



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ABEL ESTEVES SOARES

**DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA NÃO DIALÍTICA**

Londrina
2015

ABEL ESTEVES SOARES

**DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA NÃO DIALÍTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S676d Soares, Abel Esteves.

Deficiência de vitamina D, inflamação e estresse oxidativo em
pacientes com doença renal crônica não dialítica / Abel Esteves
Soares. – Londrina, 2015.
122 f. il.

Orientador: Vinícius Daher Alvares Delfino.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Insuficiência renal crônica – Teses. 2. Deficiência de vitamina D –
Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Estresse oxidativo – Teses. 5. Rins –
Doenças – Teses. I. Delfino, Vinícius Daher Alvares. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.61

ABEL ESTEVES SOARES

**DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NÃO
DIALÍTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Vinicius D. Alvares Delfino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Isaías Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo Mazza do Nascimento
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof. Dr. Sérgio Gardano Elias Bucharles
Fundação Pró Renal – Curitiba

Londrina, 16 de janeiro de 2015.

DEDICO

Aos meus pais, Francisco e Maria, que não mediram esforços para permitir que eu realizasse o sonho de cursar Medicina e de hoje estar concluindo o Doutorado;
À minha esposa, Clélia, e meus filhos, Carolina e Eduardo, por tornarem minha vida muito mais feliz e interessante, além do incentivo constante, que hoje reflete em minhas conquistas acadêmicas e profissionais.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes do Ambulatório de Nefrologia da Universidade Estadual de Londrina e do Instituto do Rim, que confiando na equipe médica e com o objetivo de colaborar para o desenvolvimento científico, aceitaram participar deste estudo;

Aos Nefrologistas da Universidade Estadual de Londrina e do Instituto do Rim de Londrina pelo auxílio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e do Laboratório Clínico do Hospital Universitário por facilitarem os trâmites para cadastrar os pacientes e realizar os exames laboratoriais;

À Bioquímica Paula Godeny pela participação deste projeto desde a sua elaboração, por realizar as coletas de amostras de material biológico e pela realização dos marcadores de estresse oxidativo;

Aos ex-alunos do curso de Medicina da UEL, Taysa Antonia F. da Silva e Flávio Henrique M. O. Souza pela participação no desenvolvimento deste trabalho;

Aos Mestres falecidos, Prof. Dr. Altair Jacob Mocelin e Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia, pelo exemplo de dedicação ao paciente e à Universidade, pelo carinho e incentivo que sempre me dispensaram. O meu reconhecimento e gratidão eternos;

Ao Prof. Dr. Vinicius D. A. Delfino, que além de orientador é um grande amigo e um exemplo de dedicação, organização e talento na arte da Medicina.

E à Universidade Estadual de Londrina que me oportunizou realizar a especialização, o mestrado e me concedeu o privilégio de agora, conquistar o título de Doutor.

À todos os meus sinceros agradecimentos.

Não vês que somos viajantes?

E tu me perguntas:

Que é viajar?

Eu respondo com uma palavra: é avançar!

Experimentais isto em ti

Que nunca te satisfaças com aquilo que és

Para que sejas um dia aquilo que ainda não és.

Avança sempre! Não fiques parado no caminho.

Santo Agostinho

SOARES, A. E. Deficiência de vitamina D, inflamação e estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica não dialítica. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade Estadual de Londrina. Programa de Pós-graduação, 2015.

RESUMO

A progressão da DRC eleva substancialmente os riscos de eventos cardiovasculares e de morte e está associada a elevados níveis de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, os quais por sua vez estão associados, entre outras condições, à progressão mais rápida para doença renal terminal e aumento na mortalidade de todas as causas. A hipovitaminose D - 25(OH) vitamina D < 30 ng/mL - vem sendo associada a desfechos renais e cardiovasculares desfavoráveis na população geral e em pacientes com DRC e a sua reposição pode melhorar parâmetros de inflamação e em concomitância ao bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina (SRA) reduz a proteinúria em modelos experimentais e em pacientes com nefropatias. Este estudo avaliou o efeito de seis meses de suplementação oral com colecalciferol para pacientes adultos com DRC não dialítica sobre um painel de biomarcadores inflamatórios (fibrinogênio, proteína C reativa, homocisteína e interleucina-6) e de estresse oxidativo (capacidade antioxidante total plasmática, metabólitos do óxido nítrico e hidroperóxidos) e, também, o efeito da suplementação de colecalciferol sobre a taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) nos pacientes que se encontravam utilizando inibidores do SRA (ISRA) concomitantemente. A suplementação foi feita com cápsulas contendo 50.000UI de colecalciferol e teve sua periodicidade definida a partir dos níveis basais de 25(OH) vitamina D. Duzentos e seis pacientes iniciaram o estudo e hipovitaminose D estava presente em 111 pacientes (53,88%). Ao início do estudo, os pacientes dos grupos com e sem hipovitaminose D apresentavam diferenças significativas em algumas variáveis, sendo que os do grupo com baixa vitamina D tinham menores TFGe, níveis tensionais mais elevados e maiores níveis de proteinúria, indicando maior gravidade da DRC neste grupo. Cento e setenta e sete pacientes completaram os 6 meses de estudo (96 no grupo com deficiência de vitamina D e 81 com níveis séricos considerados adequados na situação basal). O esquema terapêutico utilizado foi adequado para normalizar os níveis séricos de vitamina D em 75% dos pacientes, mas com os biomarcadores utilizados, não se observou redução no estresse oxidativo e no estado inflamatório destes pacientes. Analisando a interação entre as variáveis tempo, tratamento com colecalciferol e o uso de ISRA, observou-se que a suplementação de vitamina D concomitante ao uso ISRA esteve associada à significativa preservação da TFGe (mediana inicial de 33 e final de 32 mL/min/1,73m² – P = 0,056) e queda na TFGe quando não houve suplementação com colecalciferol (mediana inicial de 41 e final de 39 mL/min/1,73m² – P = 0,032). Pôde-se concluir que seis meses de suplementação com colecalciferol foram suficientes para a obtenção de valores de referência de vitamina D, mas não produziu mudanças significativas nos parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação dos pacientes estudados. A suplementação

de colecalciferol simultaneamente ao uso de ISRA protegeu os rins da redução na TFGe e pode representar uma estratégia de renoproteção para este grupo de pacientes. Estudos adicionais são necessários para a confirmação destes achados.

Palavras-chave: Deficiência de vitamina D. Doença renal crônica. Sistema renina-angiotensina. Taxa de filtração glomerular. Inflamação. Estresse Oxidativo.

SOARES, A. E. Effects of vitamin D supplementation on inflammation and oxidative stress in non-dialytic chronic kidney disease patients. 2015. 122 p. Thesis (Doctoral Degree Thesis). Universidade Estadual de Londrina, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. 2015.

ABSTRACT

The progression of CKD substantially increases the risk of cardiovascular events and death and is associated with elevated levels of inflammatory markers and oxidative stress, which in turn are associated with, among other conditions, to more rapid progression to ESRD and increase in mortality from all causes. Vitamin D deficiency - 25(OH) vitamin D < 30 ng/mL - has been associated with adverse renal and cardiovascular outcomes in the general population and in patients with CKD, its replacement may improve inflammation parameters and, concomitantly to pharmacological blockade of the system renin-angiotensin system (RAS), reduces proteinuria in experimental models and in patients with nephropathy. This study evaluated the effect of six months of oral supplementation with cholecalciferol for adult patients with CKD not on dialysis over a panel of inflammatory biomarkers (fibrinogen, C-reactive protein, homocysteine and interleukin -6) and oxidative stress (plasma total antioxidant capacity, metabolites of nitric oxide and hydroperoxides), and also the effect of supplementation of cholecalciferol on estimated glomerular filtration rate (eGFR) in patients who were using RAS inhibitors (ISRA) concurrently. Supplementation was made with capsules containing 50,000 IU of cholecalciferol and had its defined frequency from baseline levels of 25(OH) vitamin D. Two hundred and six patients started the study and vitamin D deficiency was present in 111 patients (53.88 %). At baseline, patients in groups with and without vitamin D deficiency had significant differences in some variables, and the lower the vitamin D group had lower eGFR, higher blood pressure levels and higher levels of proteinuria, indicating greater severity of CKD in this group. One hundred and seventy-seven patients completed the 6-month study (96 in the vitamin D-deficient group and 81 with serum levels considered adequate at baseline). The therapeutic regimen was adequate to normalize the serum levels of vitamin D in 75% of patients, but with the biomarkers used, there was no reduction in oxidative stress and inflammatory status of these patients. Analyzing the interaction between the variables time, cholecalciferol treatment, and the use of ISRA, it was found that vitamin D supplementation concomitantly with ISRA use was associated with significant preservation of eGFR (initial and final median of 33 and 32 mL/min/ 1.73m², respectively – P = 0.056) and a decrease in eGFR when no supplementation with cholecalciferol (initial and final median of 41 and 39 mL /min/1.73m² - P = 0.032) . It was concluded that six months of supplementation with cholecalciferol was sufficient to obtain a reference value of vitamin D, but did not produce significant changes in parameters of oxidative stress and inflammation in patients. The cholecalciferol supplementation with simultaneous use of ISRA protected the kidneys from reduction in eGFR and may represent a renoprotection strategy for this group of patients. Additional studies are needed to confirm these findings.

Key-words: Vitamin D deficiency. Chronic kidney disease. Renin-angiotensin system. Glomerular filtration rate. Inflammation. Oxidative stress.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doença renal crônica definida pela <i>National Kidney Foundation</i>	17
Tabela 2 – Características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com DRC não dialíticos tratados e não tratados com colecalciferol	43
Tabela 3 – Doença de base dos pacientes com DRC não dialíticos tratados e não tratados com colecalciferol.....	44
Tabela 4 – Efeito do tratamento com colecalciferol sobre alguns parâmetros laboratoriais dos pacientes com DRC não dialítica	45
Tabela 5 – Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais do metabolismo mineral e ósseo dos pacientes com DRC não dialítica	46
Tabela 6 – Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais de inflamação e de estresse oxidativo dos pacientes com DRC não dialítica.....	47
Tabela 7 – Características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com DRC não dialíticos tratados com colecalciferol e que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30 ng/mL	48
Tabela 8 – Efeito do tratamento com colecalciferol sobre alguns parâmetros laboratoriais dos pacientes com DRC não dialítica que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30 ng/mL	49
Tabela 9 – Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais do metabolismo mineral e ósseo dos pacientes com DRC não dialítica que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30 ng/mL	50
Tabela 10 – Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais de inflamação e de estresse oxidativo dos pacientes com DRC não dialítica e que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30 ng/mL	51

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ Vit D	1,25 dihidroxivitamina D
25(OH)Vit D	25 hidroxivitamina D
ADMA	Dimetil Arginina Assimétrica
AOPP	<i>Advanced Oxidation Protein Products</i>
BRA	Bloqueador de Receptor tipo 1 de Angiotensina II
CYP24A1	24 hidroxilase
CYP27B1	1 α hidroxilase
DRC	Doença Renal Crônica
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
KDOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LOOH	Hidroperóxido Lipídico
MDA	Malondialdeído
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
NKF	<i>National Kidney Foudation</i>
NO	Óxido Nítrico
NOx	Metabólito do Óxido Nítrico
O ₂ [•]	Ânions Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
ONOO	Nitroperóxido
PCR	Proteína C Reativa
PLD	Proteína Ligadora de Vitamina D
PTH	Paratormônio
QL	Quimiluminescência
Radiação UV	Radiação Ultravioleta

RPM	Rotações por Minuto
RVD	Receptor de Vitamina D
SOD	Superóxido Dismutase
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TFGe	Taxa de Filtração Glomerular Estimada
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TRAP	<i>Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Potential</i>
Vit D	Vitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Doença Renal Crônica	16
1.2	Doença Renal Crônica e Doença Cardiovascular	17
1.3	Vitamina D	20
1.4	Vitamina D e Doença Renal Crônica	22
2	JUSTIFICATIVA DA PESQUISA CLÍNICA	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivos primários	29
3.2	Objetivos secundários	29
4	PACIENTES E MÉTODOS	31
4.1	Pacientes e métodos	32
4.2	Avaliação antropométrica e de pressão arterial.....	33
4.3	Coleta de amostras biológicas	33
4.4	Parâmetros bioquímicos e marcadores inflamatórios	34
4.5	Avaliação do estresse oxidativo	35
4.5.1	Capacidade Antioxidante Total Plasmática Avaliada pela TRAP	35
4.5.2	Determinação dos Metabólitos do NO	35
4.5.3	Quantificação de Produtos Avançados da Oxidação de Proteínas.....	36
4.5.4	Quiluminescência Induzida por t-Butil Hidroperóxidos	36
4.6	Análise Estatística	36
5	RESULTADOS	38
6	CONCLUSÕES	53
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55

REFERÊNCIAS	57
ARTIGOS	69
ARTIGO 1 – Effect of vitamin D supplementation on oxidative stress and inflammation status in pre-dialysis chronic kidney disease patients	70
ARTIGO 2 – Addition of vitamin D reverses the decline in GFR following treatment with ACE Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers in patients with Chronic Kidney Disease	96
APÊNDICE	118
APÊNDICE – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	119
ANEXO	121
ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina	121

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica

É de amplo conhecimento que pacientes com doença renal crônica (DRC), inclusive aqueles com moderada diminuição da função renal, têm um risco aumentado de mortalidade, principalmente as de causas cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio, arritmias, insuficiência cardíaca e acidente vascular encefálico (1), além de maiores taxas de hospitalizações em relação à população geral (2).

A DRC é definida pela *National Kidney Foundation* (NKF) como anormalidades estruturais ou funcionais dos rins por período superior a três meses, com implicações na saúde do indivíduo. O grupo de trabalho da NKF, intitulado *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI), propõe uma classificação de estratificação, em estágios, da alteração da função renal de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) expressa em mililitros por minuto corrigida para a superfície corporal de $1,73 \text{ m}^2$ ($\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$). Este guia sugere um modelo conceitual da história natural da DRC, que geralmente se inicia com uma lesão renal e progride pelos estágios da DRC até a falência renal terminal com necessidade de diálise e/ou transplante (3).

