

## Efeito da suplementação de colecalciferol nos RNA mensageiros urinários associados ao podócito em pacientes com doença renal crônica

Effect of cholecalciferol supplementation on urine podocyte-associated messenger RNAs in patients with chronic kidney disease

### Autores

João Rodolfo Teló Timm<sup>1</sup>

Cristina Karohl<sup>1</sup>

Mariane dos Santos<sup>1</sup>

Maysa Lucena de Souza<sup>1</sup>

Rafael Zancan<sup>1</sup>

Rafael de Almeida<sup>2</sup>

Francisco Veríssimo Veronese<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas.

<sup>3</sup> Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data de submissão: 04/08/2015.

Data de aprovação: 26/10/2015.

### Correspondência para:

Francisco Veríssimo Veronese.  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.  
Rua Ramiro Barcelos, nº 2350,  
Porto Alegre, RS, Brazil.  
CEP: 90035-003  
E-mail: fveronese@hcpa.edu.br

DOI: 10.5935/0101-2800.20160026

### RESUMO

**Introdução:** A vitamina D reduz a albuminúria em pacientes com doença renal crônica (DRC), mas o seu efeito sobre os podócitos glomerulares ainda não é claro. **Objetivos:** Avaliar se a suplementação de colecalciferol reduz os RNAm urinários associados ao podócito em pacientes com DRC. **Métodos:** Vinte e sete pacientes com DRC estágios 2 a 4 e níveis sub-ótimos de 25-hidroxi-vitamina D [25(OH)D] sérica foram tratados com colecalciferol por seis meses. Foram medidos antes e após a intervenção a 25(OH)D sérica e o RNAm urinário da nefrina, podocina, podocalixina, receptor transitório potencial do canal de cátions, subfamília C, membro 6 (TRPC6), fator A de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A) e fator de crescimento transformador beta (TGF-β1). **Resultados:** A TFGe reduziu em média 4,71 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ( $p = 0,010$  vs. basal), sendo 28 ± 16 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> aos seis meses. Os RNAm dos produtos do podócito na urina não tiveram alteração significativa após o tratamento. Entretanto, pacientes que atingiram níveis de 25(OH)D ≥ 20 ng/mL aos 6 meses tiveram tendência de redução do RNAm da nefrina e da podocina na urina; nos pacientes em que a 25(OH)D permaneceu < 20 ng/mL houve aumento significativo da podocalixina, e tendência de maior expressão do RNAm da nefrina e da podocina. **Conclusão:** A reposição de colecalciferol por seis meses não teve efeito sobre os RNAm associados ao podócito nestes pacientes com DRC avançada. O efeito protetor da vitamina D ou seus análogos sobre o podócito glomerular deve ser investigado em estágios mais precoces da DRC e com maior tempo de tratamento.

**Palavras-chave:** fator A de crescimento do endotélio vascular; fator de crescimento transformador beta1; insuficiência renal crônica; podócitos; vitamina D.

### ABSTRACT

**Introduction:** Vitamin D reduces albuminuria in patients with chronic kidney disease (CKD) but its effects on glomerular podocytes are not entirely understood. **Objective:** To evaluate if cholecalciferol supplementation reduces the levels of podocyte-associated urine mRNAs in patients with CKD. **Methods:** A total of 27 patients with stages 2 to 4 CKD and suboptimal serum vitamin D [25(OH)D] levels were treated with cholecalciferol for 6 months. Serum 25(OH)D level, estimated glomerular filtration rate (eGFR), proteinuria, and urine mRNA of nephrin, podocin, podocalyxin, transient receptor potential cation channel 6, vascular endothelial growth factor A, and transforming growth factor beta were assessed before and after intervention. **Results:** eGFR declined at an average rate of -4.71 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> ( $p = 0.010$  vs. baseline), being 28 ± 16 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> at 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 25(OH)D level > 20 ng/mL at six months showed a trend of reduction of urinary nephrin and podocin mRNA levels; in patients with 25(OH)D that remained < 20 ng/mL there was a significant increase in urinary podocalyxin, and a trend of higher expression of urinary nephrin and podocin mRNA. **Conclusion:** Six months of cholecalciferol supplementation had no effect on urine podocyte-associated mRNA profile of patients with advanced CKD. The protective effect of vitamin D or its analogues on the glomerular podocyte should be investigated in early stages of CKD with a longer treatment period.

**Keywords:** podocytes, renal insufficiency, chronic; transforming growth factor beta1; vascular endothelial growth factor A; vitamin D.

## INTRODUÇÃO

O nível de vitamina D no soro, abaixo do ideal, é um achado comum em pacientes com doença renal crônica (DRC)<sup>1,2</sup> Vários estudos observacionais têm demonstrado uma associação entre a deficiência de vitamina D e aumento da albuminúria, menor taxa de filtração glomerular (TFG) e maior risco de mortalidade.<sup>3-5</sup> Estudos experimentais e clínicos sugeriram que a ativação do receptor de vitamina D (VDR) pode reduzir a albuminúria, hiperfiltração glomerular, perda de podócitos, glomerulosclerose, fibrose intersticial, e até mesmo mortalidade cardiovascular e mortalidade por todas as causas.<sup>6-12</sup> Portanto, a vitamina D poderia ter efeitos antiproteínúricos e renoprotetores e, possivelmente, através de diferentes mecanismos, incluindo vias anti-fibróticas, anti-inflamatórias e anti-apoptóticas.<sup>13</sup>

A vitamina D ativa e seus análogos conseguem reduzir a albuminúria através da proteção de podócitos.<sup>7,8</sup> Estudos experimentais demonstraram que vitamina D1- $\alpha$ -hidroxilase e VDR são expressos em podócitos, sugerindo que estas células são capazes de sintetizar a vitamina D ativa, a 1,25-di-hidroxitamina D, que pode atuar por vias de sinalização parácrina e/ou autócrina.<sup>14</sup> A 1,25-di-hidroxitamina D interage intracelularmente com o VDR, e este complexo é translocado para o núcleo e liga-se a elementos de resposta à vitamina D, estimulando a transcrição de proteínas associadas à fenda diafragmática, tais como a nefrina e a podocina.<sup>9,15</sup>

