

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE 25-HIDROXIVITAMINA D COM A  
EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO PODÓCITO EM  
PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**JOÃO RODOLFO TELÓ TIMM**

PORTO ALEGRE

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE 25-HIDROXIVITAMINA D COM A  
EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO PODÓCITO EM  
PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

JOÃO RODOLFO TELÓ TIMM

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese

Co-orientadora: Profa. Dra. Cristina Karhol

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Teló Timm, João Rodolfo  
ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE 25-  
HIDROXIVITAMINA D COM A EXPRESSÃO GÊNICA DE  
PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO PODÓCITO EM PACIENTES COM  
DOENÇA RENAL CRÔNICA / João Rodolfo Teló Timm. -- 2014.  
78 f.

Orientadora: Francisco José Veríssimo Veronese.  
Coorientadora: Cristina Karhol.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Vitamina D. 2. Doença Renal Crônica. 3. Podócito  
. 4. Nefrina. 5. Podocina. I. Veríssimo Veronese,  
Francisco José, orient. II. Karhol, Cristina,  
coorient. III. Título.

## Agradecimentos

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio, incentivo e confiança que me proporcionaram durante todo este trabalho. A minha namorada por acompanhar o andamento do mestrado com muita paciência e compreensão.

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Veronese e minha co-orientadora Professora Cristina Karohl, pelas orientações, paciência e compreensão. Pelo exemplo de profissionais dedicados, organizados e sistemáticos, que ambos são o que certamente contribuiu para meu crescimento profissional.

Aos colegas de laboratório, em especial à Mariane dos Santos e Sane Vianna Pereira pela disponibilidade em ensinar as técnicas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. Aos amigos, funcionários e residentes do Serviço de Nefrologia do HCPA que de uma forma ou outra participaram em partes de alguma etapa do trabalho.

A toda equipe do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à Andrea Rambo, recepcionista do Centro de Pesquisa Clínica do HCPA, ao Rodrigo, coletador do Centro de Pesquisa Clínica, e à Aline Mancuso pela assistência estatística.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa pelo apoio financeiro (FIPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

A todos os pacientes, por aceitarem participar do trabalho e assim permitirem a realização desta pesquisa.

## RESUMO

**Base teórica:** O efeito da vitamina D e análogos sobre a redução da albuminúria na doença renal crônica tem sido demonstrado em estudos clínicos, mas os seus efeitos sobre o podócito glomerular ainda não são claros.

**Objetivo:** Avaliar o efeito da reposição de vitamina D3 sobre a expressão das proteínas associadas ao podócito em pacientes portadores de doença renal crônica (DRC).

**Métodos:** Foram incluídos 27 pacientes portadores de DRC e níveis séricos reduzidos de 25-hidrovitamina D [25(OH)D], com taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) entre 15 e 89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> e índice proteinúria/creatininúria (IPC) acima de 0,5. Os pacientes receberam reposição de vitamina D3 (colecalfiferol) por 6 meses de acordo com o nível sérico de 25(OH)D, sendo mensurados pré e pós tratamento 25(OH)D, TFGe, IPC e outros parâmetros do metabolismo mineral e ósseo. O RNAm de nefrina, podocina, podocalixina, *transient receptor potential cation channel 6* (TRPC-6) e dos fatores de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) e transformador beta (TGF-β<sub>1</sub>) foram quantificados em células do sedimento urinário através da reação em cadeia da polimerase em tempo real, pré e pós reposição de vitamina D3. Os RNAm dos marcadores do podócito foram correlacionados com a 25(OH)D, proteinúria e função renal no período basal e após a intervenção.

**Resultados:** Após 6 meses de suplementação com colecalfiferol, a concentração plasmática média da 25(OH)D aumentou de 19 ± 7 ng/mL para 28 ± 11 ng/mL (P = 0.003). A TFGe reduziu -4,71 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> (p=0,010 vs. basal) e não houve alteração na proteinúria após reposição de vitamina D3, bem como dos parâmetros do metabolismo mineral e ósseo. A 25(OH)D sérica correlacionou-se com a proteinúria, tanto no período basal (r=0,517, p=0,008) quanto após o tratamento (r=0,539,

p=0,005). Globalmente, a variação na excreção urinária dos RNAm associados ao podócito após o tratamento não foi estatisticamente significativa. Pacientes que atingiram níveis de 25(OH)D  $\geq$ 20 ng/ml aos seis meses tiveram uma tendência de redução da nefrina [4,48(3,03-5,93) vs. 2,79(1,46-4,12), p=0,085] e da podocina [3,43(2,54-4,32) vs. 2,50(1,21-3,15), p=0,079]; em contrário, no grupo que permaneceu com deficiência de 25(OH)D a podocalixina aumentou significativamente [2,71(2,10-3,42) vs. 3,63(2,64-4,52), p=0,009] e houve tendência de aumento da nefrina [3,12(2,41-3,10) vs. 4,61(2,83-6,40), p=0,072] e da podocina [3,24(2,37-4,38) vs. 3,83(2,78-4,88), p=0,091]. Ao final de seis meses, pacientes com melhor nível de função renal (TFGe  $\geq$ 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) tiveram redução do RNAm de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> (p=0,039).

**Conclusão:** A reposição de vitamina D3 (colecalfiferol) por seis meses não reduziu a podocitúria ou a proteinúria nestes pacientes com DRC, embora tenha-se observado uma redução marginal no RNAm urinário de nefrina e podocina quando níveis suficientes de 25(OH)D foram atingidos. O uso mais precoce e mais prolongado da vitamina D3 deveria ser investigado como potencial medida de nefroproteção adicional em pacientes renais crônicos.

**Palavras-chave:** vitamina D, doença renal crônica, podócito, nefrina, podocina, podocalixina, proteinúria

## **ABSTRACT**

**Background:** Previous studies have demonstrated that vitamin D or analog decreases albuminuria in chronic kidney disease (CKD) patients. However, the precise mechanism underlying the potential protective effects of vitamin D on glomerular podocytes is unclear.

**Objective:** In this study we investigated the effect of vitamin D3 supplementation on urinary podocytes protein expression.

**Methods:** Twenty-seven CKD patients who had low baseline vitamin D [25(OH)D] levels, estimated glomerular filtration rate (eGFR) between 15 and 89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, and proteinuria/creatininuria index (PCI) higher than 0,5 were studied. During 6 months, all of the patients received cholecalciferol (vitamin D3) supplementation according to 25(OH)D level. Estimated GFR, PCI, 25(OH)D levels, and bone and mineral metabolism parameters were measured at the baseline and after 6 months. In addition, messenger RNA (mRNA) of nephrin, podocin, podocalyxin, transient receptor potential cation channel 6 (TRPC-6), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) were quantified in urinary sediment cells using real time polymerase chain reaction before and after intervention. The podocyte markers were correlated with 25(OH)D levels, proteinuria and renal function after vitamin D3 supplementation.

### **Results:**

During cholecalciferol supplementation, the mean 25(OH)D concentration increased from  $19 \pm 7$  ng/mL at baseline to  $28 \pm 11$  ng/mL at month 6 ( $P = 0.003$ ). Urinary proteinuria did not change after cholecalciferol supplementation. However, eGFR

decreased  $-4.71 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  ( $p=0.010$  vs. baseline. The serum levels of 25(OH)D were correlated with proteinuria in both periods: baseline ( $r=0.517$ ,  $p=0.008$ ) and post-treatment ( $r=0.539$ ,  $p=0.005$ ). Patients who reached 25(OH)D levels  $\geq 20 \text{ mg/ml}$  at 6 months showed a trend of lower nephrin [ $4.48(3.03-5.93)$  vs.  $2.79(1.46-4.12)$ ,  $p=0.085$ ] and podocin [ $3.43(2.54-4.32)$  vs.  $2.50(1.21-3.15)$ ,  $p=0.079$ ]. On the other side, podocalyxin levels increased significantly [ $2.71(2.10-3.42)$  vs.  $3.63(2.64-4.52)$ ,  $p=0.009$ ] and both nephrin and podocin also increased but these not significant statistically [nephrin:  $3.12 (2.41-3.10)$  vs.  $4.61 (2.83-6.40)$ ,  $p=0.072$ ; podocin:  $3.24 (2.37-4.38)$  vs.  $3.83 (2.78-4.88)$ ,  $p=0.091$ ]. After 6 months supplementation, patients with higher levels of renal function ( $\text{eGFR} \geq 30 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ ) showed reduction of TGF- $\beta_1$  RNAm ( $p=0.039$ ).

**Conclusion:** Vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation during 6 months did not changed proteinuria level. However, we observed a reduction of urinary nephrin and podocin mRNA in patients who reached sufficient 25(OH)D levels. Larger studies are needed to clarify whether vitamin D3 supplementation, mainly on early stages of CKD, may have beneficial effects on lowering proteinuria and on delaying progression of CKD.

**Keywords:** vitamin D, chronic kidney disease, podocytes, nephrin, podocin, podocalyxin, proteinuria



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Características demográficas e clínicas dos pacientes com doença renal crônica.....  | 64 |
| <b>Tabela 2.</b> Dados laboratoriais relativos à função renal, proteinúria, metabolismo mineral e ósseo pré e pós reposição de vitamina D3..... | 66 |
| <b>Tabela 3.</b> Expressão do RNAm associados ao podócito na urina antes e após reposição de vitamina D3.....                                   | 67 |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Efeito da reposição de vitamina D3 sobre a expressão dos RNAm associados ao podócito na urina de acordo com o nível sérico basal de 25(OH)D ( $\geq 20$  ng/ml <20 ng/ml).....68

**Figura 2.** Efeito da reposição de vitamina D3 sobre a expressão dos RNAm associados ao podócito na urina de acordo com o nível de filtração glomerular (15-29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> ou 30-89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>).....69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ARA-2 - Sistema renina angiotensina aldosterona

cDNA – DNA complementar

CKD-EPI – *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

DBP – Proteína transportadora de vitamina D

[1,25-(OH)<sub>2</sub>D] – 1,25 diidroxicolecalciferol

DM - Diabetes mellitus

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

DRC – Doença renal crônica

GESF – Glomeruloesclerose segmentar e focal

GN- Glomerulonefrite crônica

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

[25(OH)D] - 25-hidroxivitamina D

I-ECA – Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IMC - Índice de massa corporal

IPC – Índice de proteína total/creatinina em amostra de urina

MBG – Membrana Basal Glomerular

MDRD – *Modification os Diet in Renal Disease*

PAD – Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PTH – Paratormônio

RNAm – RNA mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RXR-VDR - receptor-esteróide

TFG – Taxa de filtração glomerular

TFGe – Taxa de filtração glomerular estimada

TGF $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta

TRPC6 - *Transient receptor potential cation channel 6*

TRS - Terapia renal substitutiva

VDR - receptor de vitamina D

VDRE - elemento de resposta à vitamina D

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 13 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....  | 15 |
| 2. 1 Doença Renal Crônica .....   | 15 |
| 2. 2 Vitamina D.....  | 17 |
| 2. 3 Doença Renal Crônica e Vitamina D.....                                       | 20 |
| 2. 4 Estrutura e função da célula epitelial podocitária .....                     | 23 |
| 2. 5 Estrutura molecular das proteínas do podócito e fatores de crescimento ..... | 24 |
| 2. 5. 1 Diafragma em fenda.....   | 25 |
| 2. 5. 2 Domínio de membrana apical .....  | 26 |
| 2. 5. 3 Fator de crescimento vascular derivado do endotélio .....                 | 27 |
| 2. 5. 4 Fator de crescimento transformador beta .....                             | 28 |
| 2. 6 Efeitos da vitamina D sobre a célula podocitária.....                        | 28 |
| 2. 7 Diagnóstico não invasivo da podocitúria.....                                 | 31 |
| 2. 8 Estratégias para localizar e selecionar as informações .....                 | 32 |
| 3. OBJETIVOS.....   | 33 |
| 3. 1 Objetivo primário.....   | 33 |
| 3. 2 Objetivos secundários .....  | 33 |
| 4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA REVISÃO DA LITERATURA.....                      | 34 |
| 5. ARTIGO EM INGLÊS.....  | 44 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....   | 71 |
| 7. ANEXOS .....   | 73 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano e a diminuição progressiva da função renal implica no comprometimento das funções metabólicas, excretórias e da regulação do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido-básico, afetando outros órgãos e sistemas [1]. A prevalência de doença renal crônica (DRC) está aumentando em todo o mundo, e autoridades médicas e governamentais passaram a considerar a DRC um problema de saúde pública. Atualmente a DRC é classificada de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) estimada pela creatinina sérica através de equações como a *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) e pelo nível de albuminúria [2].

As causas mais prevalentes de DRC terminal são hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e glomerulonefrite crônica. A prevalência de DRC também aumenta em pacientes idosos, e cerca de 17% dos indivíduos com mais de 60 anos apresentam TFG menor  $60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , representando uma perda significativa de função renal [3,4]. Quando não tratada corretamente, a DRC pode evoluir mais rapidamente para falência renal, com valores de TFG inferiores a  $15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ , ou seja, o estágio mais avançado do *continuum* de perda funcional progressiva observado na DRC [2].

No Brasil, as atenções com a DRC se restringem quase que exclusivamente ao seu estágio mais avançado, quando a terapia renal substitutiva (TRS) é necessária. Admite-se que, para cada paciente em TRS, existam de vinte a trinta outros com DRC em seus diferentes estágios [4]. O prognóstico da doença ainda é desfavorável e os custos do tratamento muito elevados. Projeta-se que atualmente o número de pacientes em tratamento dialítico e com transplante renal no Brasil está próximo dos 120.000 mil, a um custo de 1,4 bilhão de reais e a taxa de mortalidade em diálise situa-se em 15-20% ao ano [5].