Um dos métodos para a estimativa da TFG (TFGe) emprega a fórmula desenvolvida a partir do estudo populacional americano *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) (4), que foi validado para a utilização com quatro variáveis: idade, creatinina sérica, sexo e raça (5).

A classificação da DRC atualmente recomendada é apresentada na tabela 1.

Tabela 1 - Doença renal crônica definida pela *National Kidney Foundation* (3)

Estágio TFGe*		Significado
Estágio 1	≥ 90 mL/min/1,73m ²	normal
Estágio 2	60-89 mL/min/1,73m ²	diminuição leve
Estágio 3 a	45-59 mL/min/1,73m ²	diminuição leve a moderada
Estágio 3 b	30-44 mL/min/1,73m ²	diminuição moderada a grave
Estágio 4	15-29 mL/min/1,73m ²	diminuição grave
Estágio 5	< 15 mL/min/1,73m ²	falência renal

*TFGe: Taxa de Filtração Glomerular estimada (5)

1.2 Doença Renal Crônica e Doença Cardiovascular

Lindner et al. em 1974 foram os primeiros a relatarem a mortalidade cardiovascular em pacientes em hemodiálise; após estes, vários estudos mais recentes têm confirmado estes resultados (6).

Entre os pacientes com DRC em fase pré-dialítica, o risco de mortalidade cardiovascular é cerca de 10 a 30 vezes maior quando comparado à população geral (7,8). Alterações estruturais e funcionais do sistema cardiovascular como as calcificações vasculares, a hipertrofia do ventrículo esquerdo, a disfunção endotelial e o espessamento arterial, contribuem para o risco elevado desta mortalidade. Uma porcentagem significativa de pacientes que sobrevivem à progressão da DRC culminando com a necessidade de terapia renal substitutiva, desenvolverá doença cardiovascular significativa (9).

Como a doença cardiovascular em pacientes com DRC é a principal causa de mortalidade, o entendimento da sua fisiopatologia pode determinar condutas, medicamentosas ou não, que possam contribuir para diminuir este desfecho.

Fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de doença cardiovascular como a idade, o tabagismo, a dislipidemia, a presença de diabetes melito tipo 2 e/ou hipertensão arterial, a hipertrofia do ventrículo esquerdo, a insuficiência cardíaca ou a inatividade física não explicam totalmente esta elevada taxa de mortalidade cardiovascular nos indivíduos com doença renal, mas que podem ser agravados por

condições próprias da DRC. Fatores de risco específicos da uremia como a expansão crônica de volume, a anemia, as alterações eletrolíticas, a hiperatividade simpática, o hipercatabolismo, a hiperhomocisteinemia, o distúrbio mineral e ósseo, o estado de microinflamação e o estresse oxidativo, podem ajudar a explicar a alta incidência de eventos cardiovasculares nestes pacientes (8-10).

A DRC está associada a elevados níveis de marcadores inflamatórios, que por sua vez, estão associados à aterosclerose, progressão mais rápida para doença renal terminal e aumento na mortalidade de todas as causas (10).

A aterosclerose é uma doença arterial difusa e a principal causa de doença cardiovascular na DRC. Suas características principais são os baixos níveis de HDL (*high-density lipoprotein*) colesterol e de elevados níveis de LDL (*low-density lipoprotein*) colesterol. Estresse oxidativo, disfunção endotelial e inflamação formam a tríade que iniciam e aceleram a aterosclerose (10).

Pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo ânions de superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e radical hidroxila (OH^{\cdot}), são formados constantemente no organismo durante o processo de geração de energia na mitocôndria e pela redução do oxigênio durante a respiração anaeróbica, além de ser uma resposta a estímulos internos e externos, como micro-organismos invasores, células neoplásicas e no processo de reparação de tecidos. Habitualmente, são eficientemente neutralizados pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e substâncias não enzimáticas como a glutathione reduzida e as vitaminas C e E. Essas (EROs) e ERNs são, portanto, parte da defesa do organismo, mas em quantidades elevadas podem produzir lesão celular pela interação com proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos (9).

Estresse oxidativo é o desequilíbrio na taxa de produção e de degradação das EROs e ERNs. O aumento no estresse oxidativo favorece a disfunção endotelial pela redução do óxido nítrico (NO) disponível, que nestas condições altera a permeabilidade capilar e permite maior entrada de LDL na íntima do vaso, que é então oxidada e transformada em uma molécula altamente aterogênica que inicia o processo inflamatório do vaso. Na sequência, células inflamatórias circulantes como os monócitos, são atraídas por citocinas e fatores de crescimento, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o fator ativador plaquetário, a interleucina (IL)-12 e o interferon gama que se depositam no espaço subendotelial. Os monócitos

diferenciam-se em macrófagos, que produzem enzimas como a mieloperoxidase e a lipoxigenase, que aumentam a oxidação da LDL. Ocorre, assim, intensa captação da LDL altamente oxidada pelos macrófagos que são transformados em células espumosas, que formam junto com lipídeos extracelulares as estrias gordurosas, sendo a alteração estrutural mais precoce no processo da aterosclerose. Enquanto a lesão progride, células musculares lisas da média migram para a íntima, estimuladas pelos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF – *fibroblast growth factor*), onde elas se proliferam e produzem matriz extracelular como colágeno e elastina em resposta a diferentes fatores de crescimento. Isto leva à formação de uma capa fibrosa que envolve e define a morfologia da lesão aterosclerótica (11).

A redução da função renal está frequentemente associada ao estresse oxidativo elevado e altos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo como F₂ isoprostanos, produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), malondialdeído (MDA) e hidroperóxido lipídico (LOOH) que são encontrados mesmo em fases iniciais da doença renal (12-16).

Sugere-se, então, que o estresse oxidativo aumentado possa ser o elo entre a inflamação e a lesão celular (13), resultando no desenvolvimento e/ou na progressão da doença cardiovascular mesmo em fases iniciais da DRC (14).

A resposta inflamatória não é somente um processo local, mas também pode se refletir sistemicamente e ser avaliada pelo aumento nos níveis séricos de marcadores inflamatórios como as proteínas de fase aguda, as citocinas e as moléculas de adesão (15).

A IL-6 é secretada por células como os macrófagos, monócitos, linfócitos T, adipócitos e astrócitos e exerce um importante papel na resposta inflamatória de fase aguda e é responsável pela ativação e proliferação de linfócitos, diferenciação de linfócitos B, recrutamento leucocitário e regulação e síntese de fibrinogênio e albumina. Em indivíduos em hemodiálise, a IL-6 está associada à mortalidade indicando o estado inflamatório à que estas pessoas estão expostas (16,17).

Níveis séricos de Proteína C Reativa (PCR), IL-6, fibrinogênio e F₂-isoprostano estão significativamente mais elevados e os fatores antioxidantes estão diminuídos nos pacientes pré-dialíticos quando comparados às pessoas saudáveis (18-22).

O NO derivado de endotélio é um importante mediador da regulação do tônus vascular e da pressão arterial, sendo produzido via reação que é catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial. A dimetil arginina assimétrica (ADMA) é um

subproduto da quebra de arginina metilada e é um inibidor endógeno da reação catalisada pela óxido nítrico sintetase endotelial (21). O acúmulo de ADMA na falência renal ocorre por diminuição da sua eliminação e da atividade da enzima que a degrada e está associado ao aumento na prevalência de doença cardiovascular e na mortalidade por todas as causas (22).

1.3 Vitamina D

A vitamina D é um hormônio esteroide e é encontrada em duas formas: vitamina D₂ (ergocalciferol) e D₃ (colecalfiferol). A vitamina D₂ é encontrada em vegetais e a vitamina D₃ é produzida pelo efeito da radiação ultravioleta (UV) B (290-315 nm) sobre o 7-deidrocolesterol na pele e está presente em óleo de fígado de peixes e em alimentos suplementados com esta vitamina. A exposição excessiva ao sol não causa intoxicação porque qualquer excesso de pró-vitamina D ou vitamina D₃ é convertida em formas inativas pela radiação solar (23-28).

As formas inativas de vitamina D são transportadas pelo sangue pelas proteínas de ligação da vitamina D (PLD) até o fígado onde sofrem um processo de hidroxilação pela 25-hidroxilase e são convertidas a 25hidroxivitamina D (25(OH) vitD) ou calcidiol, que é um metabólito parcialmente hidrossolúvel e o mais abundante na circulação. O complexo PLD-25(OH)vitD circula até os rins, onde é filtrado pelos glomérulos e a 25(OH)vitD é reabsorvida pelas células do túbulo proximal, via endocitose mediada pela megalina e é convertida, pela enzima 1 α -hidroxilase (CYP27B1) para a forma ativa, 1,25dihidroxivitaminaD₃ (1,25(OH)₂vitD) ou calcitriol. A ação da enzima 1 α -hidroxilase é limitada pela produção da 1,25(OH)₂vitD e está presente em muitos tecidos além dos rins, como as células musculares arteriais e endoteliais e isto permite a produção local de calcitriol, que não contribui significativamente para seu nível circulante, mas possui ações parácrinas e autócrinas e que podem regular a expressão gênica. Vários hormônios, incluindo o paratormônio (PTH) e o FGF-23 regulam a ação da 1 α -hidroxilase (23-28).

A enzima 24-hidroxilase (CYP24A1) cataboliza ambas 25(OH)vitD e a 1,25(OH)₂vitD em um metabólito biologicamente inativo e hidrossolúvel, o ácido calcitróico, que é excretado pela bile (24).

A monitorização do *status* de vitamina D não é baseada na dosagem de $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$, mas na medida da $25(\text{OH})\text{vitD}$, que tem meia vida de três semanas, é mais estável e tem a concentração sérica 1000 vezes maior que a $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$ (24-28).

Embora não haja um consenso sobre o valor normal de vitamina D, a maioria dos autores define como deficiência os valores de $25(\text{OH})\text{vitD}$ menores que 20 ng/mL, insuficiência de 21 a 29 ng/mL e acima de 30 ng/mL como adequado (24-29). Esta classificação é baseada em uma definição funcional, em que o nível ótimo de vitamina D é a quantidade necessária para suprimir ao máximo o PTH, porque o principal estímulo para secreção deste hormônio da paratireoide é o baixo nível de cálcio sérico ionizado e que em adultos ocorre, em média quando a vitamina D atinge o nível sérico de 30 ng/mL (23-28).

Como a vitamina D é catalisada pela radiação UV, o seu nível é altamente influenciado por fatores como a exposição solar, localizações geográficas, sazonalidade (23-26), pigmentação da pele (menores em indivíduos da raça negra) (26), idade (menores em idosos) e uso de bloqueadores ou protetores solares (23-28). Outros fatores relacionam-se inversamente com o nível de vitamina D, como a obesidade, estados de má absorção devido às pancreatites crônicas, às doenças inflamatórias intestinais, enteropatia por glúten e cirurgias gástricas, uso de anticonvulsivantes (fenobarbital e fenitoína) e uso de glicocorticoides por tempo prolongado (26).

A $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$ circulante atravessa a membrana celular, o citoplasma e chega ao núcleo da célula onde se liga aos receptores de vitamina D (RVD), altera a função gênica e induz a produção de proteínas. Os RVD estão presentes em vários tipos de células: miócitos, cardiomiócitos, células β pancreáticas, células endoteliais vasculares, neurônios, células imunológicas e osteoblastos (24,25,28). Direta ou indiretamente a $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$ regula a expressão de mais de 200 genes, que incluem aqueles responsáveis pelo aumento na produção de insulina no pâncreas, de inibição de renina nos rins, de citocinas nos linfócitos, catecilidinas nos macrófagos e crescimento e proliferação de células musculares lisas em vasos (29).

A $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$ é responsável por ações esqueléticas bem estabelecidas no organismo e, em vigência de hipovitaminose D, apenas 15% do cálcio ingerido é absorvido e quando os estoques da vitamina estão normais esta absorção se eleva para 40% (25). A osteoporose acomete um terço das mulheres entre 60 e 70 anos

de idade e cerca de 70% acima de 80 anos. Aproximadamente 47% das mulheres e 22% dos homens acima dos 50 anos de idade apresentarão alguma fratura associada à osteoporose no decorrer de suas vidas (24). Existem evidências de que a suplementação de cálcio e de vitamina D previnem as fraturas relacionadas à osteoporose (25).

Ações não esqueléticas da vitamina D são conhecidas e podem influenciar o risco no surgimento de alguns tipos de câncer como o de intestino, pâncreas, próstata e mamas; doenças autoimunes como a psoríase, o diabetes melito tipo 1, a esclerose múltipla e a doença de Crohn; doenças infecciosas; doenças cardiovasculares e também doenças do comportamento como a depressão e a esquizofrenia (23-28).

A deficiência de vitamina D afeta boa parte da população mundial (23,30-40), mesmo em países com alto índice de insolação, como o Brasil (33,36).

1.4 Vitamina D e Doença Renal Crônica

A prevalência de deficiência de vitamina D é alta em várias populações estudadas (30-40) e tem sido considerada como fator de risco aumentado para o surgimento de hipertensão arterial (40,41) e doenças cardiovasculares, em indivíduos com função renal normal (42), ou para pacientes com DRC não dialítica (34,43-45) e dialítica (46,60). Na população geral, a mortalidade total e as de causas cardiovasculares estão independentemente associadas a baixos níveis de vitamina D (47-51).

A obesidade, a proteinúria e o diabetes melito tipo 2 foram considerados como importantes fatores associadas à hipovitaminose D em pessoas com DRC (32,37,44,52,53) e na população geral (24-26,30,35,38).

A deficiência ou insuficiência de vitamina D em pacientes com DRC está presente em estágios precoces e piora com a progressão da doença renal (52-54,65), além disso, está associada a maior mortalidade (34,44,46,54-61), principalmente se houver proteinúria associada (61-64).