Em camundongos diabéticos, sem VDR, há maior expressão de fibronectina renal e fatores pró-fibróticos, e menos nefrina expressos em comparação com os ratos diabéticos de tipo selvagem, enquanto que a administração de vitamina D em podócitos em cultura aumentou a expressão de nefrina.<sup>16</sup> Além disso, a vitamina D atenuou os danos podocitários, reduzindo o índice de fusão podocitária, a apoptose e a perda na urina em modelos experimentais de diabetes<sup>15</sup> e nefrose induzida por adriamicina.<sup>8</sup>

O desprendimento podocitário em células viáveis ou apoptóticas, leva à perda de podócitos na urina e, finalmente, proteinúria. A podocitúria pode ser quantificada medindo-se os subprodutos dos podócitos ou seus fragmentos na urina. Embora esta ferramenta não-invasiva de diagnóstico não seja ainda utilizada na prática clínica, tem sido sugerido que a podocitúria seja mais precisa do que a proteinúria na detecção de danos na filtração glomerular, a atividade da doença e sua progressão.<sup>17</sup> Até hoje, não existem estudos clínicos que tenham avaliado o efeito da suplementação de colecalciferol como uma estratégia de proteção para

minimizar a lesão podocitária em pacientes com DRC estabelecida de diferentes etiologias, que apresentam níveis séricos de 25(OH)D abaixo do ideal. Portanto, temos a hipótese de que a suplementação de colecalciferol possa reduzir a excreção urinária de mRNA associados a podócito nesta população de pacientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo prospectivo intervencionista, aberto, de um único centro recrutou 27 pacientes adultos com DRC de agosto de 2013 a maio de 2014. Os critérios de inclusão foram: idade  $\geq$  18 anos, TFG estimada (eTFG) entre 15 e 89 mL/min/1,73m<sup>2</sup> medido de acordo com a equação da Colaboração Epidemiológica da Doença Renal Crônica (DRC-EPI),<sup>18</sup> função renal estável nos três meses anteriores, coeficiente de proteína para creatinina (Pr/Cr) numa amostra de urina aleatória superior a 0,5, e uma concentração sérica de 25(OH)D  $<$  30 ng/ml. Os critérios de exclusão foram doença aguda intercorrente, tratamento atual com imunossuppressores ou outras preparações com vitamina D, incluindo calcitriol ou análogos, gravidez, positividade para HIV, anticorpos para hepatite B ou da hepatite C e transplante renal.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e realizado de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975. Todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito antes da inscrição. O Comitê de Ética em Pesquisa está registrado no Comitê Brasileiro de Proteção de Humanos em Pesquisas do Ministério da Saúde sob o número 00000921 do Conselho Institucional de Revisão.

## INTERVENÇÃO

Todos os pacientes receberam colecalciferol oral, durante 6 meses nas doses recomendadas nas diretrizes da Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K-DOQI).<sup>19</sup> O tratamento foi prescrito como se segue: a) 25(OH)D  $<$  5 ng/mL: 50.000 IU por semana durante 12 semanas, seguido de 10.000 IU por semana; b) 25(OH)D entre 5 e 15 ng/ml: 50,000 IU por semana durante 4 semanas, seguido de 10.000 IU por semana; c) 25(OH)D, entre 16 a 30 ng/ml: 10,000 IU por semana.

Os níveis séricos de cálcio e fósforo foram reavaliados no terceiro mês de suplementação de colecalciferol. Caso o cálcio sérico estivesse acima dos limites normais superiores, a suplementação de colecalciferol seria retirada. Se os níveis de fósforo estivessem acima dos valores de referência, um aglutinante de fosfato seria administrado, ou a dose seria ajustada (500 a 1000 mg de carbonato de cálcio por via oral às refeições).

#### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PARÂMETROS LABORATORIAIS

Os seguintes dados clínicos foram coletados de cada participante: idade, gênero, raça, pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD), índice de massa corporal (IMC) calculado pelo peso e altura ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), etiologia da DRC, e medicamentos atuais. Os exames laboratoriais foram realizados no início e aos 3 e 6 meses de acompanhamento. As seguintes variáveis foram avaliadas no início do estudo: glicemia, creatinina, cálcio, fósforo, colesterol total, colesterol HDL e triglicérides (espectrofotométricas, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suíça), colesterol LDL (fórmula de Friedewald), albumina, hormônio intacto da paratireóide medido pela quimiluminescência (Sede global da Siemens, Muenchen, Alemanha). Creatinina sérica e na urina foram medidas utilizando a reação de Jaffe (Modular P Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha). A eTFG foi calculada usando-se a fórmula DRC-EPI, e a proteinúria foi quantificada usando-se o coeficiente Pr/Cr. Os níveis séricos de 25(OH)D foram avaliados usando-se o imunoenensaio DiaSorin 25OH para vitamina D em um auto-analisador LIAISON™ (DiaSorin Inc, Northwest, MN, EUA). Os níveis de cálcio e fósforo foram reavaliados em 3 meses; e do paratormônio sérico intacto, cálcio, fósforo, 25(OH)D, e os níveis séricos e urinários de Pr/Cr foram reavaliados aos 6 meses.

#### NÍVEIS DE mRNA ASSOCIADO AO PODÓCITO

A expressão de mRNA associado a podócitos nas células sedimentares urinárias de uma amostra de urina matinal (fluxo total) foi determinada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), como anteriormente descrito.<sup>20</sup> As amostras foram triadas para os seguintes transcritos de RNAm: nefrina, podocina, podocalixina, receptor transiente potencial canal de cátion 6 (TPC6), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-a) como um marcador de proliferação endotelial, e fator de transformação de crescimento beta ( $\text{TGF-}\beta_1$ ) como um marcador de fibrose intra-renal. Os níveis de RNA mensageiro foram medidos no início do estudo e após seis meses de suplementação com colecalciferol.