Independentemente da doença de base, os principais desfechos em pacientes com DRC são as suas complicações, como anemia, hipertensão arterial, acidose metabólica, alteração do metabolismo mineral e desnutrição, entre outros. Além disso, evidências apontam que pacientes com DRC apresentam maior risco de desenvolver doença cardiovascular [6]. Diretrizes clínicas indicam que estes desfechos adversos podem ser prevenidos ou retardados se a DRC for diagnosticada precocemente, quando medidas de nefroproteção e cardioproteção poderiam ser implementadas no início do quadro clínico [2,7].

Atualmente, a DRC é identificada como um fator de risco para a deficiência de vitamina D, e diversos trabalhos demonstram que a frequência de hipovitaminose D é elevada nesses pacientes [8,9]. Dados epidemiológicos do Third National Health and Nutrition Examination Survey [10] mostram uma correlação entre deficiência de vitamina D e aumento da prevalência de albuminúria na população adulta americana, sugerindo uma atividade intrínseca anti-proteinúrica da vitamina D. O receptor da vitamina D (VDR) é um mediador da atividade biológica da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [11]. Estudos clínicos [12,13] mostraram que a reposição de vitamina D, na forma de calcitriol ou paricalcitol, reduziu a excreção urinária de proteínas, o que poderia potencialmente beneficiar pacientes com doença renal, agregando nefroproteção.

Recentemente, tem sido investigada a relação entre vitamina D e as células epiteliais podocitárias do capilar glomerular, cuja lesão por diferentes insultos resulta em proteinúria persistente. O podócito maduro expressa alfa1-hidroxilase e o VDR, tendo a habilidade tanto de produzir vitamina D ativa quanto de responder ao calcitriol autócrino ou endócrino. Através do VDR, a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estimula a expressão do gene da nefrina, entre outros, na região do *promoter* proximal deste gene [14].

A detecção da injúria podocitária através da quantificação dos RNAm de subprodutos do podócito na urina (podocitúria), que correspondem a fragmentos destas células que sofrem apoptose ou se originam de podócitos viáveis, tem sido uma ferramenta diagnóstica não invasiva acurada para a detecção de injúria glomerular em diversas formas de nefropatias [15,16]. Entretanto, até o momento não existem estudos clínicos avaliando o efeito da reposição de vitamina D sobre a podocitúria em pacientes em diferentes estágios da DRC, dos iniciais aos mais avançados. Assim, a investigação da expressão das proteínas do podócito na urina em resposta à administração de vitamina D, em paralelo com a proteinúria, pode levar à identificação de um alvo terapêutico novo para nefroproteção e potencialmente contribuir para o retardo da progressão da DRC.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Doença Renal Crônica**

A Doença Renal Crônica (DRC) consiste na perda progressiva e irreversível da função dos rins, e suas causas mais frequentes são diabetes melito, hipertensão arterial e glomerulonefrite crônica. Inicialmente a DRC pode manifestar nenhum sinal ou sintoma, evoluindo sem que o paciente perceba e possa procurar tratamento para prevenir ou retardar a sua progressão [1]. A DRC é atualmente classificada de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) pela creatinina sérica e pelo nível de excreção urinária de albumina, considerando-se também evidências de dano renal em exame laboratorial, de imagem ou na biópsia renal, alterações estas presentes por um período igual ou superior a três meses [2]. As equações mais utilizadas para estimar os



níveis de TFG são a *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) e a *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD). A partir do cálculo da filtração glomerular, a DRC é dividida em 5 estágios, desde a existência de risco para DRC até a insuficiência renal crônica em estágio final [2].

- Estágio 1: TFGe  $\geq 90$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>, apresentando evidências de lesão renal, como o aumento de excreção de albumina em amostra de urina (>30 mg/g creatinina), mas sem sintomas.
- Estágio 2: TFGe de 60-89 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, com insuficiência renal leve, presença de dano renal e aumento da albuminúria. A medida da creatinina no sangue está em geral dentro dos limites da normalidade do método usado para sua medição e os rins conseguem manter um controle razoável do meio interno.
- Estágio 3: É dividido em 3a e 3b com valores de TFGe respectivamente entre 45-59 ml/min/1,73m<sup>2</sup> e 30-44 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, ocorrendo aumento da creatinina sérica.
- Estágio 4: TFGe entre 15-29 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, insuficiência renal severa. Os exames de laboratório ficam alterados, com retenção de fósforo e queda do cálcio no sangue, alterações hormonais como deficiência de calcitriol, aumento do paratormônio (PTH), anemia mais intensa e acidose metabólica.
- Estágio 5: TFGe inferiores a 15 mL/min/1,73m<sup>2</sup>, com necessidade de diálise ou transplante de rim. Os rins já não são mais capazes de manter o controle do meio interno e os distúrbios metabólicos podem ser graves; neste estágio geralmente são observados hiperpotassemia, acidose metabólica, náuseas, vômitos, perda de peso, desnutrição entre outras manifestações clínicas que caracterizam a síndrome urêmica.

Nos estágios 1 e 2 da DRC, o objetivo do tratamento é a prevenção das doenças cardiovasculares e da perda progressiva da função renal. A terapia envolve controle da pressão arterial (PA), o tratamento da doença de base e o monitoramento das alterações da albuminúria e da diminuição da TFG [2,4,7].

Na DRC estágios 3 e 4, os pacientes são mais susceptíveis a efeitos adversos de várias drogas, cujas doses precisam ser ajustadas, apresentam mais complicações da própria DRC como hipertensão arterial, hiperparatireoidismo secundário, acidose metabólica e sintomas urêmicos, além de risco ainda mais elevado de doenças cardiovasculares. Os pacientes em estágio 5 devem ser preparados com antecipação para iniciar a terapia renal substitutiva, diálise ou transplante renal, evitando-se procedimentos de urgência [17]. Para tanto, recomenda-se que sejam tomadas algumas medidas, tais como: vacinação contra o vírus da hepatite B, suporte psicológico ao paciente e a seus familiares, suporte social, oportunidade de discussão com o paciente e seus familiares sobre as modalidades de terapia renal substitutiva para que ele possa fazer a sua escolha [4,7].

## **2. 2 Vitamina D**

A vitamina D é uma vitamina lipossolúvel e considerada um hormônio esteróide. Ela é obtida principalmente por via endógena, através da exposição cutânea à luz solar, e em menor proporção por via exógena, através da dieta. A vitamina D origina a 1,25-dihidroxitamina D (1,25-diidrocolecalfiferol ou calcitriol), a forma ativa da vitamina D, que exerce importantes funções na homeostase do cálcio e do metabolismo e integridade óssea.

Na pele, o precursor 7-deidrocolesterol (precursor do colesterol) é convertido em colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) pela ação de raios ultravioleta B com energia entre 290 a 315 nm, através de termorreação [18]. Aproximadamente 80% da vitamina D corporal origina desta conversão. Em relação a dieta, alguns alimentos contém vitamina D, tais como peixes de águas profundas e marítimas (vitamina D<sub>3</sub>), certos grãos e plantas (ergosterol ou vitamina D<sub>2</sub>) e gema de ovo (vitamina D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) e a absorção da vitamina D ocorre através do intestino [19,20]. Após conversão cutânea ou absorção intestinal, a vitamina D (colecalciferol e ergocalciferol) entra no leito capilar e é transportada no plasma pela proteína transportadora de vitamina D (DBP) até o fígado, onde é hidroxilada e convertida em 25-hidroxicolecalciferol [25(OH)D] pela ação da enzima 25-hidroxilase, presente na mitocôndria hepática. A 25(OH)D sofre nova hidroxilação nas células do túbulo proximal dos rins pela enzima 1-alfa-hidroxilase, formando o 1,25-dihidroxicolecalciferol [1,25-(OH)<sub>2</sub>D], que é a forma ativa da vitamina D. Embora o rim é o principal local de ativação da vitamina D, a enzima 1-alfa-hidroxilase é encontrada em um grande número de células e tecidos do organismo, como do sistema nervoso, mama, próstata, intestino, sistema imune, cardíaco, vascular, entre outros [21]. Esta expressão extra-renal da enzima sugere formação local de vitamina D ativa com ações autócrinas e parácrinas. A regulação renal da 1-alfa-hidroxilase tem por finalidade manter a homeostase do cálcio e, tanto cálcio sérico e o PTH parecem ser responsáveis por esta regulação. No entanto, o fator de crescimento de fibroblastos 23 e o fosfato são alguns fatores sugeridos como agentes de regulação desta enzima [22]. Por outro lado, a regulação extra-renal da 1-alfa-hidroxilase não é ainda completamente elucidada, mas fatores locais como citocinas e fatores de crescimento são implicados na conversão da vitamina D [23]. Uma forma considerada inativa de vitamina D, a 24,25-diidroxicolecalciferol, também é produzida no rim pela ação de outra enzima, a 24-

hidroxilase [23]. Após exercer seus efeitos no tecido, a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D é degradada pelo estímulo da expressão do gene *CYP24* formando formas inativas que são excretadas pela bile e urina. Esta inativação é importante na manutenção do metabolismo do cálcio e em prevenir intoxicação pela vitamina D [18-20].

A 1,25-(OH)<sub>2</sub>D exerce suas ações através de vias genômicas e não genômicas. A ação genômica da vitamina D ocorre através da sua ligação com o receptor da vitamina D (VDR) localizado no núcleo das células. Assim como a enzima 1-alfa-hidroxilase, o VDR é também encontrado em diversos tecidos e órgãos do organismos, incluindo intestino delgado, cólon, osteoblastos, linfócitos, cérebro, células cardíacas e vasculares, ilhotas pancreáticas, pele, mama, próstata, entre outros [18,24]. Após a 1,25-(OH)<sub>2</sub>D entrar na célula e ligar-se ao VDR no núcleo das mesmas, este forma um complexo chamado complexo receptor-esteróide (1,25-(OH)<sub>2</sub>D-VDR-RXR) que interage com os elementos responsivos da vitamina D, promovendo ativação ou repressão gênica, ou seja, desencadeando resposta biológica.

A concentração sérica de 25(OH)D é a principal forma circulante de vitamina D e é usada para determinar o “status” ou estoque corporal da vitamina D no organismo. Diversos estudos tem demonstrado que hipovitaminose D é extremamente comum em diferentes regiões no mundo, mas a prevalência difere entre as regiões estudadas e entre setores da população [25]. Os determinantes da concentração sérica de vitamin D parecem incluir fatores individuais, como hábito de exposição ao sol e uso de protetor solar, fatores relacionados ao ambiente, como morar em regiões próximas ou afastadas da linha do equador, hábitos culturais de vestimentas entre outros, e fatores genéticos [18,20,26]. Dados da magnitude da deficiência de vitamina D no Brasil tem se limitado a poucos estudos. No entanto, mesmo sendo o Brasil um país considerado adequado em relação à exposição solar, foi descrito um elevado percentual de hipovitaminose D em

diferentes amostras da população brasileira. Em um estudo que incluiu 603 voluntários entre 18-90 anos selecionados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, a prevalência de hipovitaminose D, após o inverno, foi de 77,4%. A hipovitaminose D foi associada à idade e a cor da pele, sendo que indivíduos de cor negra apresentaram níveis de 25(OH)D reduzidos quando comparados aos brancos ( $p = 0.019$ ) [27]. Em outro estudo que incluiu 102 idosos moradores de casa de idosos na cidade de Porto Alegre, 85,7% apresentavam deficiência de vitamina D [28]. Em pacientes com doença renal crônica, a prevalência de hipovitaminose D também é comum. Diniz et al. [8] encontraram uma elevada frequência de hipovitaminose D (72,6%).

### **2. 3 Doença Renal Crônica e Vitamina D**

Nos últimos anos, o papel da vitamina D na doença renal tem chamado atenção da comunidade científica, cuja função da vitamina D tem sido associada não apenas a um risco aumentado de doença óssea e metabólica, mas também a outros problemas clínicos relevantes, incluindo vários tipos de neoplasias e doenças cardiovasculares [29]. Ao mesmo tempo, níveis baixos de vitamina D têm sido associados a maior risco de mortalidade na população geral e em pacientes com DRC [30,31].

Hipovitaminose D é comum nos pacientes portadores de DRC [8,9]. A alta prevalência de deficiência/insuficiência de 25(OH)D na DRC pode ser parcialmente explicada pela falta de exposição à luz solar, o que é característico de pacientes com doenças crônicas. Além disto, a redução da síntese cutânea de colecalciferol em resposta à luz solar, a reduzida ingestão de alimentos que são fontes naturais de vitamina D, a perda urinária de 25(OH)D em nefropatias proteinúricas e a diminuição da megalina renal (proteína de ligação da 25(OH)D no túbulo proximal) à medida que a TFG cai,

reduzindo, assim, a reabsorção tubular da 25(OH)D, também parecem contribuir para hipovitaminose D nesta população [32,33].