As causas mais importantes para os baixos níveis de vitamina D na DRC são a diminuição da atividade de endocitose mediada pela megalina, à baixa atividade da 1α -hidroxilase (65) e se houver proteinúria associada, ocorre também perda de complexo 25(OH)vitD – PLD (31). Além desses fatores ainda há o aumento da

atividade da enzima catalisadora das duas formas da vitamina D, a 24-hidroxilase; todos estes fatores contribuem para o baixo nível sérico de 25(OH)vitD e 1,25(OH)₂vitD. O FGF-23 também está relacionado à hipovitaminose D, pois este fator estimula a ação da 24-hidroxilase, suprime diretamente a atividade da 1 α -hidroxilase, pela regulação da transcrição do gene desta enzima e inibe a síntese de PTH (31,66,67).

Em 1989, o primeiro FGF, um peptídeo de 251 aminoácidos, foi identificado em fibroblastos de cérebro e da hipófise (68) e em 2000 já se conheciam vinte e dois membros da família FGF. Nesse mesmo ano, cientistas japoneses, identificaram o FGF-23, que pertence ao subgrupo do FGF-19 (69). O FGF-23 é um fator termo sensível, que inibe o co-transporte de fósforo e sódio no túbulo proximal e é classificado como fosfatonina, hormônio fosfatúrico derivado do osso (osteócitos). O resultado da sua ação é a elevada excreção de fósforo, com conseqüente hipofosfatemia e diminuição da conversão de 25(OH)vitD para 1,25(OH)₂vitD, por inibir a ação da 1 α -hidroxilase e por estimular a ação da 24 hidroxilase (70). O FGF-23 está presente no plasma de indivíduos saudáveis e pela presença de hiperfosfatemia, que se desenvolve com a progressão da DRC. O FGF-23 é liberado em grandes quantidades na corrente sanguínea, podendo ser até 1000 vezes maior em estágios avançados da DRC quando comparado às pessoas saudáveis (66,67,71).

O gene Klotho foi identificado acidentalmente em 1997 e produz uma proteína de 1012 aminoácidos (proteína Klotho), que se expressa em vários tecidos, particularmente nos rins. A proteína de membrana Klotho pode formar um complexo com receptores de FGF-23 e funcionar como um co-receptor para FGF-23. Existem quantidades expressivas de seus receptores em células dos túbulos distais dos rins, paratireoides e plexo coróide no cérebro. Experimento em cultura de células mostrou que o FGF-23 se liga ao receptor 1 do FGF-1 (FGF-R1) com baixa afinidade, devido a sua fraca capacidade de ligação ao heparan-sulfato, mas que na presença da proteína Klotho esta afinidade aumenta consideravelmente. O Klotho suprime a 1 α -hidroxilase nos rins e regula o metabolismo do cálcio e da síntese de PTH pelas glândulas paratireoides, por ação do FGF-23. Em sua forma solúvel, Klotho, atua como hormônio que tem efeito fosfatúrico independente de FGF-23 (67,71).

Em pacientes com estágios iniciais da DRC o FGF-23 aumenta progressivamente à medida que cai a TFG, este aumento ocorre precocemente, com

TFG abaixo de 70 mL/minuto/1,73m² (72,73). Isto pode corresponder a uma apropriada resposta fisiológica com a finalidade de manter um balanço neutro de fósforo pela promoção da excreção urinária de fosfato; outro efeito já descrito é a diminuição da 1,25(OH)₂vitD e que favorece o surgimento de hiperparatireoidismo secundário (74). Porém, com a progressão da DRC ocorre diminuição na expressão da proteína Klotho e de receptores FGF-R1 nos rins e nas paratireoides, o que aumenta a resistência celular ao FGF-23, ou seja, os rins não conseguem compensar a retenção de fósforo e mantêm-se o estímulo para aumentar a secreção de FGF-23 (66, 67,71-73).

Esta hipótese ganha força com os resultados do estudo epidemiológico *CRIC* (*Chronic Renal Insufficiency Cohort*) com seguimento de 3879 pacientes com DRC estágios 2 a 4, onde foram encontrados valores elevados de PTH e FGF-23 com nível sérico normal de fósforo (74-76).

A hipovitaminose D está associada à inflamação, com elevados níveis de PCR e IL-6 em pacientes com DRC dialítica ou não (77,78).

Na população geral, a suplementação de vitamina D diminuiu a mortalidade total (79,80) e em pacientes com DRC pré-dialítica ou dialítica, também houve queda tanto na mortalidade total quanto nas de causas cardiovasculares (81,82).

A suplementação de vitamina D mostrou-se segura e eficaz em normalizar o nível sérico desta vitamina em pacientes com DRC não dialítica (83-88) e sem alterar a TFG (89); além disso, diminuiu o risco de doença cardiovascular (90), aumentou a sobrevida (91) e diminuiu a mortalidade em incidentes em hemodiálise e em diálise peritoneal (92,93).

A restauração de níveis séricos de vitamina D acima de 30 ng/mL está associada à queda dos níveis séricos de PCR e IL-6 (89,94-96) e à queda na proteinúria em diabéticos (97,98) ou não diabéticos (99-102). Diferentemente, Marckmann et al. em trabalho randomizado, duplo cego, de suplementação oral de colecalciferol, em uma série pequena de pacientes em tratamento conservador, em hemodiálise e com transplante renal, não encontraram alteração em proteinúria, PCR e IL-6 (103). Tanaka et al. utilizaram calcitriol endovenoso em pacientes em hemodiálise e apontaram melhora no estresse oxidativo e no fortalecimento do sistema de defesa antioxidante (104).

Baixos níveis de vitamina D também estão associados à progressão da DRC na população geral (55,105) e em DRC em fases iniciais, além de outros fatores como a proteinúria e o diabetes melito tipo 2 (40,53,106-108).

Estudos em modelos animais (109,110) e em humanos (40,111) sugerem uma associação inversa entre os níveis séricos de vitamina D e a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA). A ativação dos RVD são nefro-protetores através da inibição da expressão de renina e consequente inativação do SRA (107,112).

A fibrose intersticial é um importante marcador de falência renal e correlaciona-se fortemente com a piora da função do órgão, independentemente da doença de base. Em fases avançadas da DRC ocorre lesão glomerular e túbulo-intersticial, hipertensão glomerular e proteinúria, que estão diretamente relacionados à ativação do SRA, que tem um importante papel na progressão da DRC (113).

As células renais são capazes de sintetizar renina e angiotensina II, que promovem múltiplos efeitos na progressão da lesão renal, como aumento na pressão capilar glomerular, produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltrado imune-celular, expansão da matriz extracelular e lesão de podócitos (109). Atualmente, os inibidores da enzima conversora de angiotensina/bloqueador de receptor tipo 1 de angiotensina II (IECA/BRA) são considerados medicamentos de primeira linha para o tratamento de pacientes com nefropatia diabética ou não (3,114,115), com o intuito de retardar a progressão de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e proteinúria (109). Ocorre que a efetividade dos IECA/BRA pode ser alterada pelo aumento compensatório da síntese de renina causada pela ruptura do *feedback* inibitório e isto desencadeia uma maior produção de renina, que por sua vez leva a aumento de angiotensina II, que causam lesão renal (113).

Li et al. (110) em trabalho experimental clássico mostraram que a 1,25(OH)₂vitamina D inibe o SRA por suprimir a transcrição da renina. Tan et al. (116) demonstraram que o tratamento com paricalcitol, um análogo sintético da vitamina D, atenuou a fibrose intersticial em camundongos submetidos à obstrução ureteral unilateral e Freundlich et al. (117) e Zhang et al. (118) utilizando o mesmo modelo experimental, mostraram que o paricalcitol suprimiu a ativação local do SRA nos rins, diminuiu significativamente a lesão túbulo-intersticial e glomerular e reduziu a pressão arterial e a proteinúria, sugerindo a importância deste bloqueio na prevenção da evolução da DRC.

Estudos experimentais em modelos animais com diabetes induzido (109, 118-120) ou de nefropatia obstrutiva (113,121,122), mostraram que a associação de IECA/BRA e vitamina D, mostraram resultados benéficos nos desfechos renais, pois esta bloqueia o aumento compensatório da renina com o uso destes medicamentos.

O uso combinado de IECA e BRA foi testado em vários estudos clínicos (123-127) e os resultados não foram diferentes quando comparados ao uso isolado de um destes medicamentos (128-130), quanto à redução na proteinúria, na elevação da creatinina sérica ou na necessidade de terapia renal substitutiva, porém, esteve associado com maior incidência de efeitos colaterais como a hipotensão arterial ou hipercalemia (131).

A versão de 2009 do KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) sobre o manejo da doença mineral e óssea associada à uremia, faz sugestão fraca para o rastreamento e tratamento da hipovitaminose D em pacientes nos estágios 3-5 da DRC, devendo se utilizar as mesmas recomendações diagnósticas e terapêuticas atualmente aplicadas para indivíduos da população geral (132).

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA CLÍNICA

2 Justificativa da Pesquisa Clínica

A hipovitaminose D é muito prevalente em pacientes com DRC e está associada à inflamação aumentada. O tratamento da hipovitaminose D já demonstrou reduzir a inflamação em algumas condições clínicas. O uso concomitante de ISRA e vitamina D tem potencial para reduzir a proteinúria e o dano renal. A suplementação de vitamina D pode promover melhoras em parâmetros de inflamação e de estresse oxidativo e retardar a perda da função renal, fatores associados a piores desfechos gerais e cardiovasculares nos pacientes com DRC.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Primários

Avaliar se existe associação entre os níveis plasmáticos de vitamina D e os níveis de inflamação e de estresse oxidativo em pacientes com DRC estágios 3 e 4;

Analisar o efeito de seis meses de suplementação oral de colecalciferol sobre os níveis de inflamação e de estresse oxidativo em pacientes com DRC estágios 3 e 4 com insuficiência e deficiência desta vitamina;

Observar o efeito da suplementação de colecalciferol oral sobre a TFGe nos pacientes em uso de IECAs/BRAs.

3.2 Secundários

Avaliar a prevalência de deficiência de vitamina D na população estudada;

Avaliar se o protocolo utilizado para a suplementação de vitamina D foi efetivo em normalizar os níveis séricos da vitamina D.

PACIENTES E MÉTODOS

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes e métodos

Um ensaio clínico com grupo controle, em uma amostra de conveniência, foi realizado de outubro de 2010 a dezembro de 2012. Pacientes com DRC do Ambulatório de Nefrologia da Universidade Estadual de Londrina e do Instituto do Rim de Londrina foram submetidos à avaliação clínica e física de rotina e em seus exames laboratoriais foram adicionados a dosagem sérica de 25(OH)vitD e 1,25(OH)₂vitD, além de uma alíquota para análises de parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo. Foram obtidas informações sobre tabagismo atual, doença cardiovascular prévia (insuficiência cardíaca congestiva, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico ou insuficiência arterial periférica) e medicamentos em uso. A etnia foi determinada por autodefinição. Um total de 206 pacientes em estágios 3 e 4 da DRC foram divididos em grupos com e sem deficiência de vitamina D e foram acompanhados por seis meses com suplementação por via oral de colecalciferol nos deficientes. Avaliações clínica e laboratorial foram realizadas ao início e após seis meses do estudo.

Os critérios de inclusão foram a idade superior a 18 anos e TFG_e entre 15 e 60 mL/min/1,73m². Critérios de exclusão foram: pacientes em diálise ou com transplante renal; história de doença disabsortiva intestinal, cirurgia por “bypass” ou ressecção intestinal; cirrose hepática, doença infecciosa atual ou neoplasia; perda inexplicada de mais que 5% do peso nos últimos seis meses; uso de corticosteroides oral ou inalatório, uso de anticonvulsivantes ou de suplementação de vitamina D.

O diagnóstico e a classificação da DRC seguiram os critérios propostos pelo *KDOQI* (3) baseado na TFG_e à partir da creatinina sérica e calculada pela fórmula do MDRD com 4 variáveis (5), sendo classificados em estágio 3 os pacientes com TFG_e entre 30 – 60 mL/min/1,73m² e em estágio 4, aqueles com 15 – 29 mL/min/1,73m².

Os pacientes com deficiência de 25(OH)vitD (nível sérico < 30 ng/mL) receberam suplementação oral com cápsulas de colecalciferol de 50.000U, baseado no protocolo vigente à época do estudo (132): < 5 ng/mL – 1 cápsula de 50.000 UI de colecalciferol (vit D₃) por 12 semanas, seguida de 1 cápsula de 50.000 UI de vit D₃ por mês por mais três meses; 5 – 15 ng/mL - 1 cápsula 50.000UI de vit D₃ por

semana por quatro semanas, seguida de 1 cápsula por mais cinco meses; 16 – 29 ng/mL – 1 cápsula de 50.000 UI de vit D₃ por mês por seis meses.

As cápsulas de vitamina D foram dispensadas por farmácia de manipulação de Londrina, em frascos plásticos com identificação do paciente, do medicamento e da data de validade. O princípio ativo foi originário da Hisound Chem, China, de lote número M080703C. As cápsulas foram fornecidas em quantidade suficiente para os seis meses do estudo, de acordo com o nível sérico inicial e as datas programadas para a ingestão da vitamina foram anotadas em agenda própria e no dia estipulado foram realizados ligações telefônicas, para confirmar ou lembrar o uso da vitamina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (n. 086/10 de 08/07/2010) (Anexo A). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

4.2 Avaliação antropométrica e de pressão arterial

No dia da consulta os pacientes foram avaliados quanto ao peso (quilogramas - Kg), altura (centímetros – cm) para o cálculo do índice de massa corpóreo (IMC – Kg/m²) e a medida de pressão arterial (mmHg), pelo método auscultatório com o uso de esfigmomanômetro aneróide.

4.3 Coleta de amostras biológicas

As amostras de sangue dos pacientes, aproximadamente 40 mL, foram obtidas por punção venosa, em tubos a vácuo (Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ, USA), após 12 horas de jejum para a obtenção do plasma ou soro conforme a necessidade do exame. Os exames de rotina foram realizados logo após a coleta do sangue no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina.

As amostras de soro destinadas aos testes de estresse oxidativo foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) (2100xg) durante 15 minutos em centrífuga (CELM[®], Barueri, SP, Brasil), e os soros obtidos foram armazenados em freezer (Indrel[®] 70 R Londrina, Paraná, Brasil) a -80°C até a realização das análises, que foi realizada no Laboratório de Pós-graduação do Hospital Universitário de Londrina.