Em resumo, o RNAm foi extraído utilizando o Mini Kit QIAmp™ RNA (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, EUA), segundo as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando um Espectrofotômetro NanoDrop™ 1000 v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA) e a pureza do RNA foi determinada pela razão de absorvância a 260 e 280 nm. O RNA foi transcrito de forma reversa utilizando o Kit de DNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA),

de acordo com as instruções do fabricante, até obter um volume de 20  $\mu\text{L}$ . Executamos uma RT-PCR usando um Master Mix Taqman Universal PCR, contendo AmpliTaq Gold™ DNA polimerase, Amperase UNG, (ROX) referência passiva, solução tampão e dNTP (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), além dos primers específicos para a amplificação dos seguintes genes: NPSH1, nefrina (ID: Hs00190446\_m1); NPSH2, podocina (ID: Hs00387817\_m1); podocalixina (ID: Hs01574644\_m1); TRPC6 (ID: Hs00989190\_m1); VEGF-A (ID: Hs00173626\_m1) e  $\text{TGF-}\beta_1$  (ID: Hs00998133\_m1), de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O rRNA 18s (Taqman™ PDAR) foi usado como controle endógeno. A RT-PCR foi realizada em duplicidade em placas de 96 poços contendo 2 mL de cDNA.

As reações foram repetidas a 50°C durante 2 minutos, 60°C durante 30 minutos, seguido de desnaturação a 95°C durante 5 minutos, e 40 ciclos a 94°C durante 20 segundos e 62°C durante 60 segundos. A amplificação foi realizada num ABI Prism 7000 SDS termociclador (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi realizada usando o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$  em que o valor de CT (ciclo limite) é definido como o ponto em que se verificou um aumento estatisticamente significativo na fluorescência.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram descritas em termos de média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil, enquanto as variáveis categóricas foram expressas em proporções. A normalidade de distribuição foi determinada utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. Os valores de RNA mensageiro foram transformados em logaritmos, em conformidade com os pressupostos de normalidade. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste-*t* independente, ou pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal Wallis. Os resultados pré e pós-tratamento foram comparados usando testes-*t* pareados ou teste ranqueado de Wilcoxon. A associação entre mRNAs associados a podócito urinário, níveis séricos de 25(OH)D, eTFG e proteinúria foram avaliados utilizando coeficientes de correlação de Spearman.

A mudança na expressão do RNAm após seis meses de suplementação de colecalciferol foi analisada utilizando as Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) com um modelo gama-logarítmico e correção de Bonferroni para comparações múltiplas. As GEE foram utilizadas para avaliar diferenças e mudanças entre os

grupos ao longo do tempo, além de interações de grupo-por-tempo. Os resultados foram expressos como média e intervalos de confiança (IC 95%). Os dados foram analisados usando o software SPSS para Windows (versão 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

As características demográficas e clínicas estão resumidos na Tabela 1. Dez pacientes (37%) apresentavam glomerulonefrite crônica, porque eles foram encaminhados do ambulatório de doenças glomerulares. Quinze pacientes (55,6%) apresentavam estágio 4 de DRC, enquanto o restante tinha uma eTFG  $\geq 30$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Aproximadamente metade dos pacientes estavam utilizando inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) ou antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARA-2). Todos os pacientes apresentaram nível sérico abaixo do ideal para 25(OH)D ( $< 30$  ng/ml). Depois de seis meses de suplementação de colecalciferol por via oral, os níveis séricos de 25(OH)D aumentaram em 90,4% em pacientes com valores iniciais de 25(OH)D  $< 20$  ng/ml ( $p < 0,001$ ), e um aumento menor, mas significativo de 66% nos níveis séricos de 25(OH)D também foi observado em pacientes com valores basais de 25(OH)D  $\geq 20$  ng/ml ( $p = 0,005$ ); esses aumentos refletem a eficácia do tratamento prescrito.

A eTFG diminuiu significativamente durante o período de acompanhamento ( $-4,71$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>,  $p < 0,010$  vs. valores basais). Os pacientes com uma eTFG entre 15-29 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> mostraram níveis séricos de 25(OH)D de  $19,7 \pm 6,0$  e  $28,9 \pm 9,9$  ng/mL no início do estudo e após 6 meses, respectivamente ( $p < 0,001$ ). Em pacientes com taxa de filtração glomerular  $\geq 30$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, os valores correspondentes foram de  $18,2 \pm 7,2$  e  $26,7 \pm 13,4$  ng/ml ( $p = 0,042$ ). O valor urinário de Pr/Cr não se alterou após seis meses de suplementação de colecalciferol, como mostrado na Tabela 2.

Os parâmetros metabolismos ósseo e mineral (cálcio, fósforo e paratormônio intacto) não diferiram entre os valores basais e aqueles aos seis meses de acompanhamento. No entanto, encontramos uma tendência para níveis crescentes em ambos, paratormônio ( $p = 0,086$ ) e cálcio sérico ( $p = 0,084$ ).

### EXPRESSÃO DE mRNAs ASSOCIADO AO PODÓCITO APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM COLECALCIFEROL

A excreção urinária de mRNA associado a podócitos não se alterou de forma significativa entre os valores basais

e aqueles do pós-tratamento (Tabela 3). Para avaliar o efeito de se alcançar níveis séricos mais elevados de 25(OH)D em comparação com os níveis mais baixos sobre a expressão urinária de mRNAs associados a podócitos, a amostra foi classificada de acordo com os níveis de 25(OH)D ( $< 20$  ng/mL ou  $\geq 20$  ng/mL). Além disso, os pacientes foram classificados de acordo com o estágio da DRC: DRC estágio 4 (eTFG 15-29 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) ou DRC estágios 2-3 (eTFG  $\geq 30$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>) no final do seguimento para determinar se uma função renal melhor ou pior poderia explicar as diferenças na expressão de mRNA.