Como mencionado anteriormente, o rim é o principal órgão envolvido na produção da forma bioativa de vitamina D a partir de precursores inertes. Conseqüentemente, a DRC é um importante fator de risco para o desenvolvimento de deficiência de calcitriol, a forma ativa da vitamina D [34]. Há vários mecanismos através dos quais a 1,25(OH)<sub>2</sub>D reduz durante o curso da DRC, começando com a diminuição da disponibilidade do seu precursor 25(OH)D, que é o substrato para a produção de 1,25(OH)<sub>2</sub>D [35-37]. Além disto, a perda de massa renal funcionante limita a formação de 1,25(OH)<sub>2</sub>D pela enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase no túbulo renal proximal [38]. Mais recentemente, a identificação do hormônio fosfatúrico FGF-23 promoveu um avanço no entendimento dos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo da DRC, especialmente na patogênese do hiperparatireoidismo secundário. Aumento dos níveis séricos de FGF-23 é observado precocemente no curso da DRC, quando a TFG cai abaixo de 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, e são extremamente elevados nos pacientes em diálise. O FGF-23 é sintetizado pelos osteócitos e osteoblastos, e exerce seus efeitos via receptor FGF, geralmente na presença do co-fator Klotho. As principais ações do FGF-23 é a regulação da homeostasia do fosfato e do metabolismo da vitamina D, promovendo aumento da excreção urinária de fosfato e inibição da síntese de calcitriol [39-41]. Além destes fatores, contribuição adicional de potenciais efeitos supressores de fragmentos de carboxila (C)-terminal do PTH parece também influenciar na síntese de 1,25(OH)<sub>2</sub>D [42].

### **2. 3. 1 Vitamina D, Proteinúria e Função Renal**

Os atuais estudos que contemplam a associação entre vitamina D e doentes renais crônicos tem demonstrado que este grupo de pacientes apresentam, por diversos fatores, uma elevada prevalência de hipovitaminose D. Crescem as evidências que a deficiência (vitamina D sérica <20 ng/ml) ou insuficiência (20-30 ng/ml) podem acelerar a progressão e a deterioração da função renal, bem como hipovitaminose D tem sido associado a maior morbidade e mortalidade em pacientes com DRC [10,30,43,44]

Diversos modelos experimentais demonstram que o tratamento com vitamina D ou seus análogos apresentam efeitos de nefroproteção, como prevenção da fibrose, apoptose e inflamação [43]. Esses dados sugerem que a vitamina D reduz a albuminúria e retarda a progressão da doença renal através da ativação do VDR, expresso em diferentes alvos celulares, entre os quais o podócito [45-47]. O VDR é induzido na presença de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  e confere proteção ao podócito através de diversas vias de sinalização, como inibição do sistema renina-angiotensina, redução da apoptose celular, da fibrose renal e aumento da expressão de genes específicos do podócito, mantendo a sua estrutura e função no filtro glomerular [14,45-49].

Recente meta-análise sugere que existe uma associação entre terapia com análogos da vitamina D e menor mortalidade cardiovascular e por qualquer causa em pacientes com DRC, efeito este que está além de suas propriedades sobre o metabolismo mineral e ósseo [50]. Pilz et al. [30] estimaram uma redução significativa de 14% no risco relativo de mortalidade com o aumento de 10 ng/ml no nível sérico de 25 (OH)D em pacientes com DRC; estes autores sugeriram um redução não linear no risco de morte com o aumento da concentração sérica de 25(OH)D até um limite considerado adequado, de cerca de 30 ng/ml, acima do qual benefícios podem não mais serem observados. No entanto, o efeito da suplementação de vitamina D nativa

(colecalfiferol ou ergocalferol) na morbi-mortalidade em pacientes com DRC ainda não está estabelecido.

Alguns estudos têm demonstrado uma correlação entre a deficiência de vitamina D e gravidade da albuminúria [51]. Em uma revisão sistemática, de Borst et al. [52] demonstraram que a proteinúria reduziu em 16% nos pacientes tratados com vitamina D ativa. Em estudo recente, Liu et al. [53] verificaram que o calcitriol foi eficaz na redução da proteinúria em pacientes com Nefropatia por IgA, demonstrando que a adição de calcitriol a um inibidor do sistema renina-angiotensina foi eficaz para reduzir a proteinúria nesses pacientes. Outro ensaio clínico randomizado confirmou que a adição de 2 mg de paricalcitol a um bloqueador do receptor de angiotensina II reduziu a albuminúria, além da pressão arterial, em pacientes com nefropatia diabética [13].

Agarwal et al. [54], em um ensaio clínico randomizado e controlado com placebo, avaliaram o uso de paricalcitol em pacientes com DRC estágios 3 e 4 e hiperparatireoidismo secundário. Após ajuste para diversas co-variáveis, incluindo diabetes melito e uso de bloqueadores da angiotensina, a redução da proteinúria foi estatisticamente significativa. Allborzi et al. [12] encontraram resultados semelhantes sobre a albuminúria em pacientes com DRC estágios 2 e 3, independente do efeito de supressão de PTH. Em outro trabalho, Molina et al. [55] observaram que, além de melhorar o hiperparatireoidismo secundário associado a DRC, a suplementação de vitamina D com colecalfiferol apresentou um efeito benéfico na diminuição da albuminúria, com potencial efeito de retardar a progressão da DRC.

## **2. 4 Estrutura e função da célula epitelial podocitária**



Os podócitos são células epiteliais diferenciadas e especializadas que apresentam prolongamentos primários e secundários, denominados pedicelos, que cobrem a superfície externa da membrana basal glomerular. São constituídas a partir das células tronco mesenquimais, onde o corpo celular do podócito maduro situa-se no espaço urinário no lado luminal, e seus pedicelos (processos podocitários) encontram-se no lado oposto, ancorados à membrana basal glomerular (MBG) via  $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e  $\alpha$ ,  $\beta$ -dístroglicanos. Os pedicelos estão conectados entre si através de uma estrutura especializada de junção célula-célula, denominada diafragma em fenda, localizada entre dois podócitos adjacentes, considerada por Barisoni et al. [56] e Pavenstadt et al. [57] como a barreira mais importante à filtração de proteínas.

Uma complexa arquitetura das proteínas do podócito é necessária para que esta célula possa desempenhar as suas múltiplas funções, tais como: exercer a manutenção da integridade de barreira (tamanho e carga) às proteínas e outras macromoléculas, a manutenção da forma da alça capilar glomerular, manter oposição à pressão gerada dentro do glomérulo, síntese e manutenção da membrana basal glomerular e recentemente descoberta, a produção e secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) necessário para a integridade da célula endotelial do capilar glomerular [58,59].

## **2. 5 Estrutura molecular das proteínas do podócito e fatores de crescimento**

Os podócitos são células polarizadas, carregadas negativamente, e sua forma peculiar e dinamicamente modificável deve-se ao citoesqueleto rico em microfilamentos de F-actina e miosina. O citoesqueleto é constituído por três elementos ultraestruturais: microfilamentos (7-9 nm), filamentos intermediários (10 nm) e microtúbulos (24 nm).

Diversas proteínas mantêm a arquitetura podocitária através de ligações com a actina, como a sinaptopodina, situada na membrana luminal, e a alfa actinina-4, próxima a membrana basal. A alfa actinina-4 atua na regulação da morfologia e da motilidade do podócito, e também na cascata de sinalização intracelular [60]. Em 2001, Kerjaschki [61] caracterizou três diferentes domínios do podócito com base na anatomia molecular de cada segmento, conforme descrito a seguir.

Os espaços entre os processos podocitários são poros de filtração altamente organizados, medindo entre 25 a 60 nm, onde o diafragma em fenda serve de “ponte” entre dois podócitos. Esse diafragma tem 6 nm de espessura e localiza-se 60 nm acima da membrana basal glomerular. Na ultraestrutura, descrita inicialmente por Karnovsky [62], observa-se séries de retângulos de 4 x 14 nm de área que configuram uma estrutura tipo “zíper”, que anatomicamente constituiria uma barreira de tamanho à macromoléculas na função de filtro do glomérulo.

A estrutura molecular do diafragma em fenda inclui um número crescente de proteínas, que estão organizadas em microdomínios funcionais dentro de um componente lipídico e se prendem ao citoesqueleto através de interações com outras proteínas como a CD2 (CD2AP), um ligante da molécula de adesão CD2 [56,57]. A seguir são caracterizadas as proteínas mais importantes da célula podocitária.

### 2. 5. 1 Diafragma em fenda

a) Nefrina: descoberta inicialmente por Tryggvason em 1999 [63], a nefrina é o produto do gene NPHS1, uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas. Contem um domínio extracelular longo com oito repetições do tipo imunoglobulina e um módulo de fibronectina tipo III, e um pequeno domínio intracelular. As moléculas

de nefrina estendem-se umas sobre as outras a partir das interdigitações dos pedicelos, com disposição em paralelo e ligadas por pontes dissulfeto, permitindo o fechamento da fenda como um “zíper”. A nefrina participa das funções do citoesqueleto do podócito interagindo com a actina, através de proteínas adaptadoras Nck, e com a proteína NEPH1, formando cis-oligômeros heterogêneos. Uma mutação autossômica recessiva da nefrina causa síndrome nefrótica congênita, tipo *Finish*, com surgimento de proteinúria ainda intra-útero, e histologicamente caracterizada por esclerose mesangial, em que ocorre perda progressiva de função renal e evolução para DRC terminal [63,64].

b) Podocina: o gene NPHS2 codifica a podocina, uma proteína de 42-kDa da família da estomatina, de localização intracitoplasmática que está associada a componente lipídico e apresenta forma de “grampo de cabelo”. A podocina interage com a nefrina e com a CD2AP, facilitando a sinalização da nefrina. A interação entre nefrina e podocina resulta em uma estreita relação com filamentos de actina, o que deve ocasionar estabilização estrutural do diafragma em fenda [65,66]. A mutação do gene NPHS2 está presente em famílias com glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) hereditária, expressando-se frequentemente na infância mas também em adultos. Sua apresentação fenotípica é síndrome nefrótica córtico-resistente com baixo risco de recorrência em transplante renal [67,68].

## 2. 5. 2 Domínio de membrana apical

A membrana apical do podócito é carregada negativamente devida à presença de diversas sialoproteínas de superfície aniônicas, como a podocalixina, podoplanina e podocandina. Essa carga negativa limita a passagem de albumina, carregada negativamente, e mantém a separação física dos podócitos adjacentes [69].

a) A podocalixina é a maior das sialoproteínas transmembrana (165-kDa), pertence a família das sialomucinas, e tem uma importância crítica para a formação e preservação da arquitetura celular dos podócitos, possivelmente impedindo a adesão das células parietais da cápsula de Bowman aos podócitos [70].

b) O *Transient Receptor Potential Cation Channel 6* (TRPC6) está localizado na membrana luminal do podócito. Comunica-se com a alfa-actinina do citoesqueleto sendo assim uma molécula sinalizadora, ao mesmo tempo que mantém a arquitetura do podócito e a integridade do filtro glomerular [71]. Múltiplas injúrias renais resultam na desregulação das funções do TRPC6, induzindo proteinúria em glomerulopatias proteinúricas adquiridas [72]. Recentemente, do Nascimento et al. [16] demonstraram em pacientes diabéticos e pré diabéticos aumento da expressão urinária do RNAm de TRPC6 e de outras moléculas específicas do podócito comparado a indivíduos saudáveis. Nos pacientes diabéticos, a nefrinúria foi preditiva de albuminúria patológica, e houve uma correlação positiva e significativa entre o estágio da nefropatia diabética e a nefrinúria.

### 2. 5. 3 Fator de crescimento vascular derivado do endotélio

O fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF) expressa-se no glomérulo normal, no podócito e nas células endoteliais. O VEGF pertence a superfamília do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), e é composta por cinco membros: VEGF (também chamado VEGF-A), PlGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Essas proteínas ligam-se a receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) de sinalização intracelular. A sinalização via VEGFR-2 é considerada a mais angiogênica, e o VEGFR-1 é um regulador negativo da angiogênese.

O VEGF-B tem um potencial angiogênico muito limitado e está associado ao metabolismo dos lipídios [73].

O VEGF apresenta uma expressão variável no tecido renal em nefropatias como na síndrome nefrótica idiopática: aumentada nas alterações glomerulares mínimas e reduzida na glomerulosclerose segmentar e focal em relação a controles normais; a sua redução confere uma pior evolução clínica aos pacientes com síndrome nefrótica [74].

A administração de VEGF está associada com estabilização da função renal em vários modelos de fibrose renal. Em sua forma endógena o VEGF é relacionado à sobrevivência, proliferação e diferenciação de células endoteliais glomerulares. Essa ação protetora se deve, principalmente, à preservação das estruturas dos capilares glomerulares e peritubulares [75].

#### 2. 5. 4 Fator de crescimento transformador beta

O fator de crescimento transformador beta ( $TGF\beta$ ) está supra-regulado na doença podocitária progressiva, o que resulta do aumento da pressão das cadeias biomecânicas sobre o podócito. O  $TGF\beta$  desencadeia diversos mecanismos pró-fibróticos, entre os quais citam-se os depósitos de proteínas na matriz extracelular e espessamento da MBG, inibição da degradação das proteínas da matriz, apoptose do podócito e a transição epitélio-mesênquima do podócito, que em conjunto resultam no desenvolvimento de fibrose renal progressiva [76].

### **2. 6 Efeitos da vitamina D sobre a célula podocitária**

A albuminúria é um marcador precoce de lesão renal, com potencial de progressão para proteinúria, glomeruloesclerose e insuficiência renal crônica. A redução da albuminúria tem sido um alvo terapêutico importante da estratégia de nefroproteção. Dados epidemiológicos do Third National Health and Nutrition Examination Survey mostram uma correlação entre deficiência de vitamina D e aumento da prevalência de albuminúria na população adulta americana [10], sugerindo uma atividade intrínseca anti-proteinúrica da vitamina D.