Para a determinação da relação proteinúria/creatinúria (mg de proteína dividida por g de creatinina) foram utilizadas amostras isoladas de urina coletadas no período da manhã.

4.4 Parâmetros bioquímicos e marcadores inflamatórios

As análises sanguíneas de glicose, creatinina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e proteínas totais foram efetuadas em um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring[®], Deerfield, IL, USA), utilizando-se kits Dade Behring[®]. A quantificação plasmática do PTH intacto (PTHi) e a homocisteína foram realizadas por imunoenensaio de micropartículas por quimiluminescência (Architect[®] System, Abbott, Wiesbaden, Germany). O ácido úrico sérico foi quantificado pelo método enzimático da uricase. A determinação da proteína C reativa ultrassensível foi efetuada por nefelometria (Behring Nephelometer II, Dade Behring[®], Marburg, Germany), o fibrinogênio pelo método de Klauss (Destiny Plus[®], Tcoag, Wicklow, Ireland) e a hemoglobina foi determinada pelo hemograma automatizado (ADVIA-120[®], Siemens HealthCare, Erlanger, Germany).

Para a dosagem da vitamina D, as amostras de plasma foram protegidas da luz encapadas com papel alumínio e encaminhadas para o Laboratório Álvaro na cidade de Cascavel, Paraná, onde a 25(OH)vitD foi dosada por Quimiluminescência (QL) e a 1,25(OH)₂vitD por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A relação proteinúria/creatinúria foi analisada em uma amostra isolada de urina, onde a proteína foi doseada pelo método cinético do vermelho de pirogalol e a creatinina pelo método de Jaffé, ambos em um auto-analisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring[®], Deerfield, IL, USA), utilizando-se kits Dade Behring[®].

Pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), foram determinados níveis séricos de FGF-23 (Millpore[®], Park Drive, Missouri, USA) e de IL-6 (eBioscience[®], Science Center, California, USA).

4.5 Avaliação do Estresse Oxidativo

4.5.1 Capacidade antioxidante total plasmática avaliada pela *TRAP (Total Peroxyl Radical-trapping Antioxidant Potential Parameter)*

A TRAP foi avaliada por quimiluminescência (QL) em uma adaptação da técnica descrita por Repetto et al. (133). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Ao meio da reação são acrescentados 2,2-azobis e luminol. Os radicais livres liberados pelo 2,2-azobis provocam oxidação de lipídios e proteínas. O luminol reage com esses radicais livres produzindo QL. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (Ti) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP) até que os radicais de luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema é calibrado com análogos da vitamina E (Trolox). Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permitem obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ de Trolox, e os valores obtidos foram divididos pelo valor do ácido úrico plasmático de cada paciente para corrigir a influência do ácido úrico elevado sobre o TRAP. O experimento foi conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando um modelo de contagem não coincidente por 30 segundos, com uma faixa de resposta entre 300 e 620 nM e o TRAP utilizando o cintilador Beckman® (Fullerton, CA, EUA) modelo LS 6000.

4.5.2 Determinação dos metabólitos do NO

A estimativa do NO foi avaliada através da determinação da concentração de metabólitos do NO sérico. Utilizou-se uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzálves et al. (134) para microplacas. O princípio da técnica está baseado na redução dos íons nitratos em íons nitrito, os quais são quantificados ao formar um complexo colorido com o reagente de Griess. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ utilizado espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nanômetros (nm).

4.5.3 Quantificação de Produtos Avançados da Oxidação de Proteínas (AOPP)

Para quantificação dos AOPP no plasma foi utilizada uma adaptação da técnica descrita por Witko-Sarsat et al. (135). A técnica é baseada na formação de produtos de oxidação de proteínas por ação de agentes oxidantes e posterior reação destes produtos de oxidação com o iodeto de potássio em meio ácido. Os AOPP foram quantificados no soro e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro termostaticado de duplo feixe (Thermo Spectronic[®] modelo Hélios- α , Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ e foram corrigidos pelos triglicerídeos, pela interferência que estes causam na dosagem de AOPP em pacientes com DRC (136).

4.5.4 Quimiluminescência Induzida por t-Butil Hidroperóxidos

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha et al. (137). A QL estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesas antioxidantes não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no soro. Este teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E e formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento da emissão de fótons (18 - 20). Foi utilizado um contador β marca Beckman[®] (EUA) modelo LS 6000 contendo um modelo de contagem não coincidente por 30 segundos, com uma faixa de resposta entre 300 e 620 nM. As análises foram efetuadas em frascos de plástico para a cintilação e protegidos da luz. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm).

4.6 Análise estatística

Avaliação da distribuição normal dos dados foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas foram expressas pela mediana e quartis ou média e desvio padrão e apresentadas em tabelas. Para comparação das variáveis contínuas foi

utilizado o teste de Mann-Whitney ou de Wilcoxon ou ANOVA, quando apropriado. Para comparação das variáveis categóricas foi utilizado o teste qui quadrado. O software utilizado para as análises foi o SPSS Statistic® versão 20 (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Dos 206 pacientes que iniciaram o projeto tinham a mediana de idade de 68 (61-77) anos, a maioria eram homens: 120 (67,8%) e a prevalência geral de hipovitaminose D foi de 54%. Cento e setenta e sete pacientes completaram o estudo. Durante o período de pesquisa, três pessoas morreram e apenas 1 de causa cardiovascular (infarto agudo do miocárdio) e sete pacientes do grupo com deficiência de vitamina D necessitaram iniciar terapia renal substitutiva (figura 1).

A tabela 2 mostra os dados demográficos, epidemiológicos e clínicos dos pacientes, divididos em grupo que recebeu e que não recebeu tratamento com colecalciferol. Não houve diferença quanto à idade, sexo, raça ou IMC entre os dois grupos no início do estudo. Também não houve diferença no uso de estatinas, IECA/BRA e eritropoetina entre os grupos, assim como não houve diferença quanto ao tabagismo atual e a presença de doenças cardiovasculares prévias. O grupo com hipovitaminose D apresentava pressão arterial sistólica e diastólica maior em comparação ao grupo com vitamina D normal ($P = 0,013$ e $P = 0,046$ respectivamente).

A prevalência da doença de base, responsável pela DRC foram a nefropatia hipertensiva: 108 pacientes (61%); nefropatia diabética: 51 pacientes (28,8%); glomerulonefrite crônica: 10 pacientes (5,6%); doença renal policística do adulto: 6 pacientes (3,4%) e outras doenças: 2 pacientes (1,2%) e não apresentavam diferenças entre os dois grupos (tabela 3).

A tabela 4 apresenta e compara alguns parâmetros bioquímicos dos grupos com deficiência e suficiência de vitamina D em seus valores iniciais e após seis meses de seguimento. A maioria dos pacientes (137; 77%) apresentava DRC estágio III, enquanto 40 pacientes (23%) apresentavam DRC estágio IV. O grupo com deficiência de vitamina D apresentava menores valores de hemoglobina ($P = 0,026$) e maior proteinúria ($P = 0,001$). A creatinina sérica era maior, portanto, a TFGe era menor no grupo de hipovitaminose D ($P < 0,001$); a albumina, o ácido úrico e a glicemia não apresentavam diferenças significativamente estatística. Com o tratamento, houve estabilidade na TFGe no grupo tratado ($P = 0,056$) e queda no grupo controle ($P = 0,032$), mas mantendo-se a diferença significativa nas TFGs entre os grupos observada no início do estudo ($P = 0,001$). Não houve alteração na

proteinúria em ambos os grupos após 6 meses de seguimento, permanecendo a diferença entre os dois grupos já identificada nos exames iniciais ($P < 0,001$).

A tabela 5 mostra que os níveis séricos basais tanto de 25(OH)vitD como de 1,25(OH)₂vitD eram significativamente menores no grupo que recebeu o tratamento comparado ao grupo não tratado ($P < 0,001$ em ambas as comparações), sendo que todos os pacientes neste estudo tinham níveis séricos de 1,25(OH)₂vitD dentro dos valores de referência (18 – 78 pg/mL). O grupo com hipovitaminose D apresentavam ainda maiores valores de fósforo e PTH ($P = 0,001$ e $P < 0,001$, respectivamente) e sem diferenças em níveis séricos de cálcio, fosfatase alcalina e FGF-23. Após a reposição com colecalciferol, houve um expressivo aumento tanto em 25(OH)vitD ($P = 0,001$) quanto da 1,25(OH)₂vit D ($P < 0,001$) no grupo tratado. O grupo suficiente em vitamina D em seu nível inicial, mostrou queda na dosagem sérica de 25(OH)vitD ($P = 0,026$), mas não de 1,25(OH)₂vitD após os seis meses de seguimento. Também houve aumento na calcemia ($P < 0,001$), queda na fosfatemia ($P < 0,001$) e no PTH ($P = 0,003$) no grupo tratado, enquanto que nos pacientes sem reposição os valores permaneceram estáveis. O FGF-23 apresentou elevação no grupo tratado com colecalciferol por seis meses ($P = 0,003$) e nesse momento houve diferença significativa entre os dois grupos ($P = 0,003$).

Dos 96 pacientes que receberam suplementação com colecalciferol, 72 pacientes (75%) tiveram os seus níveis de 25(OH)vitD elevados para dentro de valores de referência. Dos 24 indivíduos restantes, 14 (58,2%) apresentaram elevação de pelo menos 25% nos seus níveis basais de 25(OH)vitD.

A tabela 6 apresenta os marcadores de inflamação e de estresse oxidativo avaliados no presente estudo com comparação entre os grupos tratados ou não com colecalciferol, antes e depois de 6 meses de avaliação. Nenhum dos marcadores de inflamação, fibrinogênio, PCR, homocisteína e IL-6 apresentaram diferenças significativas nos exames iniciais e após seis meses, com e sem tratamento com colecalciferol. Os marcadores de estresse oxidativo – TRAP corrigido pelo ácido úrico, NOx, AOPP corrigido pelos triglicerídeos e LOOH também não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos em seus valores iniciais.

Quando se avaliou os indivíduos que normalizaram ou não o nível sérico de 25(OH)vitD após receberam colecalciferol oral por seis meses, observou-se que não houve diferenças entre os grupos quanto à idade, sexo, raça, IMC, pressão arterial sistólica ou diastólica, tabagismo, doença cardiovascular prévia, uso de estatinas,

IECA/BRA ou de eritropoetina (Tabela 7). Em seus valores iniciais, apenas a proteinúria era maior no grupo que não normalizou a 25(OH)vitD. Após a suplementação de colecalciferol houve queda na albumina sérica ($P = 0,01$) e na TFGe ($P = 0,035$) apenas no grupo em que a 25(OH)vitD atingiu valor ≥ 30 ng/mL (tabela 8).

A tabela 9 mostra as comparações de marcadores do metabolismo ósseo nos grupos que receberam suplementação de colecalciferol e que normalizaram ou não o nível sérico de 25(OH)vitD, sendo nenhum parâmetro inicial foi diferente entre os grupos. Após a reposição da vitamina D houve melhora de dosagem de 25(OH)vitD em ambos os grupos ($P < 0,001$) e apenas nos pacientes em que a 25(OH)vitD normalizou-se pela suplementação houve elevação significativa de $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}$. Após a suplementação houve elevação na calcemia ($P < 0,001$) e no FGF-23 ($P = 0,002$) e queda no PTH ($P = 0,010$) no grupo que normalizou a vitamina D e no outro grupo houve apenas queda no fósforo sérico ($P = 0,002$).

Na tabela 10 são apresentados os valores dos biomarcadores de inflamação e de estresse oxidativo nos grupos que receberam vitamina D e que normalizaram ou não seus valores séricos após 6 meses de suplementação de colecalciferol. Não havia qualquer diferença entre os grupos nos exames iniciais, mas, após a suplementação de colecalciferol, o grupo que normalizou a 25(OH)vitD apresentou aumento nos níveis de NOx ($P = 0,028$) e nos níveis de AOPP corrigido pelos triglicerídeos ($P = 0,04$) e queda nos valores de LOOH ($P = 0,032$).