Ambos os grupos - com níveis superiores ou inferiores de 25(OH)D em 6 meses - mostrou uma variação não significativa na expressão de mRNA de proteínas podocitárias e fatores de crescimento. Do mesmo modo, a expressão de mRNA de proteínas podocitárias e fatores de crescimento não se alterou em pacientes com melhor função renal (eTFG  $\geq 30$  mL/min/1,73 m<sup>2</sup>).

Embora o valor de log<sub>10</sub> do mRNA de nefrina, podocina e podocalixina (mas não dos mRNA podocitários remanescentes) diminuiu desde o início até os 6 meses de acompanhamento, estes valores não diferiram entre os grupos ou mostraram interações grupo-por-tempo. Este foi o caso da nefrina, cujos níveis diminuíram de 4,48 (3,03-5,93) para 2,79 (1,46-4,12); (Valor de  $p = 0,08$ ) em pacientes com 25(OH)D  $\geq 20$  ng/mL, e aumentou de 3,12 (2,41-3,10) para 4,61 (2,83-6,40); (Valor  $p = 0,07$ ) em pacientes com níveis de 25(OH)D  $< 20$  ng/mL. O mRNA da podocina também diminuiu de 3,43 (2,54-4,32) para 2,50 (1,21-3,15), (valor  $p = 0,08$ ) em pacientes com níveis de 25(OH)D  $\geq 20$  ng/ml, mas não mostrou tendência inversa em pacientes com vitamina D  $< 20$  ng/ml. A expressão da podocalixina não se alterou em doentes com níveis mais elevados de 25(OH)D, mas aumentou significativamente no período de seguimento em pacientes com níveis séricos baixos de 25(OH)D: 2,71 (2,10-3,42) vs. 3,63 (2,64-4,52), ( $p = 0,009$ ).

Analisando a expressão de cada mRNA podocitário de acordo com o tercil de níveis séricos de 25(OH)D no início e após 6 meses de suplementação de colecalciferol, não foi observada correlação entre níveis mais altos de 25(OH)D e a menor expressão de mRNA de mRNA associados a podócito em qualquer tercil. Como mostrado nas Figuras 1 e 2, a variabilidade de cada um dos genes em ambos os períodos foi pequena ao longo da distribuição de tercils de 25(OH)D.



**TABELA 1** CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA

	N = 27
Idade (anos)	56 ± 13
Gênero (feminino)	14 (52)
Etnia (Caucasiano)	17 (63)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28,7 ± 5,4
Etiologia da DRC	
Hipertensão	7 (26)
Diabetes	5 (18,5)
Glomerulonefrite	10 (37)
Outros	5 (18,5)
Estágio da DRC	
2	2 (7,4)
3	10 (37)
4	15 (55,6)
Hipertensão	23 (85)
PAS (mmHg)	140 ± 21
PAD (mmHg)	86 ± 10
Uso de ACE-I	15 (55,5)
Uso de ARA-2	14 (51,8)

IMC: Índice de Massa Corporal; DRC: Doença Renal Crônica; PAS: Pressão Arterial Sistólica; PAD: Pressão Arterial Diastólica; ACE-I: Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensinogênio; ARA-2: Antagonista do receptor 2 de angiotensina. Valores expressos em termos de média ± DP ou número de pacientes (%).

**TABELA 2** AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA FUNÇÃO RENAL, PROTEINÚRIA, METABOLISMO ÓSSEO E MINERAL BASAIS E APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM COLECALCIFEROL

	Basal	6 meses	<i>p</i>
eTFG (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	32,74 ± 15,56	28,03 ± 16,30	0,010
Pr/Cr (urina)	2,53 ± 2,14	2,62 ± 2,51	0,855
Cálcio sérico (mg/dL)	8,83 ± 0,60	8,98 ± 0,68	0,084
Fósforo sérico (mg/dL)	3,70 ± 0,49	3,98 ± 0,74	0,204
PTH intacto (pg/mL)	222 ± 162	286 ± 221	0,086
Albumina sérica (g/dl)	4,08 ± 0,30	4,10 ± 0,22	0,101
25(OH)D (ng/mL)	19 ± 7	28 ± 11	0,003