O VDR é um mediador da atividade biológica da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> [14,46,48,77]. Estudos demonstram que a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> estimula a expressão do gene da nefrina através do VDRE no *promoter* proximal do gene da nefrina. Em um modelo experimental complexo [14], foi demonstrado que o complexo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR ativado sofre translocação para o núcleo e forma um heterodímero com o receptor X do retinóide. O complexo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-VDR-RXR liga-se aos elementos de resposta à vitamina D (VDRE) recrutando co-ativadores e modificando a estrutura da cromatina nuclear, permitindo assim que o RNAm da polimerase II inicie a transcrição gênica.

Postula-se que os análogos da vitamina D possam ter como alvo, entre outras células, o podócito, e mais especificamente moléculas presentes no diafragma em fenda, como a nefrina e a podocina. Evidências experimentais dão suporte à hipótese de que os podócitos são um alvo para ação da vitamina D, tendo efeitos protetores sobre essas células. Mizobuchi et al. [78] testaram uma combinação de inibidor da ECA e paricalcitol para tratar ratos com nefrectomia 5/6, demonstrando que estas drogas em conjunto reduziram a progressão da insuficiência renal, e a associação foi mais eficaz do que o uso isolado dos mesmos. Foram observados também redução do índice de glomeruloesclerose, da excreção urinária de proteínas e supressão de fatores pró-fibróticos como TGF- $\beta$  e MCP-1.

Adicionalmente, o efeito protetor da vitamina D sobre o podócito foi associado ao aumento da expressão de nefrina na fenda diafragmática e à redução da perda podocitária progressiva que ocorre em diversas formas de doença renal, como na nefropatia diabética [77].

Outro estudo que avaliou o podócito como célula-alvo da ação renoprotetora da vitamina D foi o de Kuhlmann et al. [79] em ratos nefrectomizados tratados com 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Estes autores descreveram redução na excreção urinária de albumina, e um aumento significativo do número e da densidade das células podocitárias no glomérulo. Em estudo recente, Lydia et al. [80] empregando um modelo de nefrose por adriamicina em camundongos, mostraram que o análogo da vitamina D 22-oxacalcitriol reduziu a injúria ao podócito e o grau de proteinúria, preveniu a hiperfiltração glomerular, reduziu o índice de glomerulosclerose e de fibrose intersticial na biópsia renal. Em 2012, um grupo de Chicago relatou o efeito nefroprotetor da sinalização do receptor da vitamina D no podócito em ratos diabéticos. O uso de colecalciferol em doses baixas nesses animais transgênicos preveniu albuminúria, atenuando a perda e a apoptose de podócitos, e reduziu o índice de fibrose glomerular [51].

Schwarz et al. [66] em modelo experimental com ratos nefrectomizados demonstraram que após o tratamento com 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> houve redução de albuminúria e do dano glomerular. Outros autores [48,81], utilizando o mesmo modelo, demonstraram que a 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> suprimiu a hiperexpressão glomerular de TRPC6, restaurou a morfologia do podócito e reduziu a proteinúria. Em modelos animais de nefropatia induzida, a vitamina D<sub>3</sub> promoveu redução da podocitopenia, da podocitúria, da hipertrofia e do índice de apoptose dos podócitos; houve estímulo à transcrição dos genes da nefrina, podocina,  $\alpha_3\beta_1$  integrina e distroglicanos, e supressão do TGF- $\beta_1$  e do TRPC6 [48,49,78,82]. Com bases nesses dados, parece consistente supor que o conjunto

destes efeitos da vitamina D3 no rim seja o fator que reduz a albuminúria e confere nefroproteção na doença renal crônica.

## **2. 7 Diagnóstico não invasivo da podocitúria**

O reconhecimento de que os podócitos “descolam” da MBG para o espaço urinário de Bowman após uma agressão inflamatória, hemodinâmica, tóxica ou isquêmica, e que podócitos viáveis ou em apoptose “escoam” na urina e podem ser isolados de células do sedimento urinário, abriu novas avenidas de diagnóstico não invasivo da lesão do filtro glomerular. Estudos iniciais [83-86] detectaram podócitos viáveis por imunofluorescência, e posteriormente produtos da degradação destas células quantificando o RNA mensageiro (RNAm) de proteínas dos microdomínios do podócito em diversos tipos de glomerulonefrites. Como exemplos, Lemley et al. [87] correlacionaram a presença de podocitúria com atividade da Nefropatia por IgA e Patari et al. [88] detectaram nefrina pelo método de Western blot em urina de pacientes com nefropatia diabética. Yu et al [89], em um estudo experimental relevante, sugeriram que a podocitúria não seria apenas um processo patológico que precede a proteinúria, mas um biomarcador ainda mais sensível e específico do que esta para detectar atividade de doença e dano glomerular progressivo.

O RNAm de proteínas do podócito pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT) em células do sedimento urinário foi mensurado em modelos experimentais [90] e em pacientes com glomerulopatias proteinúricas [91]. Sato et al. [92] demonstraram a utilidade clínica e a acurácia da podocitúria seriada para o diagnóstico e monitorização da progressão da doença glomerular. Estes autores



mostraram que a podocitúria elevada e persistente correlaciona-se positivamente com a proteinúria e com dano glomerular histologicamente comprovado em biópsias renais.

Trabalhos do nosso grupo mostraram inibição da transcrição gênica de proteínas específicas do podócito no tecido renal (podocitopenia) e aumento da excreção urinária dos RNAm associados ao podócito (podocitúria) em diferentes glomerulopatias primárias e secundárias [15]. Em pacientes com nefropatia diabética e em indivíduos com pré diabetes, a podocitúria, representada por nefrinúria, mostrou uma boa correlação com o estágio da doença diabética e um valor preditivo elevado para proteinúria patológica [16]. Adicionalmente, o efeito de drogas imunossupressoras no tratamento das doenças glomerulares reduz a podocitúria por conferir maior viabilidade e recuperação funcional do podócito glomerular. Rodrigues et al [15] demonstraram redução significativa dos níveis urinários de RNAm associados ao podócito após 6 meses de tratamento imunossupressor, os quais se mantiveram em níveis baixos ao final de um ano de seguimento. Assim, a monitorização laboratorial da podocitúria no sedimento urinário por PCR-RT pode auxiliar na avaliação de resposta ao tratamento e manutenção desta resposta ao longo do tempo.

## **2. 8 Estratégias para localizar e selecionar as informações**

As estratégias de busca de referências bibliográficas das bases que fundamentam os objetivos deste estudo foram focadas na correlação entre a vitamina D e a Doença Renal Crônica, sobre a prevalência de hipovitaminose D em pacientes nos diferentes níveis de filtração glomerular, a sua correlação com a proteinúria e, primariamente, sobre os efeitos da vitamina D na expressão urinária dos RNAm das proteínas específicas do podócito. Secundariamente, focamos a relação da vitamina D com

parâmetros do metabolismo mineral e ósseo. A busca envolveu bases de dados como PubMed, Medline e SciELO, no período de 1999 à 2014, incluindo um estudo publicado em 1982. Foram realizadas buscas através dos termos relacionados com “vitamin D”, “VDR”, “chronic kidney disease”, “proteinura”, “glomerular filtration rate”, “podocytes”, “podocyturia”, “nephrin”, “podocin”, “podocalyxin”, “TRPC6”, “VEGF-A” e “TGFbeta1”. Através dessa busca, foram selecionados 92 artigos, que foram utilizados para redação do texto e citados ao longo da Introdução e Referencial Teórico desta dissertação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo primário**

Avaliar a associação entre nível sérico da 25-hidroxivitamina D [25-(OH)D] e a expressão gênica das proteínas associadas ao podócito em pacientes portadores de doença renal crônica.

#### **3.2 Objetivos secundários**

1. Avaliar a correlação entre nível sérico basal da 25-hidroxivitamina D [25-(OH)D] com a expressão urinária do RNA mensageiro (RNAm) das moléculas associadas ao podócito.

2. Avaliar o efeito da reposição oral de vitamina D3 sobre expressão urinária do RNAm das moléculas associadas ao podócito.

3. Correlacionar a proteinúria com o nível sérico da 25-hidroxivitamina D [25-(OH)D] e expressão urinária do RNAm das moléculas associadas ao podócito no período basal e após seis meses de reposição oral de vitamina D3.

4. Correlacionar a função renal com nível sérico da 25-hidroxivitamina D [25-(OH)D] e expressão urinária do RNAm das moléculas associadas ao podócito no período basal e após seis meses de reposição oral de vitamina D3.

#### **4. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E DA REVISÃO DA LITERATURA**

1. Thomé FS, Manfro RC, Barros EJG, Prompt CA, Karohl C. Insuficiência Renal Crônica. In: Barros E MR, Thomé FS, Gonçalves LFS, ed. Nefrologia, Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2006:423-440.

2. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 2013; 3:1-150.

3. Jones C, McQuillan G, Eberhardt M, Herman W, Goresh J, Salive M et al. Serum creatinine levels in the US population. Third National Health and Nutritional Estimation Survey. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:992-99.

4. Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 248-53.

5. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR et al. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise Crônica 2012. *J Bras Nefrol* 2014; 36: 48-53.

6. Burmeister JE, Mosmann CB, Costa VB, Saraiva RT, Gonçalves LF, Rosito GA et al. Prevalence of Cardiovascular Risk Factors in Hemodialysis Patients - The CORDIAL Study. *Arq Bras Cardiol* 2014; 102: 473-80.

7. Levin A, Hemmelgarn B, Culleton B, Tobe S, McFarlane P, Ruzicka M et al. Guidelines for the management of chronic diseases. *CMAJ* 2008; 179: 1154-62.

8. Diniz HF, Romao MF, Elias RM, Romao J, João E. Vitamin D deficiency and insufficiency in patients with chronic kidney disease. *J Bras Nefrol* 2012; 34: 58-63.
9. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis* 2005; 45:1026-33.
10. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzekk JD, Weiss NS. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis* 2007; 50: 69-77.
11. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 325-49.
12. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension* 2008; 52: 249-255.
13. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M, Audhya P, Coyne D, Garimella T et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2010; 376: 1543-1551.
14. Deb DK, Wang Y, Zhang Z, Nie H, Huang X, Chen Y et al. Molecular Mechanism Underlying 1,25-Dihydroxivitamin D Regulation of Nephtrin Gene Expression. *J Biol Chem* 2011; 286: 32011-17.
15. Rodrigues PG, Bringhenti RN, Nascimento J, Joelsons G, dos Santos M, Pereira S et al. Expression patterns of podocyte-associated mRNAs in patients with proliferative or non-proliferative glomerulopathies. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7: 2185-98.
16. do Nascimento J, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, dos Santos M et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. *BMC Nephrol* 2013;14: 214-19.

17. Morsch C, Veronese FJV. Doença Renal Crônica: Definição e Complicações. *Clin d Biom Res* 2012; 31: 1.
18. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 353-73.
19. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005; 135: 317-22.
20. Houtari A, Herzig KH. Vitamin D and living in northern latitudes - an endemic risk area for vitamin D deficiency. *Int J Circupolar Health* 2008; 67(2-3): 164-78.
21. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* 2012; 523:95-102.).
22. Kovesdy CP, Quarles LD. Fibroblast growth factor-23: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28:2228-36.
23. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289:F8-28.
24. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-81.
25. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009; 20:1807-20.
26. Karohl C, Su S, Kumari M, Tangpricha V, Veledar E, Vaccarino V et al. Heritability and seasonal variability of vitamin D concentrations in male twins. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:1393-8.
27. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MC, Sasaki AL, dos Reis LM et al. Vitamin D status in a sunny country: where has the sun gone? *Clin Nutr* 2010; 29:784-88.

28. Scalco R, Premaor MO, Fröhlich PE, Furlanetto TW. High prevalence of hypovitaminosis D and secondary hyperparathyroidism in elders living in nonprofit homes in South Brazil. *Endocrine* 2008; 33:95-100.
29. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117:503-11.
30. Pilz S, Iodice S, Zittermann A, Grant WB, Gandini S. Vitamin D status and mortality risk in CKD: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Kidney Dis* 2011; 58:374-82.
31. Zittermann A, Iodice S, Pilz S, Grant WB, Bagnardi V, Gandini S. Vitamin D deficiency and mortality risk in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2012; 95:91-100.
32. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84:18-28.
33. Takemoto F, Shinki T, Yokoyama K, Inokami T, Hara S, Yamada A. Gene expression of vitamin D hydroxylase and megalin in the remnant kidney of nephrectomized rats. *Kidney Int.* 2003;64:414-20.
34. Echida Y, Mochizuki T, Uchida K, Tsuchiya K, Nitta K. Risk factors for vitamin D deficiency in patients with chronic kidney disease. *Intern Med* 2012; 51: 845-50.
35. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007; 71: 31-8.
36. Kawashima H, Kraut JA, Kurokawa K. Metabolic acidosis suppresses 25-hydroxyvitamin in D3-1alpha-hydroxylase in the rat kidney. Distinct site and mechanism of action. *J Clin Invest* 1982; 70: 135-40.
37. Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Koderu Y, Kawaguchi Y, Hosoya T et al. Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D3 1-alpha-

hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1- $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  in intact animals. *Endocrinology* 1999; 140: 2224-31.