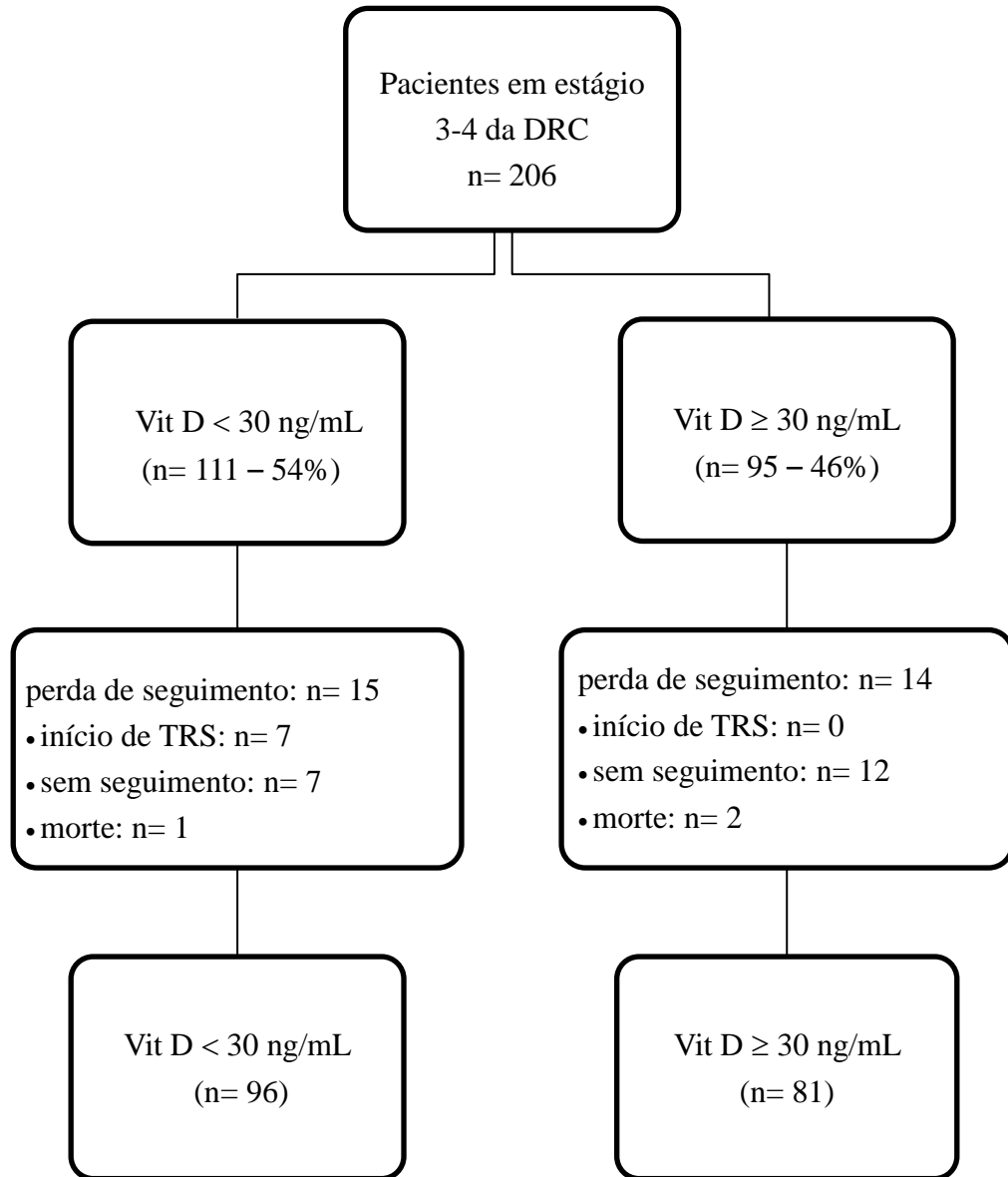


Figura 1 - Fluxograma de recrutamento e seguimento dos pacientes do estudo

Abreviaturas: DRC: doença renal crônica; Vit D: 25(OH)vitD; TRS: terapia renal substitutiva

Tabela 2 - Características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com DRC não dialíticos tratados e não tratados com colecalciferol

Comparação das características basais				
Variável		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	<i>P</i>
Idade (anos)		67,66 (62–77)	66,25 (58–76)	1,00
Sexo	Masculino	60 (62,5%)	60 (74,1%)	0,101
Raça	Caucasiana	83 (86,5%)	71 (87,7%)	0,814
IMC (Kg/m ²)		27,73 (24,99–31,9)	27,1 (23,82–31,51)	0,308
PA (mmHg)	Sistólica	130 (120–150)	130 (120–140)	0,013§
	Diastólica	80 (80–90)	80 (70–85)	0,046§
Tabagismo atual		9 (9,4%)	7 (8,6%)	0,865
DCV		36 (37,5%)	30 (37%)	0,949
Estatina		70 (72,9%)	56 (69,1%)	0,580
IECA/BRA		34 (35,4%)	34 (44,4%)	0,221
Epo		2 (2,1%)	2 (2,5%)	0,863

Valores em mediana (intervalos interquartis), §: teste de Mann-Whitney

Abreviaturas: Vit D: 25(OH)vit D, IMC: índice de massa corpórea; PA: pressão arterial; DCV: doença cardiovascular; IECA/BRA: inibidor da enzima conversora de angiotensina/bloqueador de receptor tipo 1 de angiotensina II; Epo: eritropoietina;

Tabela 3 - Doença de base dos pacientes com DRC não dialíticos tratados e não tratados com colecalciferol

Doença de base	Grupos		P
	Vit D < 30ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30ng/mL (n=81)	
Hipertensão arterial	58 (60,4%)	51 (62,9%)	0,729
Diabetes melito	30 (31,2%)	20 (24,7%)	0,334
Glomerulonefrite crônica	5 (5,2%)	5 (6,2%)	0,781
Doença policística do adulto	3 (3,2%)	3 (3,7%)	0,832
Outros	0	2 (2,5%)	

Frequências absolutas e relativas

Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, Vit D: 25(OH)vit D

Tabela 4 - Efeito do tratamento com colecalciferol sobre alguns parâmetros laboratoriais dos pacientes com DRC não dialítica

Variável		Grupos		P
		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL(n=81)	
Hemoglobina (g/dL)	basal	13,50 (12,45–14,75)	13,90 (13,15–15,20)	0,026§
	6 meses	13,35 (12,6–15,07) P=0,523	14,20 (13,25–15,35) P=0,006†	0,013§
Creatinina sérica (mg/dL)	basal	1,83 (1,60–2,34)	1,65 (1,42–1,93)	0,002§
	6 meses	1,89 (1,53–2,58) P=0,066	1,66 (1,38–2,05) P=0,009†	0,011§
TFGe (mL/min/1,73m ²)	basal	33 (26,26–41)	41 (33–49)	<0,001§
	6 meses	32 (23,50–39,50) P: 0,056	39 (30–47) P: 0,032†	0,001§
Albumina (g/dL)	basal	4,03 (3,81–4,27)	4,08 (3,87–4,34)	0,297
	6 meses	3,95 (3,79–4,18) P=0,002†	4 (3,80–4,33) P=0,197	0,150
Glicose (mg/dL)	basal	101,50 (92–119,25)	104 (94–116,50)	0,598
	6 meses	99,50 (91–125,75) P=0,918	100 (91,50–116) P=0,370	0,723
Ácido úrico (mg/dL)	basal	6,77 (5,64–7,95)	6,86 (5,91–7,91)	0,379
	6 meses	7,22 (5,65–8,12) P=0,358	6,70 (5,80–7,76) P=0,275	0,451
Razão Prot-creat (mg/g)	basal	0,31 (0,14–0,86)	0,15 (0,08–0,39)	0,001§
	6 meses	0,33 (0,14–0,80) P=0,993	0,15 (0,08–0,36) P=0,636	<0,001§

Valores em mediana (intervalos interquartis); †: teste de Wilcoxon; §: teste de Mann-Withney
 Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; Razão proteína/creatinina urinários

Tabela 5 - Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais do metabolismo mineral e ósseo dos pacientes com DRC não dialítica

Variável		Grupos		P
		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	
25(OH)vitD (ng/mL)	basal	20,20 (15,62–25,60)	38,40 (33,40–46,55)	<0,001§
	6 meses	36,65 (29,72–42,70) P=0,001†	35,90 (28,95–45,40) P=0,026†	0,774
1,25(OH)vitD (pg/mL)	basal	23,50 (21,52–26,55)	30,90 (27,75–37,65)	<0,001§
	6 meses	33,05 (27,27–39,37) P=<0,001†	33,35 (25,92–42,17) P=0,475	0,857
Cálcio (mg/dL)	basal	8,51 (8,09–8,81)	8,60 (8,16–8,89)	0,242
	6 meses	8,78 (8,47–9,11) P=<0,001†	8,67 (8,36–9,03) P=0,064	0,223
Fósforo (mg/dL)	basal	3,80 (3,30–4,19)	3,30 (3,04–3,82)	0,001§
	6 meses	3,46 (3,14–4,14) P=<0,001†	3,45 (2,93– 3,99) P=0,703	0,205
PTH (pg/mL)	basal	140,40 (99,27–195,07)	98,90 (73,35–147)	<0,001§
	6 meses	126,35 (83,82–185,15) P=0,003†	108,70 (70,65–145,75) P=0,638	0,029§
Fosfatase alcalina (U/L)	basal	97,50 (77–121,50)	91 (75–105)	0,173
	6 meses	95 (77–119) P=0,667	91 (75–114,30) P=0,148	0,586
FGF-23 (pg/mL)	basal	22,15 (8,62–35,88)	16,30 (10,05–38,18)	0,524
	6 meses	25,90 (14,25–46,82) P=0,003†	15,20 (3,28–34,6) P=0,850	0,003§

Valores em mediana (intervalos interquartis); †: teste de Wilcoxon; §: teste de Mann-Whitney
 Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, 25(OH)vitD: 25-hidroxivitamina D; 1,25(OH)vitD: 1,25 dihidroxivitamina D₃; PTH: paratormônio; FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto-23

Tabela 6 - Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais de inflamação e de estresse oxidativo dos pacientes com DRC não dialítica

Variável		Grupos		P
		Vit D < 30 ng/mL (n: 96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n: 81)	
Fibrinogênio (mg/dL)	basal	389,50 (349,25–460,75)	388 (336,50–432,50)	0,225
	6meses	405 (358–449) P=0,696	396 (337,25–446) P=0,701	0,236
Proteína C-reativa (mg/L)	basal	3,09 (1,19–6,52)	2,62 (1,35–6,65)	0,893
	6meses	1,91 (1,05–5,66) P=0,186	2,69 (1,18–8,07) P=0,936	0,334
Homocisteína (μmol/L)	basal	23,35 (18,68–29,96)	21,62 (17,46–25,85)	0,152
	6meses	21,25 (17,33–26,31) P=0,121	20,04 (17,39–25,18) P=0,629	0,563
Interleucina-6 (pg/mL)	basal	2,49 (1,22–4,96)	2,82 (1,20–5,38)	0,780
	6meses	2,62 (1,61–3,96) P=0,097	2,77 (1,30–6,76) P=0,881	0,395
TRAP/AU (μmol de Trolox /mg/dL)	basal	133,13 (111,02–155,66)	131,29 (114,3–152,4)	0,742
	6meses	127 (112,55–152,48) P=0,651	133,13 (114,36–152,51) P=0,499	0,470
NOx (μmol/L)	basal	6,92 (5,01–9,53)	6,88 (4,73–10,35)	0,752
	6meses	7,46 (5–11,17) P=0,059	6,66 (5,05–9,23) P=0,781	0,393
AOPP/TG (μmol/L/mg/dL)	basal	0,73 (0,56–0,99)	0,82 (0,63–1,01)	0,180
	6meses	0,78 (0,66–1,07) P=0,555	0,78 (0,58–0,99) P=0,554	0,546
LOOH (cpm)	basal	35187 (23652–54717)	36736 (24326–55070)	0,604
	6meses	30390 (20413–46545) P=0,051	34648 (25532–48652) P=0,120	0,067

Valores em mediana (intervalos interquartis);

Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, TRAP/AU: relação entre Capacidade Antioxidante Total

Plasmática e ácido úrico; NOx: metabólitos do óxido nítrico; AOPP: relação entre os Produtos

Avançados da Oxidação Proteica e triglicerídeos; LOOH: Hidroperóxido Lipídico; CPM: contagem por minuto

Tabela 7 - Características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos pacientes com DRC não dialíticos tratados com colecalciferol e que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30ng/mL

Comparação das características basais				
Variável		Vit D < 30 ng/mL (n=24)	Vit D \geq 30 ng/mL (n=72)	<i>P</i>
Idade (anos)		65 (59,25–74,75)	70 (63,25–78)	0,098
Sexo	Masculino	15 (62,5%)	45 (62,5%)	1,00
Raça	Caucasiano	22 (91,7%)	61 (84,7%)	0,389
IMC (Kg/m ²)		26,55 (24,71-32,96)	27,92 (25,52-31,54)	0,706
PA (mmHg)	Sistólica	130 (128,75-150)	130 (120-140)	0,316
	Diastólica	80 (73,75-90)	80 (70-90)	0,823
Tabagismo atual	Sim	4 (16,7%)	5 (6,9%)	0,157
DCV	Sim	10 (41,7%)	26 (36,1%)	0,626
Estatina	Sim	13 (54,2%)	57 (79,2%)	0,017 [†]
IECA/BRA	Sim	10 (41,7%)	24 (33,3%)	0,460
Epo	Sim	1 (4,2%)	1 (1,4%)	0,409

Valores em mediana (intervalos interquartis); [†]: teste qui quadrado

Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, IMC: índice de massa corpórea; PA: pressão arterial; IMC: índice de massa corpórea; DCV: doença cardiovascular; IECA/BRA: inibidor da enzima conversora de angiotensina/bloqueador de receptor tipo 1 de angiotensina II; Epo: eritropoetina.

Tabela 8 - Efeito do tratamento com colecalciferol sobre alguns parâmetros laboratoriais dos pacientes com DRC não dialítica que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30ng/mL

Variável		Grupos		P
		Vit D < 30 ng/mL (n=24)	Vit D \geq 30 ng/mL (n=72)	
Hemoglobina (g/dL)	basal	13,45 (12,35–14,60)	13,50 (12,42–14,80)	0,879
	6 meses	13,40 (12,50–15,07) <i>P</i> =0,715	13,30 (12,70–15,07) <i>P</i> =0,582	0,936
Creatinina sérica (mg/dL)	basal	1,79 (1,57–2,41)	1,89 (1,61–2,34)	0,545
	6 meses	1,82 (1,56–2,72) <i>P</i> =0,939	1,92 (1,50–2,58) <i>P</i> =0,039†	0,512
TFGe (mL/min/1,73m ²)	basal	32,50 (27,25–44,25)	33 (26–40,50)	0,688
	6 meses	35,50 (23,25–40) <i>P</i> : 0,930	31,50 (23,25–39) <i>P</i> : 0,035†	0,472
Albumina (g/dL)	basal	3,96 (3,65–4,15)	4,09 (3,86–4,28)	0,075
	6 meses	3,98 (3,77–4,22) <i>P</i> =0,626	3,94 (3,79–4,18) <i>P</i> =0,001†	0,886
Glicose (mg/dL)	basal	106 (99,25–137,50)	100,5 (91–113,50)	0,098
	6 meses	103,50 (88–149,75) <i>P</i> =0,361	99 (91,25–122,50) <i>P</i> =0,584	0,574
Ácido úrico (mg/dL)	basal	6,73 (5,20–7,72)	6,81 (5,71–7,97)	0,501
	6 meses	7,09 (5,14–7,79) <i>P</i> =0,616	7,23 (5,72–8,36) <i>P</i> =0,422	0,441

Valores em mediana (intervalos interquartis); †: teste de Wilcoxon; §: teste de Mann-Whitney
 Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; Razão proteína/creatinina urinários

Tabela 9 - Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais do metabolismo mineral e ósseo dos pacientes com DRC não dialítica que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30ng/mL