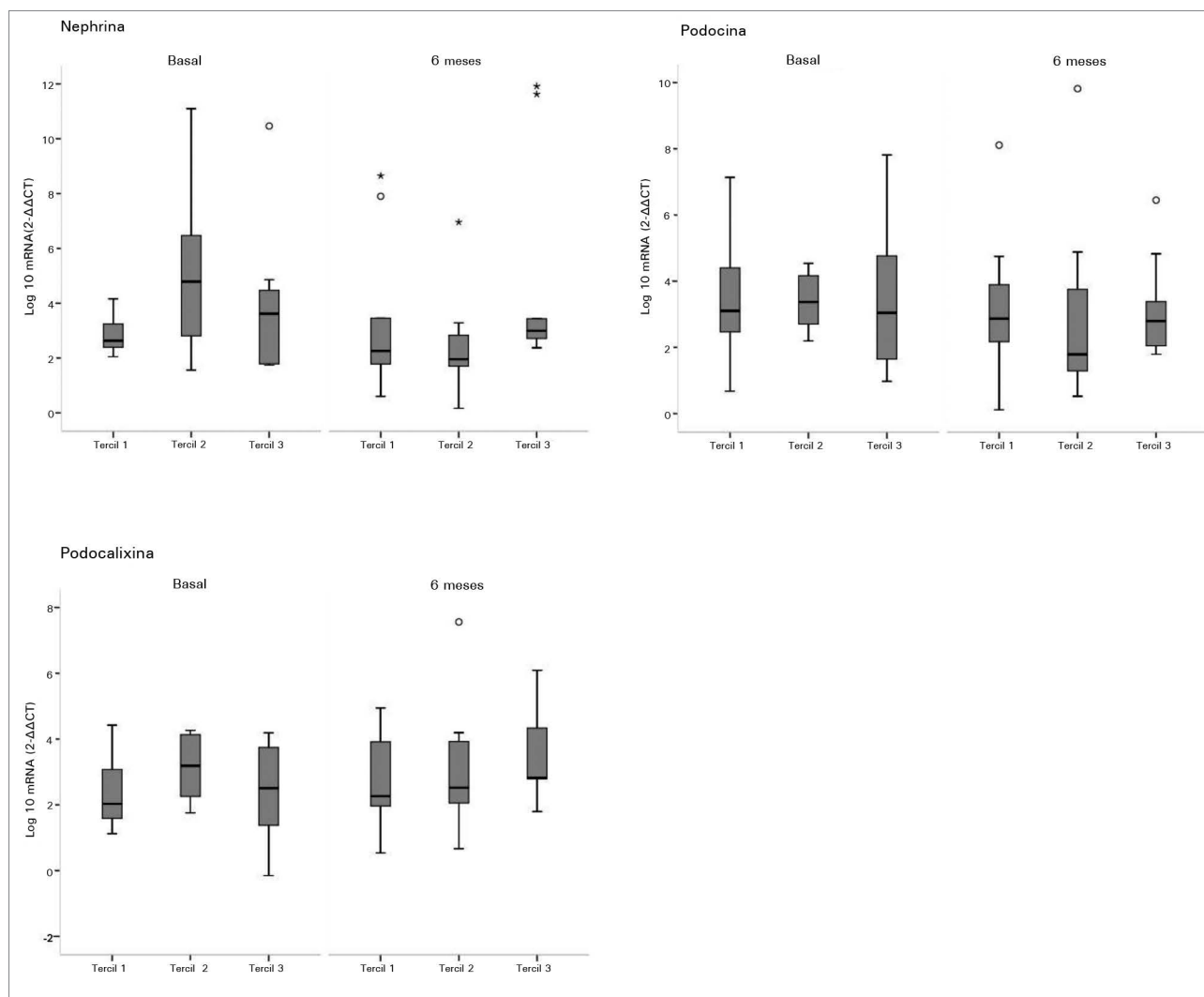
eTFG: taxa estimada de filtração glomerular; Pr/Cr: índice proteína/creatinina em amostra urinária aleatória; PTH: hormônio da paratireóide. Dados expressos na forma de média ± DP.

**TABELA 3** EXPRESSÃO BASAL DE MRNA URINÁRIO ASSOCIADO A PODÓCITOS E APÓS SUPLEMENTAÇÃO COM COLECALCIFEROL EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

mRNA	Basal	6 meses	<i>p</i>
Nefrina	3,24 (2,30-4,46) <sup>†</sup>	2,71 (1,86-3,43)	0,349
Podocina	3,10 (2,25-4,53)	2,60 (1,79-3,89)	0,400
Podocalixina	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: Receptor catiônico potencial transiente do canal 6; TGF-β1: Fator transformador de crescimento beta; VEGF-A: fator de crescimento vascular endotelial. <sup>†</sup>Mediana e percentis (P25-P75) de mRNA log10 (2-ΔΔct)

**Figura 1.** mRNA urinário de nefrina, podocina, e podocalixina segundo os tercís de 25(OH)D sérico - Efeitos da suplementação de colecalciferol no mRNA urinário de nefrina, podocina e podocalixina segundo os tercís de 25(OH)D sérico antes e após a intervenção. O tercíl 1 incluiu indivíduos com os níveis séricos mais baixos de 25(OH)D (< 23 ng/mL); o tercíl 2 incluiu indivíduos com níveis médio de 25(OH)D (23-30 ng/mL), e o tercíl 3 incluiu indivíduos com os níveis mais elevados de 25(OH)D (> 30 ng/mL). Os gráficos de caixas, barras cruzadas e barras horizontais representam os valores de mediana, mínimo e máximo de cada Log10 de mRNA urinário. Não houve correlação significativa entre os tercís de 25(OH)D e a expressão de mRNA de proteínas podocitárias (valor de  $p > 0,05$ ).