38. Dusso AS, Tokumoto M. Defective renal maintenance of the vitamin D endocrine system impairs vitamin D renoprotection: a downward spiral in kidney disease. *Kidney Int* 2011; 79: 715-29.

39. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M et al. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1305-15.

40. Inda AJF, Melamed ML. Vitamin D and Kidney disease: what we know and what we do not know. *J Bras Nefrol* 2013 ;35: 323-331.

41. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2004;19:429-35.

42. Usatii M, Rousseau L, Demers C, Petit JL, Brossard JH, Gascon-Barré M et al. Parathyroid hormone fragments inhibit active hormone and hypocalcemia-induced 1,25(OH) $_2$ D synthesis. *Kidney Int* 2007; 72: 1330-5.

43. Kim CS, Kim SW. Vitamin D and chronic kidney disease. *Korean J Intern Med.* 2014;29:416-427.

44. Al Mheid I, Patel RS, Tangpricha V, Quyyumi AA. Vitamin D and cardiovascular disease: is the evidence solid? *Eur Heart J* 2013; 34:3691-8.

45. Wang Y, Deb DK, Zhang Z, Sun T, Liu W, Yoon D et al. Vitamin D Receptor Signaling in Podocytes Protects Against Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 1977-86.

46. Li YC. Podocytes as Target of Vitamin D. *Curr Diabetes Rev* 2011; 7: 35-40.

47. Wang Y, Borchet ML, DeLuca H. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int* 2012; 81: 993-1001.

48. Sonneveld R, Ferrè S, Hoenderop JG, Dijkman HB, Berden JH, Nijenhuis T et al. Vitamin D down-regulates TRPC6 expression in podocyte injury and proteinuric glomerular disease. *Am J Pathol*. 2013;182:1196-204.
49. Xiao H, Shi W, Liu S, Zhang B, Xu X, Liang L et al. Podocyte Injury is Suppressed by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> via modulation of transforming growth factor- $\beta$ <sub>1</sub>/Bone Morphogenetic Protein-7 Signalling in Puromycin Aminonucleoside Nephropathy Rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 682-689;
50. Zheng Z, Shi H, Jia J, Li D, Lin S. Vitamin D supplementation and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of 20 observational studies. *BMC Nephrol* 2013; 14:199, doi: 10.1186
51. Isakova T, Gutierrez OM, Patel NM, Andress DL, Wolf M, Levin A. Vitamin D deficiency, inflammation, and albuminuria in chronic kidney disease: complex interactions. *J Ren Nutr* 2011;21:295-302.
52. de Borst MH, Hajhosseiny R, Tamez H, Wenger J, Thadhani R, Goldsmith DJ. Active vitamin D treatment for reduction of residual proteinuria: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1863-1871.
53. Liu Lj, Lv JC, Shi SF, Chen YQ, Zhang H, Wang HY. Oral calcitriol for reduction of proteinuria in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2012; 59:67-74.
54. Agarwal R, Tian J, Hippensteel RL, Melnich JZ, Qiu P, Battle et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 2823-28.
55. Molina P, Górriz JL, Molina MD, Peris A, Beltrán S, Pallardó LM et al. The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29: 97-109.
56. Barisoni L, Mundel P. Podocyte Biology and the Emerging Understanding of Podocyte Disease. *Am J Nephrol* 2003; 23: 353-60.
57. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.



58. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 271-82.
59. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role of proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; 69: 2131-47.
60. Mundel P, Reiser J, Zúñiga MBA, Pavenstädt H, Davidson GR, Zeller R et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997; 236: 248-58.
61. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular basis of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-87.
62. Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1972; 2: 35-60.
63. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2440-45.
64. Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S et al. Nephrin stands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 2004; 114: 1475-83.
65. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm. *Am J Pathol* 2002; 161: 1459-66.
66. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-87.
67. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A et al. NPHS2 encoding the glomerular protein podocin is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-54.
68. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tête MJ, Legendre C et al. NPHS2 mutation analysis show genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 65:1026-30.

69. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: 579-96.
70. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001; 108: 289-301.
71. Dryer SE, Reiser J: TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: 689–701.
72. Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T et al. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 29–36.
73. Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomita K. Glomerular Endothelial Cells Are Maintained by Vascular Endothelial Growth Factor in the Adult Kidney. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195: 43-54.
74. Ostalska-Nowicka D, Malinska A, Zabel M, Witkiewicz W, Nowicki M. Nephrotic syndrome unfavorable course correlates with downregulation of podocyte vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49: 472-78.
75. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 661-66.
76. Lee HS. Pathogenic role of TGF- $\beta$  in the progression of podocyte diseases. *Histol Histopathol* 2011; 26:107-16.
77. Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, Minto AW, Li YC et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008; 73: 163-71.
78. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Slatopolsky E et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D

analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1796-806.

79. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, Amann K et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F526-F533.

80. Lydia A, Asanuma K, Nonaka K, Takagi M, Jeong KH, Kodama F et al. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. *Am J Nephrol* 2012; 35: 56-68.

81. Zhang X, Song Z, Guo Y, Zhou M. The novel role of TRPC6 in vitamin D ameliorating podocyte injury in STZ-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2014 [Epub ahead of print].

82. Zou M, Yu J, Nie G, He W-S, Li M, Xu H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> decreases adriamycin-induced podocyte apoptosis and loss. *Int J Med Sci* 2010; 7: 290-99.

83. Haram M, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Matsumoto M, Yamamoto T et al. Immunohistochemical and urinary markers of podocyte injury. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 43-48.

84. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebiara I et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-83.

85. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal glomerulosclerosis. *Nephron* 2001; 89: 342-47.

86. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 231-38.

87. Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002; 1475-85.

88. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthöfer H. Nephrouria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969-74.

89. Yu D, Peterman A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1733-41.
90. Kim YH, Goyal M, Kurnit DM, Wharram B, Wiggins J, Holzman L et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 2001; 60: 957-68.
91. Szeto C-C, Lai K-B, Chow K-M, Wharram B, Wiggings J, Holzman L et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chem Acta* 2005; 361: 182-90.
92. Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M et al. Urine Podocyte mRNAs Mark Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1041-52.

## 5. ARTIGO EM INGLÊS

Effects of cholecalciferol supplementation on urine podocyte-associated mRNAs in chronic kidney disease

João Rodolfo Teló Timm<sup>1</sup> Cristina Karohl<sup>1,2</sup>, Mariane dos Santos<sup>1</sup>, Sane Vianna Pereira<sup>1</sup>, Maysa Lucena<sup>1</sup>, Francisco Veríssimo Veronese<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Post Graduate School of Medicine: Medical Sciences Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Nephrology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author: Francisco Veríssimo Veronese MD, PhD. Nephrology Division, room 2030, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil. ZIP Code: 90035-003. Fax: +55.51.3359-8121. e-mail: fveronese@hcpa.ufrgs.br

Running title: Vitamin D3 and podocyturia in chronic kidney disease

Number of tables: 3

Number of figures: 2

## Abstract

**Aim:** To evaluate the effects of cholecalciferol supplementation on the expression of podocyte-associated mRNAs in patients with chronic kidney disease (CKD).

**Methods:** Twenty-seven patients with CKD and suboptimal serum vitamin D [25(OH)D] levels and stages 2 to 4 CKD were included. Patients were treated with cholecalciferol for 6 months, according to serum 25(OH)D levels. 25(OH)D, eGFR, proteinuria and mineral and bone metabolism parameters were assessed before and after treatment. Urine mRNA of nephrin, podocin, podocalyxin, transient receptor potential cation channel 6 (TRPC-6), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta_1$ ) was quantified using real-time polymerase chain reaction at baseline and after treatment. Correlations between podocyte markers, 25(OH)D, and kidney function were assessed.

**Results:** Glomerular filtration rate was reduced by  $-4.71$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup> in average (p=0.010 vs. baseline) over six months. No changes in proteinuria or mineral and bone metabolism parameters were observed after cholecalciferol supplementation. Urinary podocyte-associated mRNAs did not change significantly after treatment. However, patients who achieved serum 25(OH)D above 20 ng/mL at six months showed a trend of reduction of nephrin and podocin urine mRNA. Those patients whose serum 25(OH)D remained <20 ng/mL showed the opposite, a significant increase in podocalyxin and a trend of higher nephrin and podocin urine mRNA levels.

**Conclusion:** Cholecalciferol supplementation did not reduce urine podocyte mRNAs in these patients with CKD. A non significant reduction in the urinary mRNA of nephrin

and podocin was observed in patients who achieved higher serum levels of 25(OH)D at the end of treatment.

Keywords: chronic kidney disease, nephrin, podocin, proteinuria, vitamin D

## Introduction

Suboptimal serum vitamin D level is a common finding in patients with chronic kidney disease (CKD) [1,2]. Several observational studies have demonstrated an association between vitamin D deficiency and increased albuminuria, lower glomerular filtration rates and higher mortality risk [3-5]. Both experimental and clinical studies have suggested that vitamin D receptor (VDR) activation can reduce albuminuria, glomerular hyperfiltration, podocyte loss, glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and even all-cause and cardiovascular mortality [6-12]. Therefore, vitamin D may have pleiotropic effects on extra-mineral metabolism, possibly due to its role in anti-fibrotic, anti-inflammatory and anti-apoptotic processes [13].

Active vitamin D and its analogs may reduce albuminuria through podocyte protection [7,8]. Experimental studies demonstrated that podocytes express vitamin D 1-alpha hydroxylase and VDR. Therefore, these findings may suggest that 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> can be 1 $\alpha$ -hydroxylated and convert to active 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, which may play a paracrine and/or autocrine role [14]. Activated VDR are translocated to the nucleus where they bind to vitamin D response elements and stimulate the transcription of slit diaphragm-associated proteins such as nephrin and podocin [9,15]. In the VDR knock out mice there is increased secretion of pro-fibrotic factors and increased expression of fibronectin promoting glomerular fibrosis, while vitamin D administration in culture podocytes increases nephrin expression [16]. Vitamin D attenuates podocyte damage, reducing the index of podocyte fusion,



apoptosis and loss in urine in experimental models of diabetes [15] and adriamycin-induced nephrosis [8].

Podocyte detachment, due to apoptotic or nonapoptotic mechanisms, leads to podocyte loss in urine and ultimately to proteinuria. Podocyturia can be quantified by measuring podocyte byproducts or its fragments in urine. Although this non-invasive diagnostic tool is not yet used in clinical practice, it has been found to be more accurate than proteinuria in the detection of glomerular filter damage, being a marker of disease activity and progression [17]. To date, no clinical studies have evaluated the effect of cholecalciferol supplementation on podocyturia in patients with non-dialysis CKD. Therefore, the goal of this study was to evaluate the effect of cholecalciferol in patients with CKD stages 2 to 4 and low serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] level. We hypothesized that cholecalciferol supplementation may reduce urinary excretion of podocyte-associated mRNAs in these patients.

## **Material and Methods**

This single-centre, open-label prospective intervention study recruited 27 adult patients with CKD from August 2013 to May 2014. Inclusion criteria were age  $\geq 18$  years, estimated glomerular filtration rate (eGFR) between 15 and 89 mL/min/1.73m<sup>2</sup> (CKD stages 2 to 4) measured according to the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [18], stable kidney function in the previous three months, protein to creatinine ratio (Pr/Cr) in a random urine sample higher than 0.5, and a serum concentration of 25(OH)D  $< 30$  ng/mL. Exclusion criteria were acute intercurrent illness, current treatment with immunosuppressive drugs or other vitamin D

preparations including calcitriol or analogs, pregnancy, positivity for HIV, hepatitis B or hepatitis C antibodies, and kidney transplantation.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the HCPA and performed according to the 1975 Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent prior to enrollment. The Research Ethics Committee is registered in the Brazilian Human Research Protection Committee of the National Ministry of Health under Institutional Review Board number 00000921.

### *Intervention*

All patients received oral cholecalciferol for 6 months at doses recommended by Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K-DOQI) guidelines [19]. Treatment was prescribed as follows: a) 25(OH)D <5 ng/mL: 50.000 IU a week for 12 weeks, followed by 10.000 UI/week; b) 25(OH)D between 5 and 15 ng/mL: 50.000 UI a week for 4 weeks, followed by 10.000 UI/week; c) 25(OH)D between 16 to 30 ng/mL: 10.000 UI/week.

Serum calcium and phosphorus levels were reevaluated on the third month of cholecalciferol supplementation. If serum calcium was above upper normal limits, cholecalciferol supplementation was suspended. If phosphorus levels were above reference values, a phosphate binder was initiated or adjusted (500 to 1000 mg of oral calcium carbonate at meals).

### *Clinical characteristics and laboratory tests*

The following clinical data were collected from each participant: age, gender, race, mean systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), body mass index (BMI) calculated by weight and height ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), etiology of CKD, and current medications. Laboratory tests were performed at baseline and at 3 and 6 month follow-up. The following variables were assessed at baseline: blood glucose, creatinine, calcium, phosphorus, total cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides (Spectrophotometric, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland), LDL cholesterol (Friedewald formula), albumin, intact parathyroid hormone (chemiluminescence, Global Siemens Headquarters, Muenchen, Germany). Serum and urine creatinine were measured using the Jaffe reaction (Modular P Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). eGFR was calculated using the CKD-EPI formula, and proteinuria was quantified using the Pr/Cr. Serum 25(OH)D levels were evaluated using the DiaSorin 25OH Vitamin D immunoassay on a LIAISON® auto-analyzer (DiaSorin Inc, Northwest, MN, USA). Calcium and phosphorus levels were reevaluated at 3 months, and serum intact parathyroid hormone, calcium, phosphorus, 25(OH)D, and creatinine levels and urinary Pr/Cr were reassessed at 6 months.

