do JY, Yun SR, Song HY, et al. Superior patient survival for continuous ambulatory peritoneal dialysis patients treated with a peritoneal dialysis fluid with neutral pH and low glucose degradation product concentration (Balance). *Perit Dial Int* 2005;25:248-55.
7. Wieslander AP, Nordin MK, Kjellstrand PT, Boberg UC. Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929. *Kidney Int* 1991;40:779. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1991.182>
8. Witowski J, Jörres A. Peritoneal cell culture: fibroblasts. *Perit Dial Int* 2006;26:292-9. PMID: 16722018
9. Ogata S, Naito T, Yorioka N, Kiribayashi K, Kuratsune M, Kohno M. Effect of lactate and bicarbonate on human peritoneal mesothelial cells, fibroblasts and vascular endothelial cells, and the role of basic fibroblast growth factor. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2831-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh478>
10. Fernández-Perpén A, Pérez-Lozano ML, Bajo MA, Albar-Vizcaino P, Sandoval Correa P, del Peso G, et al. Influence of bicarbonate/low-GDP peritoneal dialysis fluid (BicaVera) on *in vitro* and *ex vivo* epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2012;32:292-304. DOI: <http://dx.doi.org/10.3747/pdi.2010.00315>
11. Leung JC, Chan LY, Tam KY, Tang SC, Lam MF, Cheng AS, et al. Regulation of CCN2/CTGF and related cytokines in cultured peritoneal cells under conditions simulating peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:458-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn524>
12. Choi HY, Kim DK, Lee TH, Moon SJ, Han SH, Lee JE, et al. The clinical usefulness of peritoneal dialysis fluids with neutral pH and low glucose degradation product concentration: an open randomized prospective trial. *Perit Dial Int* 2008;28:174-82.
13. Witowski J, Korybalska K, Ksiazek K, Wisniewska-Elnur J, Jörres A, Lage C, et al. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:917-24. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh013>
14. Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986;94:57-63. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90215-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(86)90215-2)
15. Cooker LA, Choo CG, Lunenburg P, Lamela J, Holmes CJ. Effect of icodextrin peritoneal dialysis solution on cell proliferation *in vitro*. *Adv Perit Dial* 1999;15:17-20.

16. Breborowicz A, Witowski J, Polubinska A, Pyda M, Oreopoulos D. L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid reduces in vitro cytotoxicity of glucose degradation products. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:3005-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh539>
17. Cooker LA, Luneburg P, Faict D, Choo C, Holmes CJ. Reduced glucose degradation products in bicarbonate/lactate-buffered peritoneal dialysis solutions produced in two-chambered bags. *Perit Dial Int* 1997;17:373-8.
18. Yokoi H, Kasahara M, Mori K, Ogawa Y, Kuwabara T, Imamaki H, et al. Pleiotrophin triggers inflammation and increased peritoneal permeability leading to peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 2012;81:160-9. PMID: 21881556 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.305>
19. González-Mateo GT, Aroeira LS, López-Cabrera M, Ruiz-Ortega M, Ortiz A, Selgas R. Pharmacological modulation of peritoneal injury induced by dialysis fluids: is it an option? *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:478-81.