#### CORRELAÇÕES ENTRE MRNAs ASSOCIADOS A PODÓCITOS, 25(OH)D, PROTEINÚRIA E FUNÇÃO RENAL

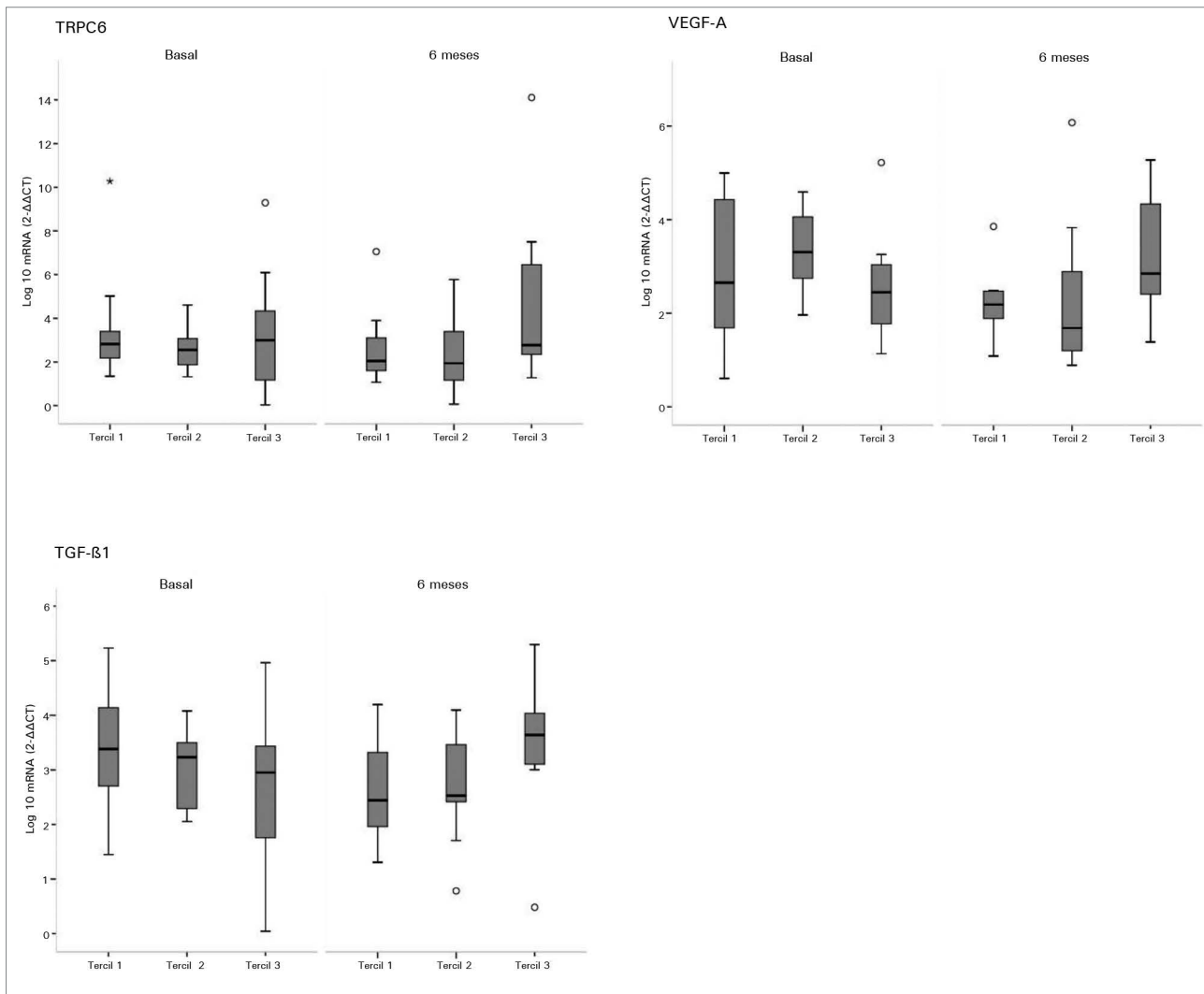
As correlações de Spearman não mostraram relação entre a expressão de mRNA associados a podócitos e níveis de 25(OH)D, seja no início ou aos 6 meses de seguimento. Da mesma forma, não foram observadas correlações entre a expressão de mRNA e eTFG ou proteinúria. Os níveis séricos de 25(OH)D foram positiva e significativamente correlacionados com a excreção urinária de proteínas, tanto no início do estudo ( $r = 0,517$ ,  $p = 0,008$ ) quanto aos seis meses de seguimento ( $r = 0,539$ ,  $p = 0,005$ ).

#### DISCUSSÃO

O presente estudo não encontrou melhora no perfil de mRNA de subprodutos associados a podócitos na urina após 6 meses de suplementação com colecalciferol. A proteinúria também não se alterou. No entanto, aqueles com mais elevados níveis séricos de 25(OH)D aos 6 meses ( $\geq 20$  ng/ml) exibiram uma tendência de diminuição nas expressões de nefrina e podocina, enquanto o padrão oposto foi observado em pacientes com níveis baixos de 25(OH)D.

Estudos recentes têm demonstrado que, além do seu papel no metabolismo de cálcio e fósforo, a

**Figura 2.** O mRNA urinário de TRPC6, VEGF-A, e TGF- $\beta$ 1 segundo os tercís séricos de 25(OH)D - Efeitos da suplementação de colecalciferol sobre o mRNA urinário de TRPC6, VEGF-A, e TGF- $\beta$ 1 segundo os tercís séricos de 25(OH)D antes e depois da intervenção. O tercíl 1 incluiu indivíduos com os mais baixos níveis séricos de 25(OH)D (< 23 ng/mL); o tercíl 2 incluiu indivíduos com níveis médios de 25(OH)D (23-30 ng/mL), e o tercíl 3 incluiu indivíduos com os níveis mais altos de 25(OH)D (> 30 ng/mL). Os gráficos de box caixas, barras cruzadas e barras horizontais representam os valores de mediana, mínimo e máximo de cada Log10 do mRNA urinário. Não houve correlação significativa entre os tercís de 25(OH)D e a expressão de proteínas podocitárias (valor de  $p > 0,05$ ).



vitamina D também participa da regulação das funções renal, cardiovascular e imunológicas.<sup>21</sup> Estudos clínicos e experimentais têm relatado que a vitamina D diminui a excreção de albumina urinária e retarda a progressão da doença renal.<sup>10,11,14-16,22</sup> A ativação do VDR pela 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ou seus análogos desencadeia várias vias de sinalização envolvidas na proteção podocitária, tais como a inibição do sistema renina-angiotensina, a atenuação da apoptose e fibrose renal, e o aumento na expressão gênica podocitária, preservando assim a estrutura e a função dos podócitos.<sup>7-9,14-16,23,24</sup>

Em modelos animais com nefropatia induzida, descobriu-se que a vitamina D reduz a quantidade de podocitopenia, podocitúria, hipertrofia podocitária e

apoptose, aumenta a expressão de nefrina, podocina, integrina  $\alpha_3\beta_1$  e distroglicana, e suprime a expressão de TGF- $\beta$ <sub>1</sub> e expressão de TRPC6.<sup>6,25-28</sup> Estes resultados sugerem que os efeitos combinados de vitamina D ou seus análogos sobre podócitos glomerulares podem ser críticos para a renoproteção, que têm um impacto significativo na redução da albuminúria e no dano renal crônico.