#### *Podocyte-associated mRNA levels*

Podocyte-associated mRNA expression in the urinary sediment cells of a morning urine sample (whole stream) was determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), as previously described [20]. Samples were screened for the following mRNA transcripts: nephrin, podocin, podocalyxin, *transient receptor potential cation channel 6* (TPC6), vascular endothelial growth factor (VEGF-A) as an endothelial proliferation marker, and transforming growth factor beta ( $\text{TGF}\beta_1$ ) as a

marker of intra-renal fibrosis. Messenger RNA levels were measured at baseline and after six months of cholecalciferol supplementation.

In brief, mRNA was extracted using the QIAmp® RNA Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA) and RNA purity was determined by the ratio of absorbance at 260 and 280 nm ratio. RNA was reverse-transcribed using the cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to manufacturer's instructions, until a volume of 20 µL was achieved. RT-PCR was performed using a Taqman Universal PCR Master Mix, containing AmpliTaq Gold® DNA polymerase, Amperase UNG, passive reference (ROX), buffer solution and dNTPs (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in addition of specific primers for the amplification of the following genes: NPSH1, nephrin (ID:Hs00190446\_m1); NPSH2, podocin (ID:Hs00387817\_m1); podocalyxin (ID:Hs01574644\_m1); TRPC6 (ID:Hs00989190\_m1); VEGF-A (ID:Hs00173626\_m1) and TGF-β<sub>1</sub> (ID:Hs00998133\_m1), according to manufacturer instructions (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 18s rRNA (Taqman® PDAR) was used as an endogenous control. RT-PCR was performed in duplicate in 96-well plates containing 2 µL cDNA. Reactions were cycled at 50°C for 2 minutes, 60°C for 30 minutes followed by denaturation at 95°C for 5 minutes, and 40 cycles at 94°C for 20 seconds and 62°C for 60 seconds. Amplification was performed in a ABI PRISM 7000 SDS thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative quantification of target gene expression was performed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  comparative method where CT (threshold cycle) value is defined as the point where a statistically significant increase in the fluorescence has occurred.

### *Statistical analysis*

Continuous variables were described as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range, while categorical variables were expressed as proportions. Normality of distribution was determined using the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro Wilk tests. Messenger RNA values were log-transformed to conform to normality assumptions. Continuous variables were compared using independent t-test, Mann-Whitney or Kruskal Wallis tests. Pre- and post-treatment results were compared using paired t-tests or Wilcoxon's signed rank test. The association between urinary podocyte-associated mRNAs, serum 25(OH)D, eGFR and proteinuria was evaluated using Spearman correlation coefficients.

The change in mRNA expression after six months of cholecalciferol supplementation was analyzed using Generalized Estimating Equations (GEE) with a gamma-logarithmic model and Bonferroni's correction for multiple comparisons. GEE was used to evaluate between-group differences and changes over time in addition to group-by-time interactions. Results were expressed as median and confidence intervals (95%CI). Data were analyzed using the SPSS software for Windows (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Results were considered significant at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *Demographic and clinical characteristics*

The demographic and clinical characteristics are summarized in Table 1. Ten (38%) patients had chronic glomerulonephritis because they were referred from the Glomerular Disease outpatient clinic. Fifteen (55.6%) patients had stage 4 CKD, while

the remainder had an eGFR  $\geq 30$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Approximately 50% of the patients were using angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors or angiotensin II receptor antagonists (ARA-2). All patients presented with sub-optimal serum 25(OH)D levels (<30 ng/mL). After six months of oral cholecalciferol supplementation, serum 25(OH)D levels increased by 90.4% in patients with baseline 25(OH)D levels <20 ng/mL (p<0.011), and a smaller but significant 66% increase in serum 25(OH)D was also noted in patients with baseline 25(OH)D  $\geq 20$  ng/mL (p=0.005); these increases reflect the effectiveness of the prescribed treatment.

Glomerular filtration rate decreased significantly over the follow-up period (-4.71 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, p<0.010 vs. baseline). Patients with an eGFR between 15-29 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> showed mean serum 25(OH)D levels of 19.7 $\pm$ 6.0 and 28.9 $\pm$ 9.9 ng/mL at baseline and after 6 months, respectively (p<0.001). In patients with an eGFR  $\geq 30$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, the corresponding values were 18.2 $\pm$ 7.2 and 26.7 $\pm$ 13.4 ng/mL (p=0.042). Urinary Pr/Cr did not change after six months of cholecalciferol supplementation, as shown on Table 2.

Bone and mineral metabolism parameters (calcium, phosphorus and intact parathyroid hormone) did not differ between baseline and the six-month follow-up. However, a trend toward increasing levels was observed in both parathyroid hormone (p=0.086) and serum calcium (p=0.084) levels.

#### *Podocyte-associated mRNAs expression after cholecalciferol supplementation*

Urinary excretion of podocyte-associated mRNA did not change significantly from baseline to post-treatment assessment. Although median log<sub>10</sub> mRNA of nephrin, podocin, TRPC6, VGF-A and TGF $\beta$ <sub>1</sub> levels were lower at the end of treatment, this change was not significant (Table 3).

To evaluate the effect of achieving higher levels of serum 25(OH)D compared to lower levels on the urinary expression of podocyte-associated mRNAs, the sample was classified according to 25(OH)D status ( $<20$  ng/mL or  $\geq 20$  ng/mL). Also, patients were categorized according to stage 4 CKD or higher ( $15-29$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup> or  $\geq 30$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) at the end of follow up to determine if better or worse renal function could account for differences in mRNA expression. The median and interquartile ranges of log-transformed mRNA levels are represented in box plot graphs (Figures 1 and 2) showing the differences of mRNA expression between assessment points. Patients with higher levels of 25(OH)D at 6 months ( $\geq 20$  ng/ml) showed a non-significant reduction in the mRNA expression of podocyte proteins and growth factors. This tendency was not observed in patients with better kidney function (eGFR  $\geq 30$  ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). The inverse was true for patients with 25(OH)D levels below 19.9 ng/mL, who showed a non-significant increase in urinary mRNA excretion.

Although the log<sub>10</sub> mRNA of nephrin, podocin and podocalyxin (but not of the remaining podocyte mRNAs) decreased from baseline to the 6-month follow-up, these values did not differ between groups or showed group-by-time interactions. This was the case for nephrin, whose levels decreased from 4.48(3.03-5.93) to 2.79(1.46-4.12) ( $p=0.085$ ) in patients with 25(OH)D  $\geq 20$  ng/mL, and increased from 3.12(2.41-3.10) to 4.61(2.83-6.40),  $p=0.072$  in patients with vitamin D  $<20$  ng/mL. Podocin mRNA also decreased from 3.43(2.54-4.32) to 2.50(1.21-3.15),  $p=0.079$  in patients with 25(OH)D  $\geq 20$  ng/mL, but did not shown an inverse trend in patients with vitamin D  $<20$  ng/mL. Podocalyxin expression did not change in patients with higher 25(OH)D levels, but increased significantly at follow-up in patients with low serum 25(OH)D: 2.71(2.10-3.42) vs. 3.63(2.64-4.52),  $p=0.009$ . The remaining podocyte mRNAs did not change.

*Correlations between podocyte-associated mRNAs, 25(OH)D, proteinuria and kidney function*

Spearman correlations showed no relationship between the expression of podocyte-associated mRNAs and serum 25(OH)D levels, either at baseline or at the 6-month follow-up. Similarly, no correlations were observed between mRNA expression and eGFR or proteinuria. Serum 25(OH)D was positively and significantly correlated with urinary protein excretion both at baseline ( $r=0.517$ ,  $p=0.008$ ) and at the six-month follow-up ( $r=0.539$ ,  $p=0.005$ ).

## **Discussion**

The present study did not find an amelioration of mRNA profile of podocyte-associated byproducts in urine after 6 months of cholecalciferol supplementation. Proteinuria did not change as well. However, those with higher levels of 25(OH)D at 6 months ( $\geq 20$  ng/ml) showed a trend toward decreased nephrin and podocin expression, while the opposite pattern was observed in patients with low 25(OH)D levels.

Recent studies have shown that, in addition to its role in calcium and phosphorus metabolism, vitamin D is also involved in the regulation of renal, cardiovascular and immune functions [21]. Clinical and experimental studies have found that vitamin D decreases urinary albumin excretion and delays the progression of kidney disease [10,11,14-16,22]. The induction of VDR by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> or its analogues activates several signaling pathways involved in podocyte protection, such as the inhibition of the renin-angiotensin system, the attenuation of apoptosis and kidney fibrosis, and the increase of podocyte gene expression, thus preserving podocyte structure and function [7-9,14-16,23,24]. In animal models of induced nephropathy, vitamin D has been found to decrease the amount of podocytopenia, podocyturia, podocyte hypertrophy and



apoptosis, increase the expression of nephrin, podocin,  $\alpha_3\beta_1$  integrin and dystroglycan, and suppress TGF- $\beta_1$  and TRPC6 expression [6,25-28]. These findings suggest that the combined effects of vitamin D or its analogues on the glomerular podocyte may be critical for renoprotection, which have significant impact in reducing albuminuria and chronic kidney damage.

TRPC6 is a slit diaphragm protein whose expression increases as a result of podocyte injury in proteinuric nephropathies. ACE inhibitors increase TRPC6 expression, as does calcitriol use. 1,25(OH) $_2$ D $_3$  was found to normalize glomerular TRPC6 expression, restore podocyte morphology and reduce proteinuria in two experimental models of induced nephropathy [25,28], probably due to its effects on the TRPC6 *promoter*. In the present study, although cholecalciferol supplementation increased serum 25(OH)D, the intervention had no effect on TRPC6 expression, even in patients with higher levels of 25(OH)D or better kidney function. However, unlike the previously mentioned studies, we did not measure gene transcription and TRPC6 mRNA in kidney tissue, since it would be unethical to biopsy these patients.

Low serum 25(OH)D and 1,25(OH) $_2$ D $_3$  are usually associated with higher rates of albuminuria in CKD patients [29]. These findings were not replicated in the present sample, perhaps because these patients already have more extensive kidney scars and residual proteinuria. Liu et al [30] evaluated the effects of three months of calcitriol therapy in patients with IgA nephropathy, while de Zeeuw et al [11] evaluated the effects of paricalcitol in type 2 diabetes individuals in the VITAL study. These studies reported sustained post-treatment reductions in proteinuria and albuminuria, respectively, without an increase in adverse events such as hypercalcemia. Agarwal et al [31] performed a randomized placebo-controlled trial of paricalcitol in patients with stages 3 or 4 CKD and secondary hyperparathyroidism. The authors reported a

significant reduction in proteinuria, even after adjusting for several covariates such as diabetes mellitus and use of angiotensin blockers. Allborzi et al. [10] identified similar effects of paricalcitol in the albuminuria of patients with stages 2 or 3 CKD, regardless of its effects on parathyroid hormone suppression. These data were confirmed in a recent systematic review which found that calcitriol and paricalcitol reduced proteinuria by 16% in patients with CKD, while controls showed a 6% increase [32].

The protective effects of vitamin D on the loss of glomerular filtration rate and the progression of kidney disease are yet to be demonstrated in clinical trials. de Boer et al [5] evaluated 1705 elderly subjects with predominantly normal kidney function, and found that a 10 ng/mL reduction in the serum concentration of 25(OH)D increased the risk of rapid GFR loss by 25%. In the present study, eGFR decreased significantly by a mean of 4 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> following six months of cholecalciferol treatment. These findings are in agreement with those of Liu et al [30], who reported an increase in serum creatinine and a decrease in eGFR in calcitriol-treated patients. However, the effects of vitamin D on the creatinine metabolism of patients with CKD must also be considered. Vitamin D is known to increase creatinine generation leading to higher serum creatinine levels, with no effects on GFR [33,34]. Clinical trials in early stage of CKD are still required to determine the long-term renoprotective effects of vitamin D on renal function and patient morbi-mortality.

It is possible that a higher threshold for 25(OH)D serum levels or a longer supplementation period may be required to restore gene transcription and the expression of podocyte proteins in the glomerulus. In addition, cholecalciferol replacement may not be more effective to reduce proteinuria in the advanced CKD. Otherwise, the degree of podocyte injury in more advanced CKD, which is associated with a higher percentage of

glomerular sclerosis, may result in irreversible podocyte damage and cell death through apoptotic or nonapoptotic mechanisms.

An important limitation of the present study was its small sample size, which precludes any conclusions regarding the actual effects of cholecalciferol on podocyturia and proteinuria. However, the method used to detect podocyte injury in the present sample, that is, quantification of podocyte-associated mRNAs in urine, offers an accurate and non-invasive, albeit indirect, measure of podocyturia, with none of the risks associated with invasive methods such as renal biopsy. The effects of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  are more likely to be influenced by the serum concentration of  $25(\text{OH})\text{D}$  after the supplementation (which may need to reach a certain cutoff before any effects are seen), a longer duration of treatment, and/or the beginning of vitamin D at earlier stages of CKD, rather than the baseline  $25(\text{OH})\text{D}$  levels itself. In addition, the use of active forms of vitamin D or analogous such as calcitriol or paricalcitol, instead of its substrate cholecalciferol, may be needed to maximize the direct activation of the VDR in podocyte cells leading to biologic response. We can also consider that cholecalciferol is not properly converted to active calcitriol in more advanced stages of CKD. This lower conversion of native vitamin D to calcitriol can be related to inhibition of 1-alpha-hydroxylase in the kidney due to higher levels of fibroblast growth factor 23 via activation of the ERK1/2 signaling pathway [35] besides the loss of functional renal mass.