Variável		Grupos		P
		Vit D < 30 ng/mL (n=24)	Vit D \geq 30 ng/mL (n=72)	
25(OH)vitD (ng/mL)	basal	19,15 (15,37–22,60)	21,20 (15,90–26)	0,226
	6 meses	26,45 (22,12–28,92) <i>P</i> =<0,001†	40,75 (35,70–45,45) <i>P</i> =<0,001†	<0,001§
1,25(OH)vitD (pg/mL)	basal	23,60 (21,75–27,40)	23,30 (21,35–26,25)	0,648
	6 meses	24,25 (22,05–27,30) <i>P</i> =0,447	35,20 (30,72–40,57) <i>P</i> =<0,001†	<0,001§
Cálcio (mg/dL)	basal	8,59 (8,09–8,71)	8,50 (8,09–8,71)	0,220
	6 meses	8,76 (8,34–9,17) <i>P</i> =0,563	8,78 (8,52–9,11) <i>P</i> =<0,001†	0,909
Fósforo (mg/dL)	basal	3,60 (3,26–4,22)	3,82 (3,30–4,19)	0,548
	6 meses	3,32 (3–3,70) <i>P</i> =0,002†	3,57 (3,20–4,20) <i>P</i> =0,379	0,031§
PTH (pg/mL)	basal	141,50 (101,55–173,47)	140,15 (97,65–207,05)	0,562
	6 meses	126,35 (85–182,60) <i>P</i> =0,191	126,20 (83,82–191,97) <i>P</i> =0,010†	0,588
Fosfatase alcalina (U/L)	basal	104 (70–117)	95,50 (77,25–122)	0,973
	6 meses	96 (68–120) <i>P</i> =0,424	94,50 (77,25–119) <i>P</i> =0,961	0,784
FGF-23 (pg/mL)	basal	24,51 (16,69–31,27)	20,50 (8–36,17)	0,576
	6 meses	22,90 (13,40–43) <i>P</i> =0,543	27,90 (14,50–49) <i>P</i> =0,002†	0,610

Valores em mediana (intervalos interquartis); †: teste de Wilcoxon; §: teste de Mann-Whitney
 Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, 25(OH)vitD: 25-hidroxivitamina D; 1,25(OH)vitD: 1,25 dihidroxivitamina D₃; PTH: paratormônio; FGF-23: fator de crescimento de fibroblasto-23

Tabela 10 - Efeito do tratamento com colecalciferol sobre parâmetros laboratoriais de inflamação e de estresse oxidativo dos pacientes com DRC não dialítica e que atingiram ou não valores de 25(OH) vitamina D \geq 30 ng/mL

Variável		Grupos		P
		Vit D < 30 ng/mL (n=24)	Vit D \geq 30 ng/mL (n=72)	
Fibrinogênio (mg/dL)	basal	380 (342,25–439)	403 (342,25–477,75)	0,488
	6meses	413,50 (355,75–442,75) <i>P</i> =0,681	398 (361–453) <i>P</i> =0,536	0,908
Proteína C- reativa (mg/L)	basal	1,69 (0,89–4,90)	3,45 (1,37–6,71)	0,117
	6meses	1,73 (0,80–4,69) <i>P</i> =0,795	2,09 (1,13–5,78) <i>P</i> =0,223	0,194
Homocisteína (μ mol/L)	basal	23,10 (19,94–29,26)	23,58 (18,34–31,17)	0,872
	6meses	22,44 (17,37–29,24) <i>P</i> =0,879	20,64 (17,33–25,67) <i>P</i> =0,062	0,416
Interleucina-6 (pg/mL)	basal	3,16 (1,92–6,07)	2,35 (1,14–4,94)	0,278
	6meses	2,25 (1,35–3,67) <i>P</i> =0,137	2,70 (1,80–4,45) <i>P</i> =0,325	0,320
TRAP/AU (μ mol de Trolox /mg/dL)	basal	135,69 (113,16–164,36)	131,76 (110,78–152,77)	0,407
	6meses	133,71 (111,20–160,99) <i>P</i> =0,954	122,83 (112,82–149,07) <i>P</i> =0,521	0,493
NOx (μ mol/L)	basal	6,92 (5,42–9,92)	6,89 (4,82–9,36)	0,337
	6meses	7,48 (5,50–10,98) <i>P</i> =0,989	7,46 (4,92–11,50) <i>P</i> =0,028†	0,801
AOPP/TG (μ mol/L/mg/dL)	basal	0,60 (0,54–0,81)	0,80 (0,58–1,09)	0,04 §
	6meses	0,69 (0,61–0,92) <i>P</i> =0,317	0,79 (0,67–1,14) <i>P</i> =0,925	0,115

LOOH	basal	36166 (24382,75–55711,50)	34042 (23338–54247,25)	0,816
(cpm)	6meses	27037,50 (22654–31261)	32766,50 (19320–49185)	0,227
		$P=0,032$ †	$P=0,272$	

Valores em mediana (intervalos interquartis); †: teste de Wilcoxon; §: teste de Mann-Whitney
 Abreviaturas: DRC: doença renal crônica, TRAP/AU: relação entre Capacidade Antioxidante Total Plasmática e ácido úrico; NOx: metabólitos do óxido nítrico; AOPP/TG: relação entre os Produtos Avançados da Oxidação Proteica e triglicerídeos; LOOH: Hidroperóxido Lipídico; CPM: contagem por minuto.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Não foram encontradas associações entre os níveis plasmáticos de 25(OH)vitD e os biomarcadores de inflamação e de estresse oxidativo avaliados neste estudo, em pacientes com DRC estágios 3 e 4
 - Não se observou efeito da suplementação de colecalciferol sobre marcadores de inflamação e de estresse oxidativo em pacientes com DRC estágios 3 e 4 com insuficiência e deficiência desta vitamina
 - A suplementação com colecalciferol por seis meses e o uso concomitante de ISRA foi efetiva em retardar a queda na TFGe
 - A prevalência de deficiência de 25(OH)vitD foi de 54%
 - O protocolo utilizado foi eficiente em atingir valores recomendados em 75% dos pacientes
 - Estudos com maior tempo de acompanhamento e com maior número de pacientes são necessários para confirmar estes resultados

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim como em outros, o presente estudo não demonstrou melhora em alguns marcadores de inflamação e de estresse oxidativo após a suplementação de colecalciferol oral em pacientes com DRC em estágios 3 e 4. Outros benefícios da vitamina D são esperados, pois grandes estudos populacionais sugerem que a terapia com vitamina D fornece benefícios na sobrevida dos pacientes com DRC dialítica ou não. A monitorização do nível sérico desta vitamina é recomendada para este grupo de pacientes e sua reposição é fácil, segura e adequada para restabelecer níveis séricos atualmente recomendados. A suplementação de vitamina D concomitante ao uso de ISRA em pacientes com doença renal crônica não dialítica pode representar uma estratégia em retardar a evolução DRC.

Estudos randomizados, com maior tempo de acompanhamento e com maior número de pacientes são necessários para confirmar estes resultados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 2073-2081.
- 2 Go AS, Chertow GM, FanD, et al. McCulloch C E, Hsu C. Chronic kidney disease and risks of death: cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296-1305.
- 3 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3: 1-150.
- 4 Levey AS, Juan BP, Lewis JB, et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Annals of Intern Med* 1999; 130(6): 461-470.
- 5 Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GL. MDRD Study Group. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine (abstract) *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 155A.
- 6 Swaminathan S, Shah SV. Novel Inflammatory mechanisms of accelerated atherosclerosis in kidney disease. *Kidney Int* 2011; 80: 453-463.
- 7 Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, et al. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med.* 2004; 164: 659-663.
- 8 Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association councils on kidney in cardiovascular disease, high blood pressure research, clinical cardiology and epidemiology and prevention. *Circulation* 2003; 108: 2154-2169.
- 9 Del Vecchio L, Locatteli F, Carini M. What we know about oxidative stress in patients with chronic kidney disease on dialysis - clinical effects, potential treatment, and prevention. *Seminars in Dialysis* 2011; 24(1): 56-64.
- 10 Cachofeiro V, Goicochea M, Vinuesa SG, et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2008; 74(suppl111): 54-59.
- 11 Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2): 115-126.
- 12 Shindler R. Causes and therapy of microinflammation in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(suppl5):34-40.

- 13 Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
- 14 Locatelli F, Canaud B, Eckardt K, et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1272-1280.
- 15 Annuk M, Zilmer M, Lind L, et al. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2747-2752.
- 16 Hasuike Y, Nonoguchi H, Ito K, et al. Interleukin-6 is predictor of mortality in stable hemodialysis patients. *Am J Nephrol* 2009; 30: 389-398.
- 17 Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, et al. Plasma interleukin-6 independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010; 77: 550-556.
- 18 Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, et al. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2011; 34: 12-19.
- 19 Shlipak MG, Fried LF, Crump C, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003; 107: 87-92.
- 20 Oberg BP, McMEnamin E, Lucas FL, et al. Increase prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 65: 1009-1016.
- 21 Montesa MJP, Rico MAG, Salguero MAS, et al. Study of oxidative stress in advanced kidney disease. *Nefrología* 2009; 29(5): 464-473.
- 22 Young JM, Terrin N, Wang X, et al. Asymmetric dimethylarginine and mortality in stages 3 to 4 chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1115-1120.
- 23 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-281.
- 24 Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, et al. Vitamin D deficiency: an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(24): 1949-1956.
- 25 Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011; 86(1): 50-60.
- 26 Rosen CJ. Vitamin D Insufficiency. *N Engl J Med* 2011; 364: 248-254.
- 27 Kimball S, Fuleihan GE, Vieth R. Vitamin D: A growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4): 339-414.

- 28 Inda Filho AJ, Melamed ML. Vitamina D e doença renal. O que nós sabemos e o que nós não sabemos. *J Bras Nefrol* 2013; 35(4): 323-331.
- 29 Mac Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1998; 13: 954-959.
- 30 LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in United States. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 1026-1033.
- 31 Levin A, Bakris GL, Molitch M, 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: 31-38.
- 32 Mehrotra R, Kermah D, Budoff M, et al. Hypovitaminosis D in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1144-1151.
- 33 Cuppari L, Carvalho AB, Draibe SA. Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country. *J Ren Nutr* 2008; 18(5): 408-414.
- 34 Ravani P, Malberti F, Tripepi G, et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 88-95.
- 35 Holden RM, Morton AR, Garland JS, et al. Vitamins K and D status in stages 3-5 chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 590-597.
- 36 Figueiredo-Dias V, Cuppari L, Garcia-Lopes M G, et al. Risk factors for hypovitaminosis D in nondialyzed chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr* 2012; 22(1): 4-11.
- 37 Echida Y, Mochizuki T, Uchida K, et al. Risk factors for vitamin D deficiency in patients with chronic kidney disease. *Intern Med* 2012; 51: 845-850.
- 38 Damasiewicz M, Magliano D J, Daly R M, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and chronic kidney disease in the AusDiab (Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle) study. *BMC Nephrology* 2012; 13: 55.
- 39 Ngai M, Lin V, Wong H C, et al. Vitamin D status and its association with mineral and bone disorder in a multi-ethnic chronic kidney disease population. *Clinical Nephrol* 2014; 4: 231-239.
- 40 Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens* 2007; 20: 713-719.
- 41 Forman JP, Williams JS, Fisher ND. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Regulation of the Renin-Angiotensin System in Humans. *Hypertension* 2010; 55: 1283-1288.

- 42 Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation* 2008; 117: 1-9
- 43 Inaguma D, Nagaya H, Hara K, et al. Relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D and mortality in patients with pre-dialysis chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2008; 12: 126-131.
- 44 Mehrotra R, Kermah DA, Salusky IB, et al. Chronic kidney disease, hypovitaminosis D, and mortality in the United States. *Kidney Int* 2009; 76: 977-983.
- 45 Chonchol M, Cigolini M, Targher G. Association between 25-hydroxyvitamin D deficiency and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients with mild kidney dysfunction. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 269-274
- 46 Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; 72: 1004-1013.
- 47 Dobnig H, Pilz S, Scharnagl H, et al. Independent association of low serum 25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008; 168(12): 1340-1349.
- 48 Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW, Rimm EB. 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men. *Arch Intern Med* 2008; 168(11): 1174-1180.
- 49 Ginde AA, Scragg R, Schwartz RS, Camargo CA. Prospective study of serum 25-hydroxyvitamin D level, cardiovascular disease mortality, and all-cause mortality in older U.S. adults. *J Am Geriatric Soc* 2009; 57: 1595-1603.
- 50 Hutchinson MS, Grimnes G, Joakimsen RM, et al. Low serum 25-hydroxyvitamin D levels are associated with increased all-cause mortality risk in a general population: the Tromsø study. *Eur J Endocrinol* 2010; 162: 935-942.
- 51 Vacek JL, Vanga SR, Good M, et al. Vitamin D deficiency and supplementation and relation to cardiovascular health. *Am J Cardiol* 2012; 109(3): 359-363.
- 52 Ureña-Torres P, Metzger M, Haymann JP, et al. Association of kidney function, vitamin D deficiency, and circulating markers of mineral and bone disorders in CKD. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(4): 544-553.
- 53 Figueiredo-Dias V, Cuppari L, Garcia-Lopes MG, et al. Risk factors for hypovitaminosis D in nondialyzed chronic kidney disease patients. *J Renal Nutr* 2012; 1: 4-11.
- 54 Hoefield RA, Kalra PA, Baker P, et al. Factors associated with kidney disease progression and mortality in a referred CKD population. *Am J Kidney Dis* 2010; 56: 1072-1081.