A TRPC6 é uma proteína da fenda diafragmática, cuja expressão aumenta como resultado de lesão podocitária em nefropatias proteinúricas. Inibidores da ECA aumentam a expressão de TRPC6, assim como o uso de calcitriol. Descobriu-se que 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é capaz de normalizar a expressão glomerular de TRPC6, restaurar a morfologia de podócitos e

reduzir a proteinúria em dois modelos experimentais de nefropatia induzida,<sup>25,28</sup> provavelmente devido aos seus efeitos sobre o promotor TRPC6. No presente estudo, embora a suplementação de colecalciferol tenha causado elevação sérica de 25(OH)D, a intervenção não teve efeito sobre a expressão de TRPC6 na urina, independentemente da 25(OH)D sérica ou níveis de uma melhor ou pior taxa de filtração glomerular. No entanto, ao contrário dos estudos citados anteriormente, nós não medimos a transcrição do gene e o mRNA da TRPC6 no tecido renal, uma vez que não seria ético fazer biópsia nesses pacientes.

Baixos níveis séricos de 25(OH)D e 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> são normalmente associados a taxas mais elevadas de albuminúria em pacientes com DRC.<sup>29</sup> Liu *et al.*<sup>30</sup> avaliaram os efeitos de três meses de tratamento com calcitriol em pacientes com nefropatia por IgA; enquanto Zeeuw *et al.*<sup>11</sup> avaliaram os efeitos de paricalcitol em indivíduos com diabetes do tipo 2 no estudo VITAL. Estes estudos relataram reduções sustentadas de proteinúria e albuminúria pós-tratamento, respectivamente, sem um aumento de eventos adversos, tais como hipercalcemia.

No entanto, ambos os fármacos podem estar associados a eventos adversos que não podem ser negligenciados, tais como hipercalcemia, hipercalcúria, e hipoparatiroidismo; no estudo VITAL, por exemplo, uma maior proporção de pacientes em uso de 2 mg de paricalcitol foi retirada do estudo devido a eventos adversos ( $p = 0,018$  *vs.* placebo).<sup>11</sup> Agarwal *et al.*<sup>31</sup> realizaram um ensaio randomizado controlado por placebo envolvendo paricalcitol em pacientes com DRC nos estágios 3 ou 4 e hiperparatiroidismo secundário. Os autores relataram uma redução significativa na proteinúria, mesmo após o ajuste para várias covariáveis, tais como *diabetes mellitus* e a utilização de bloqueadores da angiotensina. Alborzi *et al.*<sup>10</sup> identificaram efeitos semelhantes de paricalcitol sobre a albuminúria em pacientes com RC nos estágios 2 ou 3, independentemente de seus efeitos sobre a supressão do hormônio da paratiroides.

Estes dados foram confirmados em uma recente revisão sistemática, que constatou que o calcitriol e o paricalcitol reduziu a proteinúria em 16% nos pacientes com DRC, enquanto os controles mostraram um aumento de 6%.<sup>32</sup> Uma vez que nossos pacientes têm dano renal crônico mais avançado, e níveis mais

elevados de proteinúria, não foi possível demonstrar uma associação desse tipo, provavelmente porque os níveis séricos de 25(OH)D e albuminúria se correlacionam nas fases iniciais da doença renal.

Os efeitos protetores da vitamina D sobre a perda da taxa de filtração glomerular e a progressão da doença renal estão ainda para serem demonstrados em ensaios clínicos. De Boer *et al.*<sup>5</sup> avaliaram 1.705 idosos com função renal predominantemente normal e descobriram que uma redução de 10 ng/ml na concentração sérica de 25(OH)D aumentou o risco de perda rápida de 25% na TFG. No presente estudo, a taxa de filtração glomerular diminuiu de forma significativa por uma média de 4 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, após seis meses de tratamento com colecalciferol. Esses achados estão de acordo com os de Liu *et al.*,<sup>30</sup> que relataram um aumento na creatinina sérica e uma diminuição na taxa de filtração glomerular em pacientes tratados com calcitriol. No entanto, também devem ser considerados os efeitos da vitamina D no metabolismo de creatinina nos pacientes com DRC. É sabido que a vitamina D aumenta a geração de creatinina, levando a níveis superiores de creatinina sérica, sem efeito real sobre a TFG.<sup>33,34</sup> Ensaios clínicos em fases iniciais de DRC ainda são necessários para se determinar os efeitos renoprotetores de longo prazo da vitamina D na função renal e a morbimortalidade nos pacientes.

Para avaliar a distribuição de mRNA de cada podócito urinário segundo valores basais e após o tratamento sérico em 25(OH)D, determinamos os tercís de 25(OH)D (< 23, 23-30 e > 30 ng/mL). Teoricamente, esperaríamos níveis mais elevados de subprodutos podocitários na urina no tercil basal mais baixo de vitamina D. Por outro lado, os níveis mais baixos de mRNA podocitários no tercil mais alto de 25(OH)D seriam considerados após a suplementação de colecalciferol, sugerindo um efeito presumido da vitamina D na “recuperação morfológica e funcional” de células epiteliais glomerulares, e consequentemente baixa podocitúria. No entanto, a distribuição irregular de mRNA podocitários ao longo dos tercís não confirma nossa hipótese principal.

É possível que um limite mais alto para os níveis de 25(OH)D ou um período mais longo de suplementação possam ser necessários para restaurar a transcrição do gene e a expressão de proteínas podocitárias no glomérulo. Além disso, a substituição do colecalciferol pode não ser eficaz para reduzir a



proteinúria na doença renal crônica avançada. Caso contrário, o grau de lesão em podócitos na DRC mais avançada, que está associado a uma percentagem mais elevada de esclerose glomerular, pode resultar em dano podocitário irreversível e morte celular por meio de mecanismos apoptóticos ou não-apoptóticos.