In conclusion, the present study suggests that six months of cholecalciferol supplementation had no effect on podocyturia, proteinuria or the kidney function in patients with stages 2 to 4 CKD. However, patients with higher  $25(\text{OH})\text{D}$  levels showed a trend of reduction of nephrin and podocin mRNAs following treatment. Further

studies are needed to evaluate the protective effects of vitamin D3 or its analogues on podocytes, perhaps at earlier stages of CKD and with longer follow-up.

#### Acknowledgements

We thank the Research Support Fund of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) for the financial support, the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the Master's scholarship awarded to João Rodolfo Teló Timm, and the Laboratory of Molecular Biology Applied to Nephrology for the technical support.

#### References

1. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2005; **45**: 1026-33.
2. Diniz HF, Romão MF, Elias RM, Romão Júnior JE. Vitamin D deficiency and insufficiency in patients with chronic kidney disease. *J Bras Nefrol.* 2012; **34**: 58-63.
3. Pilz S, Iodice S, Zittermann A, Grant WB, Gandini S. Vitamin D status and mortality risk in CKD: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Kidney Dis.* 2011; **58**: 374-82.
4. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzekk JD, Weiss NS. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Am J Kidney Dis.* 2007; **50**: 69-77.
5. de Boer IH, Katz R, Chonchol M et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and change in estimated glomerular filtration rate. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; **6**: 2141-49.

6. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007; **18**: 1796-806.
7. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; **286**: 526-33.
8. Lydia A, Asanuma K, Nonaka K et al. Effects of 22-oxa-calcitriol on podocyte injury in adriamycin-induced nephrosis. *Am J Nephrol*. 2012; **35**: 56-68.
9. Deb DK, Wang Y, Zhang Z et al. Molecular Mechanism Underlying 1,25-Dihydroxyvitamin D Regulation of Nephtrin Gene Expression. *J Biol Chem*. 2011; **286**: 32011-17.
10. Alborzi P, Patel NA, Peterson C et al. Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension*. 2008; **52**: 249-55.
11. de Zeeuw D, Agarwal R, Amdahl M et al. Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomized controlled trial. *Lancet*. 2010; **376**: 1543-51.
12. Zheng Z, Shi H, Jia J, Li D, Lin S. Vitamin D supplementation and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of 20 observational studies. *BMC Nephrol*. 2013; **25**:14:199. doi: 10.1186/1471-2369-14-199.
13. Kim CS, Kim SW. Vitamin D and chronic kidney disease. *Korean J Intern Med*. 2014; **29**: 416-27.
14. Wang Y, Zhou J, Minto AW et al. Altered vitamin D metabolism in type II diabetic mouse glomeruli may provide protection from diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2006; **70**: 882-91.

15. Wang Y, Deb DK, Zhang Z et al. Vitamin D Receptor Signaling in Podocytes Protects Against Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012; **23**: 1977-86.
16. Zhang Z, Sun L, Wang Y et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2008; **73**: 163-71.
17. Yu D, Petermann A, Kunter A, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary Podocyte Loss Is a More Specific Marker of Ongoing Damage than Proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2005; **16**: 1733-41.
18. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009; **150**: 604-12.
19. National Kidney Foundation K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2003; **42** (suppl 3): S1-S201.
20. Rodrigues PG, Bringhenti RN, do Nascimento JF et al. Expression patterns of podocyte-associated mRNAs in patients with proliferative or non-proliferative glomerulopathies. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; **7**: 2185-98.
21. Nagpal S, NA S, Rathnachalam R. Non calcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev*. 2005; **26**: 662-87.
22. Molina P, Górriz JL, Molina MD et al. The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; **29**: 97-109.
23. Li YC. Podocytes as Target of Vitamin D. *Curr Diabetes Rev*. 2011; **7**: 35-40.
24. Wang Y, Borchet ML, DeLuca H. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int*. 2012; **81**: 993-1001.

25. Sonneveld R, Ferrè S, Hoenderop JG et al. Vitamin D down-regulates TRPC6 expression in podocyte injury and proteinuric glomerular disease. *Am J Pathol.* 2013; **182**: 1196-1204.
26. Xiao H, Shi W, Liu S et al. Podocyte Injury is Suppressed by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> via Modulation of Transforming Growth Factor- $\beta$ <sub>1</sub>/Bone Morphogenetic Protein-7 Signalling in Puromycin Aminonucleoside Nephropathy Rats. *Clin Exp Pharamcol Physiol.* 2009; **36**: 682-89.
27. Zou M, Yu J, Nie G, He W-S, Li M, Xu H. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> decreases Adriamycin-induced podocyte apoptosis and loss. *Int J Med Sci.* 2010; **7**: 290-99.
28. Zhang X, Song Z, Guo Y, Zhou M. The novel role of TRPC6 in vitamin D ameliorating podocyte injury in STZ-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2015; **399(1-2)**: 155-65.
29. Isakova T, Gutiérrez OM, Patel NM, Andress DL, Wolf M, Levin A. Vitamin D Deficiency, Inflammation, and Albuminuria in Chronic Kidney Disease: Complex Interactions. *J Ren Nutr.* 2011; **21**: 295-302.
30. Liu LJ, Lv JC, Shi SF, Chen YQ, Zhang H, Wang HY. Oral calcitriol for reduction of proteinuria in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis.* 2012; **59**: 67-74.
31. Agarwal R, Tian J, Hippensteel RL et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005; **68**: 2823-28.
32. de Borst MH, Hajhosseiny R, Tamez H, Wenger J, Thadhani R, Goldsminth DJ. Active vitamin D treatment for reduction of residual proteinuria: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2013; **24**: 1863-71.

33. Agarwal R, Hynson JE, Hecht TJ, Light RP, Sinha AD. Short-term vitamin D receptor activation increases serum creatinine due to increased production with no effect on the glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2011; **80**: 1073-79.
34. Bertoli M, Luisetto G, Ruffatti A, Urso M, Romagnoli G. Renal function during calcitriol therapy in chronic renal failure. *Clin Nephrol.* 1990; **33**: 98-102.
35. Perwad F, Zhang MY, Tenenhouse HS, Portale AA. Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase expression in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; **293**: 1577-83.



Table 1: Clinical and demographic characteristics of patients with chronic kidney disease.

|                          | N = 27               |
|--------------------------|----------------------|
| Age (years)              | 56 ± 13 <sup>†</sup> |
| Gender (female)          | 14 (52) <sup>‡</sup> |
| Ethnicity (Caucasian)    | 13 (48)              |
| BMI (kg/m <sup>2</sup> ) | 28.7 ± 5.4           |
| Etiology of CKD          |                      |
| Hypertension             | 4 (14)               |
| Diabetes                 | 4 (14)               |
| CGN                      | 10 (38)              |
| Other                    | 9 (34)               |
| CKD Stage                |                      |
| 2                        | 2 (7.4)              |
| 3                        | 10 (37)              |
| 4                        | 15 (55.6)            |
| Hypertension             | 26 (96.3)            |
| SBP (mmHg)               | 140 ± 21             |
| DBP (mmHg)               | 86 ± 10              |
| Use of ACE-I             | 15 (55.6)            |
| Use of ARA-2             | 14 (51.9)            |

BMI: Body Mass Index; CGN: Chronic glomerulonephritis; CKD: Chronic kidney disease; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; ACE-I:

Angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARA-2: angiotensin II receptor antagonist;

†mean±DP; ‡n(%).

Table 2: Laboratory evaluation of kidney function, proteinuria, mineral and bone metabolism before and after cholecalciferol supplementation.

|                                   | Baseline      | 6 months      | P     |
|-----------------------------------|---------------|---------------|-------|
| eGFR (mL/min/1.73m <sup>2</sup> ) | 32.74 ± 15.56 | 28.03 ± 16.30 | 0.010 |
| Pr/Cr (urine)                     | 2.53 ± 2.14   | 2.62 ± 2.51   | 0.855 |
| Serum calcium (mg/dL)             | 8.83 ± 0.60   | 8.98 ± 0.68   | 0.084 |
| Serum phosphorus (mg/dL)          | 3.70 ± 0.49   | 3.98 ± 0.74   | 0.204 |
| Intact PTH (pg/mL)                | 222 ± 162     | 286 ± 221     | 0.086 |
| Serum albumin (g/dl)              | 4.08 ± 0.30   | 4.10 ± 0.22   | 0.011 |
| 25(OH)D (ng/mL)                   | 19 ± 7        | 28 ± 11       | 0.003 |

eGFR: estimated glomerular filtration rate; Pr/Cr: protein/creatinine index in random urine sample; PTH: parathyroid hormone.

Table 3: Urinary podocyte-associated mRNAs expression after cholecalciferol supplementation in chronic kidney disease patients.

| mRNA        | Baseline                     | 6 months        | P     |
|-------------|------------------------------|-----------------|-------|
| Nephrin     | 3.24(2.30–4.46) <sup>†</sup> | 2.71(1.86–3.43) | 0.349 |
| Podocin     | 3.10(2.25-4.53)              | 2.60(1.79-3.89) | 0.400 |
| Podocalyxin | 2.72(1.75-3.74)              | 2.79(1.97-4.18) | 0.109 |
| TRPC6       | 2.82(1.93-3.97)              | 2.53(1.52-5.46) | 0.665 |
| VEGF-A      | 2.85(1.82-3.86)              | 2.41(1.52-3.83) | 0.239 |
| TGF-β1      | 3.16(2.26-3.67)              | 3.05(2.32-3.94) | 0.923 |

TRPC6: *Transient receptor potential cation channel 6*; TGF-β1: transforming growth factor beta; VEGF-A: vascular endothelial growth factor; <sup>†</sup>Median and percentiles (P25-P75) of log<sub>10</sub> mRNA ( $2^{-\Delta\Delta t_c}$ )

Figure 1: Expression of podocyte-associated mRNAs according to final 25(OH)D serum levels.

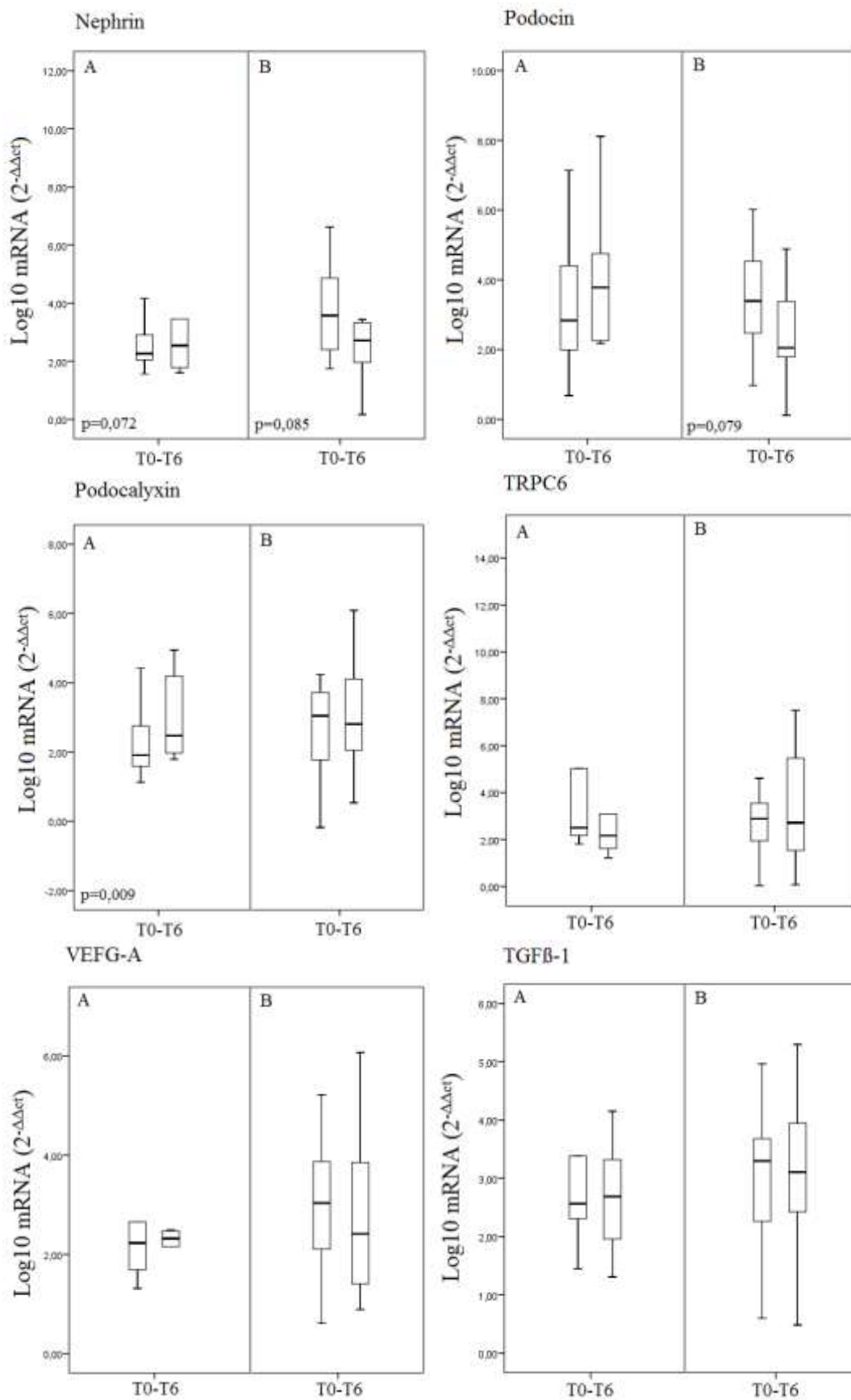


Figure 2: Expression of podocyte-associated mRNAs according to final glomerular filtration rate.