- 55 Damasiewicz MJ, Magliano DJ, Daly RM, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D deficiency and the 5-year incidence of CKD. *Am J Kidney Dis* 2013; 62(1): 58-66.
- 56 Barreto VD, Barreto FC, Liabeuf S, et al. Vitamin D affects survival independently of vascular calcification in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1128-1135.
- 57 Pilz S, Iodice S, Zittermann A, et al. Vitamin D status and mortality risk in CKD: a meta-analysis of prospective studies. *Am J Kidney Dis* 2011; 58 (3): 374-382.
- 58 Navaneethan SD, Schold JD, Arrigain S, et al. Low 25-Hydroxyvitamin D levels and mortality in non-dialysis-dependent CKD. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(4): 536-543.
- 59 Kramer H, Sempos C, Cao G, et al. Mortality rates across 25-Hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels among adults with and without estimated glomerular filtration rate <60ml/min/1.73m²: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *PlosOne* 2012; 7(10): e47458
- 60 Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, et al. Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3603-3609.
- 61 Wolf M, Gutierrez O, Ankers E, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; 72: 1004-1013.
- 62 Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011; 79: 1331-1340.
- 63 van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011; 79: 1341-1352.
- 64 Hallan, SL, Matsushita K, Sang Y, et al. Age and Association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease. *JAMA* 2012; 308(22): 2349-2360.
- 65 Gansevoort RT, Matsushita K, van der Velde M, et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011; 80: 93-104.
- 66 Li YC. Vitamin D in chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013; 180: 98-109.

- 67 Oliveira RB, Moysés RMA. FGF-23: stat of the art. *J Bras Nefrol* 2010; 32(3): 316-323.
- 68 Burgess WB, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 575-606.
- 69 Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Com* 2000; 277: 494-498.
- 70 Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Target ablation of FGF23 demonstrates on essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004; 113(4): 561-568.
- 71 Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013; 180: 47-63.
- 72 Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008; 359: 584-592.
- 73 Sakan H, Nakatani K, Asai O, et al. Reduced renal α -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PlosOne* 2014; 9(1): e86301.
- 74 Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 in elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2011; 79: 1370-1378.
- 75 Isakova T, Xie H, Yang W, et al. Fibroblast Growth Factor 23 and risks of mortality and-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA* 2011; 304(23): 2432-2439.
- 76 Mendoza JM, Isakova T, Ricardo AC, et al. Fibroblast growth factor 23 and inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 1155-1162.
- 77 Bucharles S, Barberato SH, Stinghen AE, et al. Hypovitaminosis D is associated with systemic inflammation and concentric myocardial geometric pattern in hemodialysis patients with low iPTH levels. *Nephron Clin Pract* 2011; 118: c384-c391.
- 78 Isakova T, Gutiérrez OM, Patel NM, et al. Vitamin D deficiency, inflammation, and albuminuria in chronic kidney disease: complex interactions. *J Renal Nutr* 2011; 21: 295-302.
- 79 Autier P, Gandini S. Vitamin D supplementation and total mortality. *Arch Intern Med* 2007; 167(16): 1730-1737.

- 80 Zittermann A, Iodice S, Pilz S, et al. 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.
- 81 Duranton F, Rodriguez-Ortiz ME, Duny Y, et al. Vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Nephrol* 2013; 37: 239-248.
- 82 Zheng Z, Shi H, Jia J, et al. Vitamin D supplementation and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of 20 observational studies. *BMC Nephrology* 2013; 14: 199.
- 83 Chandra P, Binongo JNG, Ziegler TR, et al. Cholecalciferol (vitamin D₃) therapy and vitamin D insufficiency in patients with chronic kidney disease: a randomized controlled pilot study. *Endocr Pract* 2008; 14(1): 10-17.
- 84 Kandula P, Dobre M, Schold J D, et al. Vitamin D supplementation in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 50-62.
- 85 Garcia-Lopes MG, Pillar R, Kamimura MA, et al. Cholecalciferol supplementation in chronic kidney disease: restoration of vitamin D status and impact on parathyroid hormone. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 74-82.
- 86 Cheng J, Zhang W, Zhang X, et al. Efficacy and safety of paricalcitol therapy for chronic kidney disease: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 391-400.
- 87 Mariani LH, White MT, Shults J, et al. Increasing use of vitamin D supplementation in the chronic renal insufficiency cohort study. *J Renal Nutr* 2014; 24(3): 186-193.
- 88 Kim SM, Choi HJ, Lee JP, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and effects of supplementation with cholecalciferol in patients with chronic kidney disease. *J Renal Nutr* 2014 24(1): 20-25.
- 89 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: 249-255.
- 90 Lishmanov A, Dorairajan S, Pak Y, et al. Treatment of 25-OH Vitamin D deficiency in older men with chronic kidney disease stages 3 and 4 is associated with reduction in cardiovascular events. *Am J Therap* 2013; 20: 480-486.
- 91 Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson J, Kalantar-Zadeh K. Association of activated vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease. *Arch Intern Med* 2008; 168(4): 397-403.

- 92 Shah N, Bernardini J, Piraino B. Prevalence and correction of 25(OH) vitamin D deficiency in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2005; 25: 362-366.
- 93 Melamed ML, Eustace JA, Plantinga L, et al. Changes in sérum calcium, phosphate, and PTH and the risk of death in incident dialysis patients: a longitudinal study. *Kidney Int* 2006; 70: 351-357.
- 94 Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, et al. D. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 353-361.
- 95 Wu CC, Chang JH, Chen CC, et al. Calcitriol treatment attenuates inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Tohoku J Exp Med* 2011; 223(3): 153-159.
- 96 Bucharles S, Barberato SH, Stinghen AEM, et al. Impact of cholecalciferol treatment on biomarkers of inflammation and myocardial structure in hemodialysis patients without hyperparathyroidism. *J Renal Nutr* 2012; 22(2): 284-291.
- 97 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: 1543-1551.
- 98 Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, et al. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- β 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int* 2011; 80: 851-860.
- 99 Agarwal R, Acharaya M, Tian J, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 2823-2828.
- 100 Jørgensen HS, Winther S, Povlsen JV, Ivarsen P. Effect of vitamin-D analogue on albuminuria in patients with non-dialysed chronic kidney disease stage 4-5: a retrospective single center study. *BMC Nephrology* 2012; 13: 102.
- 101 de Borst MH, Hajhosseiny R, Tamez H, et al. Active Vitamin D treatment for reduction of residual proteinuria: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 1863-1871.
- 102 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.
- 103 Marchmann P, Agerskov H, Thinessskumar S, et al. Randomized controlled trial of cholecalciferol supplementation in chronic kidney disease with hypovitaminosis D. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 3523-3531.

- 104 Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, et al. Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Therap Apher Dial* 2011; 15(2): 161-168.
- 105 Melamed ML, Astor B, Michos ED, et al. 25-hydroxyvitamin D levels, race, and the progression of kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2631-2639.
- 106 Inker LA, Coresh J, Levey AS, et al. Estimated GFR, albuminuria, and complications of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 2322-2331.
- 107 Fernández-Juárez G, Luño J, Barrio V, et al. 25(OH) Vitamin D levels and renal disease progression in patients with type 2 diabetic nephropathy and blockade of the renin-angiotensin system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 1870-1876.
- 108 Weis L, Metzger M, Haymann J P, et al. Renal function can improve at any stage of chronic kidney disease. *PlosOne* 2013; 8(12): e81835.
- 109 Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Nat Aca Sci USA (PNAS)* 2008; 105(41): 15896-15901.
- 110 Li YC, Kong J, Wei M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002; 110: 229-238.
- 111 Agarwal R. Vitamin D, proteinuria, diabetic nephropathy, and progression of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1523-1528.
- 112 Zhang Y, Kong J, Deb DK, et al. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppression the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 966-973.
- 113 Li, YC. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int* 2010; 78: 134-139.
- 114 Johnson DW, Atai M, Chan M, et al. KHA-CARI Guideline: Early chronic kidney disease: detection, prevention and management. *Nephrology* 2013; 18: 340-350.
- 115 James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults. Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311(5): 507-520.
- 116 Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3382-3393.

- 117 Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008; 74: 1394-1402.
- 118 Zhang Y, Deb DK, Kong J, et al. Long-term therapeutic effect of vitamin D analog doxercalciferol on diabetic nephropathy: strong synergism with AT1 receptor antagonist. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F791-F801.
- 119 Deb DK, Sun T, Wong KE, et al. Combined vitamin D analog and AT1 receptor antagonist synergistically block the development of kidney disease in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int* 2010; 77: 1000-1009.
- 120 Ohara I, Tanimoto M, Gohda T, et al. Effect combination therapy with angiotensin receptor blocker and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in type 2 diabetic nephropathy in KK-A^Y/Ta mice. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 117: e124-e132.
- 121 Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a Vitamin D analog suppress the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1796-1806.
- 122 Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2009; 76: 1248-1257.
- 123 Yusuf S, Teo KK, Pogue J, et al. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. *N Engl J Med* 2008; 358: 1547-1559.
- 124 Mann JFE, Schmieder R, McQueen M, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Lancet* 2008; 372: 547-553.
- 125 Tobe SW, Clase CM, Gao P, et al. Cardiovascular and renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both in people at high renal risk: results from the ONTARGET and TRANSCEND studies. *Circulation* 2011; 123: 1098-1107.
- 126 Fried LF, Emanuele N, Zhang JH, et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 2013; 369: 1892-1903.
- 127 Hsu TW, Liu JS, Hung SC, et al. Renoprotective effect of renin-angiotensin-aldosterone system blockade in patients with predialysis advanced chronic kidney disease, hypertension, and anemia. *JAMA* 2014; 174(3): 347-354.
- 128 De Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, et al. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. *Kidney Int* 2004; 65: 2309-2320.
- 129 Hou FF, Xie D, Zhang X, et al. Renoprotection of optimal antiproteinuric doses (ROAD) study: a randomized controlled study of benazepril and losartan in chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1889-1898.

- 130 Haller H, Ito S, Izzo JL, et al. Olmesartan for the delay or prevention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2011; 364: 907-917.
- 131 Lee H, Kwon YE, Park JT, et al. The effect of renin-angiotensin system blockade on renal protection in chronic kidney disease patient with hyperkalemia. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014; Aug: 1-7.
- 132 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guidelines for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009; 76(suppl113): S1-S130.
- 133 Reppeto M, Reides C, Carretero MLG, et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta* 1996; 255: 107-117.
- 134 Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44(3): 679-681.
- 135 Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa T N, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
- 136 Anderstam B, Ann-Christin BH, Valli A, et al. Modification of the oxidative stress biomarker AOPP assay: Application in uremic samples. *Clinica Chimica Acta* 2008; 393: 114-118.
- 137 Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated hemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biology & Med* 1991; 10: 93-100.

ARTIGOS

ARTIGO 1

Effect of vitamin D supplementation on oxidative stress and inflammation status in pre-dialysis chronic kidney disease patients.

ARTIGO 2

Addition of Vitamin D reverses the decline in GFR following treatment with ACE Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers in patients with Chronic Kidney Disease

ARTIGO 1

**Effect of vitamin D supplementation on
oxidative stress and inflammation status in
pre-dialysis chronic kidney disease patients.**

Title: Effect of vitamin D supplementation on oxidative stress and inflammation status in pre-dialysis chronic kidney disease patients.

Authors: Abel Esteves Soares M.Sc.¹, Vinicius Daher Alvares Delfino Ph.D¹, Paula Godeny M.Sc.², Décio Sabattini Barbosa Ph.D.³, Edson Lopes Lavado Ph.D.⁴, Taysa Antonia F. da Silva M.D.⁵, Flávio Henrique M. O. Souza M.D.⁵, Michael Maes Ph.D.^{6,7,8}

1. Nephrology Section, Department of Internal Medicine, State University of Londrina, Londrina, Brazil
2. Department of Biochemistry and Pathology, Pitágoras Faculty, Londrina, Brazil
3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, State University of Londrina, Londrina, Brazil
4. Department of Physiotherapy, State University of Londrina, Londrina, Brazil
5. Medical Doctor, University Hospital, State University of Londrina, Brazil
6. IMPACT Research Center, Deakin University, Geelong, Australia
7. Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
8. Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Brazil

Corresponding Author: Dr Abel Esteves Soares, Instituto do Rim de Londrina, Rua Engenheiro Omar Rupp, número 100, 86.015-360, Jardim Londrilar, Londrina, Brazil. [email: abelsoares@uol.com.br](mailto:abelsoares@uol.com.br), Phone/FAX 55 43 33769100; cell phone: 55 43 91618730

Running Headline: Vitamin D, oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease patients.

Authors Contributions:

Abel Esteves Soares: Conceived and designed the work, acquired data, played an important role in interpreting the results, drafted and revised the manuscript and approved its final version.

Vinicius Daher Alvares Delfino: Conceived and designed the work, played an important role in interpreting the results, drafted and revised the manuscript and approved its final version.

Paula Godeny: Designed the work, acquire data, revised the manuscript and approved its final version.

Décio Sabattini Barbosa: Designed the work, played an important role in interpreting the results, revised the manuscript and approved its final version.

Edson Lopes Lavado: designed the work, played an important role in interpreting the results, revised the manuscript and approved its final version.

Taysa Antonia F. da Silva: Designed the work, played an important role in interpreting the results, revised the manuscript and approved its final version.

Flávio Henrique M. O. Souza: Designed the work, played an important role in interpreting the results, revised the manuscript and approved its final version.

Michael Maes: Designed the work, played an important role in interpreting the results, revised the manuscript and approved its final version.

ABSTRACT

Chronic kidney disease patients have high cardiovascular mortality. Increased inflammation and oxidative stress are present in such patients and have been linked to this high cardiovascular morbidity. Vitamin D has anti-inflammatory actions and its D deficiency is highly prevalent among chronic kidney disease patients, administration of vitamin D deficient chronic kidney disease to the patients may improve inflammation and oxidative stress. Controlled study conducted at the chronic kidney disease clinics of the State University of Londrina and Kidney Institute of Londrina, Brazil, from October 2010 to December 2012. Inclusion criteria were age greater than 18 years, and chronic kidney disease stages 3 to 4 and exclusion were conditions known to interfere with vitamin D metabolism. Hypovitaminosis D was defined by 25-hydroxyvitamin D serum levels < 30 ng/dL. Cholecalciferol was supplemented orally with capsules of 50,000 UI for six months with periodicity dictated by baseline 25-hydroxyvitamin D levels. Fibrinogen, C-reactive protein, interleukin-6, plasma antioxidant capacity, nitric oxide byproducts, advanced oxidation protein products, and lipid hydroperoxides are used. At baseline, no difference was observed in the biomarkers between groups with and without hypovitaminosis D. Six month treatment with cholecalciferol did not significantly change the inflammatory/oxidative stress biomarkers. Vitamin D deficiency is not associated with inflammation or increased oxidative stress.