Existem várias limitações a este estudo. O pequeno tamanho da amostra e a ausência de um grupo controle poderiam impedir quaisquer conclusões sobre os efeitos reais do colecalciferol sobre a podocitúria, e o curso de mRNA podocitário na urina durante a progressão da DRC. Outra limitação é a heterogeneidade do grupo de estudo com relação a diferentes etiologias e estágio da DRC, ambos os quais podem ter implicações para a lesão e recuperação de podócitos. No entanto, o método utilizado para detectar lesão podocitária no presente exemplo, isto é, a quantificação de mRNA associado a podócitos na urina, oferece um método acurado e não invasivo, apesar de indireto, para medir a podocitúria, com nenhum dos riscos associados aos métodos invasivos, tal como a biópsia renal.

Os efeitos da  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  são mais susceptíveis a influências pela concentração sérica de  $25(\text{OH})\text{D}$  após a suplementação (que pode precisar atingir um determinado ponto de corte, antes de qualquer efeito ser visto), uma maior duração do tratamento, e/ou o início de vitamina D nas fases iniciais da DRC, em vez dos níveis basais de  $25(\text{OH})\text{D}$  em si. Além disso, a utilização de formas ativas de vitamina D ou seus análogos, tais como o calcitriol ou paricalcitol, em vez do substrato colecalciferol, pode ser necessário para maximizar a ativação direta do VDR em células podocitárias que conduzem a uma resposta biológica.

Podemos também considerar que o colecalciferol não está devidamente convertido em calcitriol ativo em estágios mais avançados da DRC. Esta menor conversão de vitamina D nativa ao calcitriol pode estar associada à inibição da 1-alfa-hidroxilase no rim devido a níveis mais elevados do fator 23 de crescimento de fibroblastos através da ativação da via de sinalização ERK1/2,<sup>35</sup> além da perda de massa renal funcional.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, seis meses de suplementação de colecalciferol não teve nenhum efeito no perfil de mRNA podocitário na urina, proteinúria ou função renal em pacientes com DRC nos estágios 2 a 4. No

entanto, os pacientes com níveis mais elevados de  $25(\text{OH})\text{D}$ , mostraram uma tendência na redução de mRNA da nefrina e da podocina após o tratamento. Mais estudos são necessários para avaliar os efeitos protetores da vitamina D ou seus análogos em podócitos, talvez, nas fases iniciais da DRC e com um maior tempo de seguimento.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores informam que não há conflitos de interesse.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Fundo de Amparo à Pesquisa do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) pelo o apoio financeiro, à Coordenação Brasileira para a Melhoria do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado concedida a João Rodolfo Teló Timm, e ao laboratório de Biologia Molecular aplicada à Nefrologia para o suporte técnico.

## REFERÊNCIAS

1. 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. PMID: 15957131 DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.02.029>
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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002012000100009>
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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.03.020>
4. de Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzell 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. PMID: 17591526 DOI:<http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.04.015>
5. de Boer IH, Katz R, Chonchol M, Ix JH, Sarnak MJ, Shlipak MG, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and change in estimated glomerular filtration rate. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:2141-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.02640311>
6. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Akizawa T, 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2006091028>
7. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, Schwarz U, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F526-33. PMID: 14600034 DOI:<http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00316.2003>
8. 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;35:58-68. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000334626>
9. Deb DK, Wang Y, Zhang Z, Nie H, Huang X, Yuan Z, et al. Molecular mechanism underlying 1,25-dihydroxyvitamin D regulation of nephrin gene expression. *J Biol Chem* 2011;286:32011-7. PMID:

- 21803771 DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.269118>
10. 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;52:249-55. PMID: 18606901 DOI:<http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.113159>
  11. 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;376:1543-51. PMID:21055801 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61032-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61032-X)
  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;14:199. DOI: <http://dx.doi.org/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. DOI:<http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2014.29.4.416>
  14. Wang Y, Zhou J, Minto AW, Hack BK, Alexander JJ, Haas M, et al. Altered vitamin D metabolism in type II diabetic mouse glomeruli may provide protection from diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2006;70:882-91. DOI:<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5001624>
  15. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2012040383>
  16. Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, Minto AW, Kong J, et al. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008;73:163-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002572>
  17. Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1733-41. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005020159>
  18. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al.; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12. DOI:<http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006>
  19. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:S1-201.
  20. Rodrigues PG, Brighenti RN, do Nascimento JF, 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.
  21. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005;26:662-87. DOI:<http://dx.doi.org/10.1210/er.2004-0002>
  22. Molina P, Górriz JL, Molina MD, Peris A, Beltrán S, Kanter J, et al. The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrol Dial Transplant* 2014;29:97-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gft360>
  23. Li YC. Podocytes as target of vitamin D. *Curr Diabetes Rev* 2011;7:35-40. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/157339911794273964>
  24. Wang Y, Borchert ML, Deluca HF. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. *Kidney Int* 2012;81:993-1001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.463>
  25. Sonneveld R, Ferrè S, Hoenderop JG, Dijkman HB, Berden JH, Bindels RJ, et al. Vitamin D down-regulates TRPC6 expression in podocyte injury and proteinuric glomerular disease. *Am J Pathol* 2013;182:1196-204. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.011>
  26. Xiao HQ, Shi W, Liu SX, Zhang B, Xu LX, Liang XL, et al. Podocyte injury is suppressed by 1,25-dihydroxyvitamin D via modulation of transforming growth factor-beta 1/bone morphogenetic protein-7 signalling in puromycin aminonucleoside nephropathy rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:682-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05133.x>
  27. Zou MS, Yu J, Nie GM, He WS, Luo LM, Xu HT. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 decreases adriamycin-induced podocyte apoptosis and loss. *Int J Med Sci* 2010;7:290-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.7150/ijms.7.290>
  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;399:155-65. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-014-2242-9>
  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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2010.07.002>
  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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.09.014>