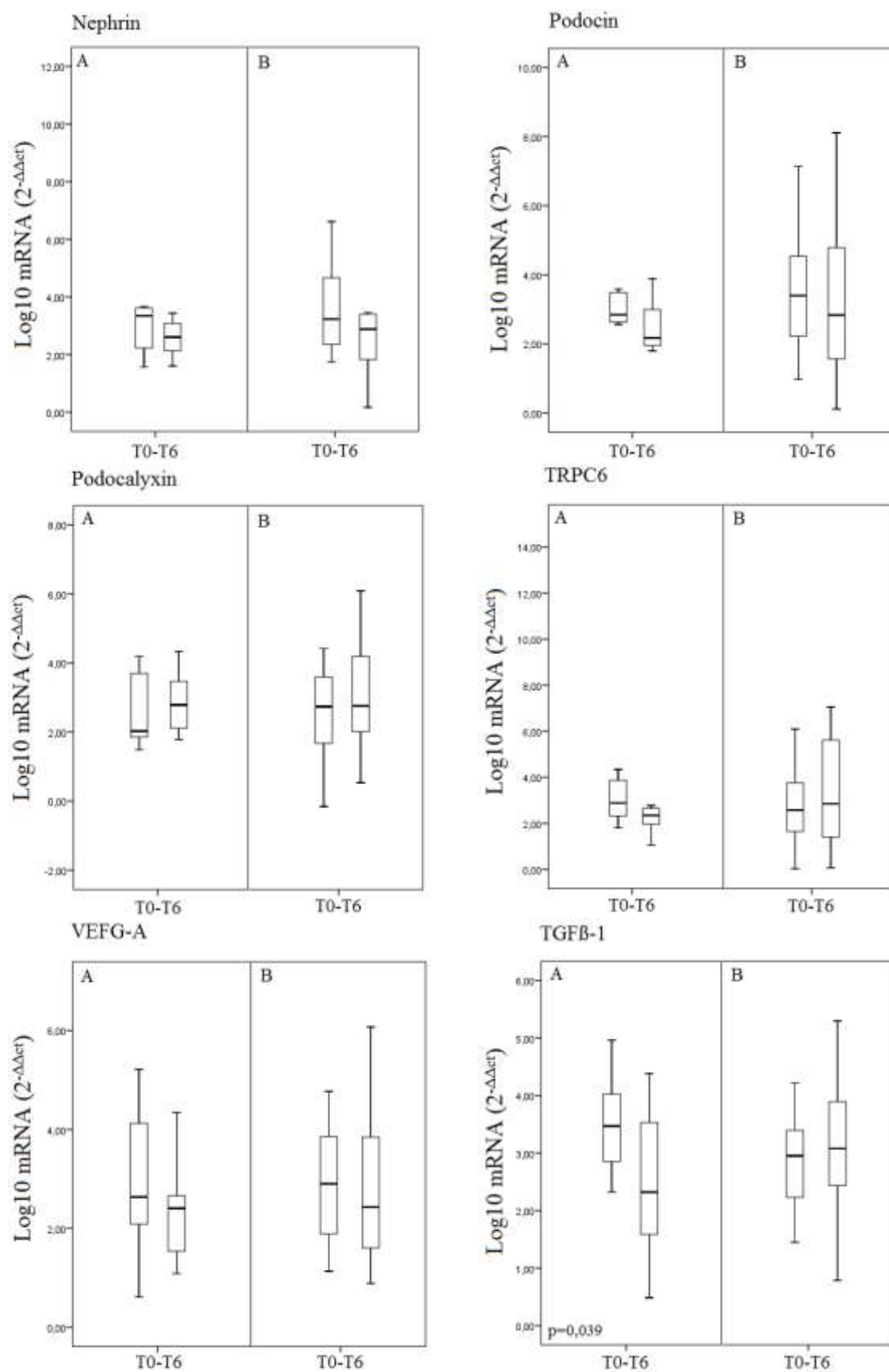


Figure legends:

Figure 1. Effects of vitamin D3 supplementation on urinary podocyte-associated mRNAs expression according to serum 25(OH)D at the end of treatment. Panel A. 25(OH)D <20ng/ml; Panel B. 25(OH)D  $\geq$ 20ng/ml. Urine mRNA of podocalyxin increased significantly in patients with serum vitamin D <20 ng/ml (p=0.009). The remaining comparisons did not reach statistical significance (p>0.05).

Figure 2. Effects of vitamin D3 supplementation on urinary podocyte-associated mRNAs expression according to estimated glomerular filtration rate (eGFR) at the end of follow up. Panel A. eGFR 30-89 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>; Panel B. eGFR 15-29 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Patients with an eGFR  $\geq$ 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> showed a significant reduction in TGF $\beta$ <sub>1</sub> mRNA expression (p=0.039). The remaining comparisons did not reach statistical significance (p>0.05).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença renal crônica (DRC) é um problema de grande relevância clínico-epidemiológica, e hoje é reconhecida como uma doença complexa que exige múltiplas abordagens no seu manejo. Fatores prognósticos são a albuminúria crescente e a perda progressiva de função renal, que levam a DRC terminal e necessidade de diálise ou transplante. Apesar de diversas intervenções de nefroproteção terem sido intensamente estudadas, a progressão da doença ainda é inexorável para o estágio de falência renal. Recentemente, tem sido constatada a elevada prevalência de níveis de vitamina D deficientes ou insuficientes em pacientes com DRC, em associação com o desenvolvimento de albuminúria e maior mortalidade. Concomitantemente, já é reconhecido que o podócito glomerular, célula especializada que mantém a barreira de filtro nos capilares glomerulares, é um alvo importante da ação da vitamina D ativa como a 1,25(OH)D<sub>3</sub>. Os efeitos do calcitriol, entre outros análogos da vitamina D, resulta na proteção da integridade do podócito, diminuindo os níveis de albuminúria e proteinúria, e ainda com potencial de retardar a progressão da doença renal e talvez reduzir mortalidade, embora estes efeitos ainda não tenham comprovação em ensaios clínicos até o momento.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de vitamina D<sub>3</sub> sobre a expressão dos RNA mensageiro das proteínas dos diferentes microdomínios do podócito, mensurados na urina de pacientes com doença renal crônica e hipovitaminose D pré e pós tratamento. Até o momento, nenhum estudo clínico foi publicado com este delineamento, usando uma ferramenta não invasiva em pacientes renais crônicos estáveis de diferentes etiologias. A hipótese foi que o colecalciferol reduz a podocitúria por atenuar a injúria glomerular, diminuindo o



descolamento destas células da membrana basal glomerular e conseqüentemente a excreção urinária dos fragmentos de células lesadas.

Como resultados principais deste estudo, verificamos que a reposição de vitamina D3 durante o período de seis meses não teve o efeito esperado de reduzir o log10 do RNAm de proteínas dos microdomínios do podócito e de fatores de crescimento, associados com dano endotelial e fibrose renal, apesar dos níveis séricos atingidos de 25(OH)D após a reposição serem considerados suficientes. Apesar de alguns dos RNAm associados ao podócito terem reduzido, essa diferença não atingiu significância estatística, o que deve estar relacionado ao pequeno número de pacientes estudados ou ao período curto de tratamento. Entretanto, observamos que pacientes que atingiram níveis de 25(OH)D  $\geq 20$  ng/ml aos seis meses (por definição suficientes) tiveram uma tendência de redução do RNAm de nefrina e de podocina; em contrário, no grupo que permaneceu com deficiência de 25(OH)D o RNAm da podocalixina aumentou significativamente e também houve tendência de aumento da nefrina e da podocina. De forma inesperada, a 25(OH)D sérica correlacionou-se positivamente com a proteinúria, e não houve correlação da 25(OH)D sérica com a função renal em seis meses de seguimento.

Concluimos que a reposição de vitamina D3 na forma de colecalciferol por seis meses não reduziu a podocitúria ou a proteinúria nestes pacientes com DRC, embora tenha-se observado uma redução marginal no RNAm urinário de nefrina e de podocina quando níveis suficientes de 25(OH)D foram atingidos. Consideramos que é necessário investigar se o uso mais precoce e/ou mais prolongado da vitamina D3 em um número consistente de pacientes renais crônicos se confirma como uma medida adicional de nefroproteção, retardando a evolução da doença e diminuindo desfechos adversos como falência renal e morbimortalidade.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr.(a) \_\_\_\_\_ a participar do estudo Associação dos Níveis Séricos de 25-hidroxivitamina D [25-(OH)D] com a Expressão Gênica de Proteínas Associadas ao Podócito em Pacientes com Doença Renal Crônica que tem o objetivo de avaliar se a vitamina D do sangue tem associação com células do rim chamadas podócitos, as quais impedem a passagem de proteínas do sangue para a urina. Essa perda de proteínas é comum em pessoas que tem doença nos rins, que é chamada de doença renal crônica, e que leva a perda de função dos rins. Outro objetivo da pesquisa é ver se o uso de comprimidos de vitamina D para aumentar os seus níveis no sangue pode melhorar a saúde dessas células dos rins (podócitos) e assim reduzir a perda de proteína na urina, melhorando a doença renal crônica.

Os procedimentos a que o (a) Sr. (a) serão submetidos são uma coleta de amostra de sangue e de urina. Estes materiais serão analisados no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Nefrologia no Centro Experimental de Pesquisa e no Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A coleta de urina em frasco não oferece nenhum risco. O risco relacionado à coleta de sangue de uma veia do braço é a possibilidade de ocorrer um pequeno hematoma (mancha roxa na pele) e dor no local da coleta.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para os(as) Sr.(as), mas a sua ajuda será muito importante para entender qual a importância da vitamina D para proteção das

células do rim. De modo que o voluntário fique seguro do acontecido, o mesmo recebera uma via do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinada pelo pesquisador responsável.

Para seu esclarecimento a qualquer momento ou em caso de necessidade o Sr. (a) poderá entrar em contato com os membros da equipe de pesquisa do Serviço de Nefrologia, pelo telefone (51-3359.8291) ou (51-3359.8121) procurando os pesquisadores responsáveis Francisco Veronese ou João Rodolfo Timm, e também em caso de dúvidas sobre os direitos e deveres dos participantes desta pesquisa, poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (51- 3359.7640).

Eu, \_\_\_\_\_

aceito participar do estudo e declaro que fui também informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre o presente estudo;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;
- Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;
- De que não terei despesas por participar do estudo.

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Ficha de coleta de dados

|   |  |                                     |      |
|---|--|-------------------------------------|------|
| Nome:   |  | Formulário N° _____                 |      |
| Protocolo n°:   |  | Registro HCPA:                      |      |
| Data de Nasc.:  |  | Data da coleta:                     |      |
| Sexo:<br><br>( ) Masc = 1<br><br>( ) Fem = 2  |  | Peso:                               | IMC: |
|   |  | Altura:                             |      |
| Cor de Pele: Branca ( ) Negra ( ) Parda ( ) Outra ( )                                   |  |                                     |      |
| Pressão Arterial 1:   |  | Possui Hipertensão: ( ) Sim ( ) Não |      |
| Pressão Arterial 2:   |  |                                     |      |
| Etiologia da Doença Renal Crônica:<br><br>HAS ( ) DM ( ) GNC ( ) Outros ( )<br><br>Obs: |  |                                     |      |
| Medicações Utilizadas:<br><br>Uso de IECA ( )<br><br>Uso de ARA2 ( )                    |  |                                     |      |
| Critérios de Inclusão:<br><br>Critérios de Exclusão:                                    |  |                                     |      |

## Dados Laboratoriais Bioquímicos, Imunológicos e Urinários

| Exames   | T 0 | T 3   | T 6   |
|--|-----|-------|-------|
| Glicose (mg/dL)  |     | _____ | _____ |
| Colesterol Total (mg/dL)   |     | _____ | _____ |
| Colesterol HDL (mg/dL)   |     | _____ | _____ |
| Colesterol LDL (mg/dL)   |     | _____ | _____ |
| Triglicerídeos (mg/dL)   |     | _____ | _____ |
| Albumina (g/dL)  |     | _____ |       |
| Paratormônio intacto (pg/mL)   |     | _____ |       |
| Vitamina D2 25(OH)D (ng/mL)  |     | _____ |       |
| Creatinina (mg/dL)   |     |       |       |
| Proteína total/creatinina em amostra na urina (IPC)                          |     |       |       |
| CKD-EPI (Taxa de filtração glomerular estimada)(mL/min/1,73 m <sup>2</sup> ) |     |       |       |
| Cálcio (mg/dL)   |     |       |       |
| Fósforo (mg/dL)  |     |       |       |

## Datos Moleculares

| Gene/RNA urina | Log RNAm (T 0) | Log RNAm (T 6) |
|----------------|----------------|----------------|
| Nefrina        |                |                |
| Podocina       |                |                |
| Podocalixina   |                |                |
| TRPC6          |                |                |
| VEGF-A         |                |                |
| TGF $\beta$ -1 |                |                |
| 18S            |                |                |