Key words: Vitamin D. Chronic kidney disease. Inflammation. Oxidative stress.

INTRODUCTION

Oxidative stress and inflammation are common features of chronic kidney disease (CKD) and major mediators of many of its complications, such as, atherosclerosis and cardiovascular disease, anemia, cachexia, and accelerate aging, besides playing a critical part in progression of CKD (1-4). As recently summarized by Vaziri ND, oxidative stress and inflammation are inseparably linked (5). Increased oxidative stress activates the transcription of nuclear factor Kappa B (NF- κ B) leading to induction of synthesis of pro-inflammatory cytokines and chemokines with subsequent activation and recruitment of immune cells. Inflammation, in turn, initiates and amplifies oxidative stress via production of reactive oxygen, nitrogen and halogen species by activated immune cells. Several factors, such as mitochondrial dysfunction, comorbid conditions, activation of tissue angiotensin system, hypervolemia, hypertension, dyslipidemia, retained uremic toxins and metabolites, reduced expression of antioxidant and cytoprotective enzymes and substrates caused by impairment of nuclear factor-erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) pathway, and changes in the composition of the gut micro biome and disruption of its barrier structure/function allowing absorption of noxious byproducts play a major role in pathogenesis of CKD-associated oxidative stress and inflammation (2,5,6).

In CKD, vitamin D (vit D) status is usually impaired with levels decreasing in relation to worsening of kidney function (7). Vit D has anti-inflammatory and antioxidant actions (8-10), and its supplementation has been shown to reduce the magnitude of inflammation in asymptomatic subjects (11), patients with prediabetes (12), adults with pulmonary exacerbation of cystic fibrosis (13), and pregnant women (14), for example. Only a few studies reported the effect of vit D supplementation on inflammatory parameters of non-dialysis CKD (15,16), and to the best of our knowledge there are no studies in this patient population regarding the effects of vit D supplementation on oxidative stress.

The aim of this study was to verify the effects of vit D supplementation on oxidative stress and inflammation biomarkers in stage 3 and 4 CKD patients with deficiency of this vitamin.

RESULTS

The prevalence of vit D deficiency was 54%. Of the 206 patients who started the project, 177 completed the study. The most common underlying diseases were hypertensive nephropathy: 108 patients (61%); diabetic nephropathy: 51 (28.8%); chronic glomerulonephritis: 10 (5.6%); adult polycystic kidney disease: 6 (3.4%) and others: 2 (1.2%), and the distribution of the underlying disease was similar between groups with and without vit D deficiency. Most patients (137; 77%) had CKD stage 3, while 40 patients (23%) had CKD stage 4. During the study period, three people died (only 1 from cardiovascular causes - myocardial infarction-) and seven patients in the vit D - deficient group required starting renal replacement therapy (Figure 1).

Table 1 shows the demographic, epidemiological and clinical data of the patients divided into groups who received and did not receive treatment with cholecalciferol. There was no difference in age, sex, race or body mass index (BMI) between the two groups at baseline. There was no difference in the use of statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) or angiotensin II type 1 receptor blockers (ARB) and erythropoietin between groups, and no difference in current smoking and the presence of previous cardiovascular disease. The group with 25-hydroxyvitamin D (25(OH)vitD) deficiency had higher systolic blood pressure and diastolic compared to those with normal vitamin D ($P = 0.013$ and $P = 0.046$ respectively)

Table 2 presents and compares some biochemical parameters in groups with hypovitaminosis D and vit D sufficiency in their initial values and after six months of follow-

up. The vit D-deficient group had lower hemoglobin levels ($P = 0.026$) and greater proteinuria ($P = 0.001$). Serum creatinine was greater and estimated glomerular filtration rate (eGFR) was lower in vit-D deficient group ($P < 0.001$); albumin, uric acid and glucose showed no differences. With treatment, there was stability in eGFR in the treated group ($P = 0.056$) and decreased in the control group ($P = 0.032$), while maintaining the significant difference between groups noticed at baseline ($P = 0.001$). There was no change in proteinuria in both groups after 6 months of follow up, remaining the difference between the two groups already identified in the initial tests ($P < 0.001$).

Table 3 shows the effect of cholecalciferol treatment on some laboratory parameters of mineral and bone disorders of patients treated and not treated with vit D. At baseline, basal serum levels of both the 25(OH)vitD and 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25OH₂vitD) were significantly lower in the group that received treatment compared to the untreated group ($P < 0.001$ for both comparisons), the group vit D deficiency had higher values of parathyroid hormone (PTH) and phosphorus ($P = 0.001$ and $P < 0.001$, respectively) and no differences in serum levels of calcium, alkaline phosphatase and fibroblast growth factor-23 (FGF-23) were present between groups. After the replacement of cholecalciferol, there was a significant improvement both in 25(OH)vitD ($P = 0.001$) and 1.25(OH)vit₂D in treated group ($P < 0.001$), with no significant changes between the two groups after six months.

Of the 96 patients given oral supplementation with cholecalciferol, 72 patients (75%) had increase in their levels of vit D into reference values. In the remaining 24 subjects, 14 (58.2%) showed an increase of at least 25% in baseline levels of vitamin D. The vit D-deficient group presented decrease in its initial level of serum 25(OH)vitD ($P = 0.026$) but not in its 1.25(OH)₂vitD after six months of follow up. Also there was an increase in calcium levels ($P < 0.001$), decreased in phosphatemia ($P < 0.001$) and PTH ($P = 0.003$) in the treated group whereas in patients without vitamin D replacement values remained stable. The FGF-23

levels showed an increase in the group treated with cholecalciferol for six months ($P = 0.003$) and at that time there was a significant difference between the two groups ($P = 0.003$).

Table 4 shows markers of inflammation and oxidative stress used in the present study. None of the markers of inflammation, fibrinogen, C-reactive protein (CRP), homocysteine and interleukin-6 (IL-6) showed significant differences on the initial tests and after six months, with or without treatment with vit D. The oxidative stress markers plasma antioxidant capacity (TRAP) corrected by uric acid, nitric oxide metabolites (NOx), lipid hydroperoxides (LOOH) and advanced oxidation protein products (AOPP) corrected by triglycerides also showed no significant differences between the two groups in their initial values. After six month vit D supplementation there was a significant increase in serum AOPP levels ($P= 0.046$)

DISCUSSION

In the present study, a very high prevalence of vit D deficiency was observed. From a sample of 206 stages 3 and 4 CKD patients, 111 (54%) had vitamin deficiency as defined for the study ($25(\text{OH})\text{vitD} < 30 \text{ ng/mL}$) at baseline. At baseline, patients in the group with vit D deficiency had significantly lower levels of $25(\text{OH})\text{D}$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, hemoglobin, and eTFG and presented higher levels of creatinine, blood pressure, protein/urinary creatinine ratio, phosphorus and PTH, denoting that the group with vit D deficiency had clinical and metabolic parameters of more advanced chronic kidney disease. There was no significant difference between biomarkers of inflammation and oxidative stress used in the study between groups. Ninety six out of the 111 patients (86.5%) with vit D deficiency completed six months cholecalciferol supplementation. This treatment increased calcium, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, FGF-23 levels, and reduced phosphorus levels, but did not improve inflammation and oxidative stress in non-dialysis patients. These findings were also observed in the subgroup of

patients (72 patients; 75% of sample) who achieved vit D sufficiency (25(OH)vit D \geq 30 ng/mL) at the study end.

Vit D has antioxidant and anti inflammatory actions. For instance, vit D was shown experimentally to activate the Nrf-2-Keap 1 pathway (8), to inhibit monocyte/macrophage pro inflammatory cytokine production (9), and to decrease NF κ B activation (10). Regarding the effects of vit D supplementation to non-dialysis CKD patients on inflammatory markers, two studies randomized controlled trials are available. Similarly to our findings, Kovesdy et al. using ergocalciferol (to achieve 25(OH)vit D levels \geq 30 ng/mL) for 16 weeks to 40 CKD stages 3 and 4 patients found no reduction on CRP levels (15). Marckmann et al. also did not find reduction in CRP and IL6 levels with supplementation of 40,000 UI/week cholecalciferol supplementation, for 8 weeks, in 13 non-dialysis patients (16). Besides our study, we are unaware of studies evaluating the effects of vit D supplementation on oxidative stress of pre-dialysis CKD patients.

Some points may help to explain our results. First, as the genesis of inflammation and oxidative stress in CKD people is certainly multifactorial, it could be that, in the studied patients, vit D deficiency did not play an important role in the generation of inflammation and oxidative stress. This is corroborated by our findings that there are not significant differences in inflammatory and oxidative stress biomarkers between patients with low and higher vit D levels at baseline. A second point that should be taken into consideration is that it is not clear which 25(OH)vitD levels should be considered adequate for CKD patients, being the suggestion that reference levels used for general population to be applied to CKD patients (20).

In people with normal renal function, cholecalciferol and ergocalciferol supplementation result in rapid conversion to 25(OH)vitD and, subsequently, to 1,25(OH)₂vitD, the active form of vit D. It should be considered that 25(OH)vitD also binds

to and activates vit D receptor (VDR), but with 1/100 affinity of that 1,25(OH)₂D (21), and maybe activates the expression of different genes than the ones activated by 1,25(OH)₂D (22). The synthesis of 1,25(OH)vit₂D from 25(OH)vitD takes place mainly in the kidneys and diminishes progressively as CKD progress (23). Furthermore, several mechanisms downstream from 1,25(OH)₂vitD result in impairment of 1,25(OH)₂vitD action in CKD patients, including reduced levels of retinoid X receptor (RXR) and inhibition (proportional to the accumulation of uremic toxins in the plasma) of binding of VDR/RXR to vit D response elements (VDRE) in vit D-regulated genes. (24) Indeed, it has been suggested that serum 1,25(OH)₂D should be measured, in addition to 25(OH)D levels, for the assessing vit D status in CKD patients (21). Even this approach has limitations as the VDR gene polymorphism influences the biological actions of 1,25(OH)₂vitD (25)

Interestingly, cholecalciferol supplementation to hemodialysis (HD) patients (whom present a much higher degree of renal dysfunction than the patients studied here) has been shown to improve inflammation and oxidative status in some (26-28), but not all studies (29). Direct comparisons between our results and the results observed in HD patients are difficult due to differences in therapeutic regimens of vit D used, differences between study populations, and treatment of CKD by HD in the latter group.

In conclusion, although our study has limitations, such as the preponderance of white men, the non-randomized nature of the study, and the use of a relatively small panel of biomarkers of inflammation and oxidative stress, we could demonstrate that the achievement of normal levels of 25(OH)vitD by six months of cholecalciferol did not improve the inflammatory and oxidative stress status of vit D deficient CKD patients. The observed increase in FGF-23 levels in the study was expected, as active vit D stimulates the FGF-23 gene promoter (30) and raises FGF-23 levels, without significant differences between specific preparations (31). This increase is a matter of concern, as FGF-23 is and independent

predictor of progression of CKD (32) and a cardiovascular risk marker for CKD patients (33). More randomized clinical trials are needed before cholecalciferol can be recommended with the aim of reducing levels of inflammation and oxidative stress in pre-dialysis CKD patients.

METHODS

Study Protocol

The study was a controlled study conducted at the CKD clinics of the State University of Londrina and Kidney Institute of Londrina, Brazil, from October 2010 to December 2012. Inclusion criteria included age greater than 18 years, and CKD stages 3 to 4, according to National Kidney Foundation (NKF) classification (17). This classification is based upon estimation of glomerular filtration rate (eGFR) from serum creatinine and it defines stages 3 and 4 as follow: stage 3: eGFR 60–30 mL/min/1,73m²; stage 4: eGFR 29-15 mL/min/1,73m². The eGFR was calculated by the 4-variable Modification of Diet in Renal Disease Study equation (18). Exclusion criteria were: age less than 18 years; patients already on dialysis or renal transplant recipients; history of intestinal malabsorption disease, intestinal bypass or bowel resection surgery, presence of liver cirrhosis, infectious disease or active malignancy; unexplained loss of more than 5% of body weight within the last six months; use of steroids orally or via inhalation; use of anticonvulsants drugs or vit D supplementation. This study was approved by the Ethics Committee of the University of Londrina (086-10 – 07/08/2010) and all included patients signed the written informed consent for the study.

Vit D deficiency was defined as serum levels of 25(OH)vitamin D (calcidiol or 25(OH)vitD) < 30 ng/mL. CKD patients with serum 25(OH)vitD < 30 ng/mL received oral supplementation of cholecalciferol (vit D₃) according to *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) 2003 guidelines (19). All vit D₃ utilized in the study contained 50,000 IU. Patients with serum calcidiol < 5 ng/mL recieved 1 capsule of vit D₃ for 12 weeks, followed

by 1 capsule per month for 3 months; patients with serum calcidiol between 5 – 15 ng/mL received 1 capsule of vit D₃ per week for 4 weeks, followed by 1 capsule monthly for 5 months; patients with serum calcidiol between 16 and 30 ng/mL received 1 capsule vit D₃ per month for 6 months.

Two hundred and sixteen patients met the inclusion criteria and 206 started the study (111 with vit D deficiency and 95 with normal levels of vit D). At the beginning of the study, the clinical history was assessed using a structured interview, patients underwent physical examination, and laboratory tests were obtained. At this occasion, data on self-declared ethnicity, current nicotine dependence, previous cardiovascular disease (heart failure, acute myocardial infarction, stroke or peripheral artery disease) and medication use were obtained. The same routine procedures were followed at the end of the study period. One hundred and seventy seven patients completed the six-month follow-up (96 in the group of vit D deficient patients). Figure 1 shows these data in a diagram.

Laboratory Tests

Blood samples for the assay of biochemical parameters were drawn after overnight fasting (12 hours). Serum creatinine, glucose, uric acid, calcium, phosphate, alkaline phosphatase, hemoglobin and albumin were determined by biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits. Intact parathyroid hormone (PTH) and 25(OH)D levels were evaluated by chemiluminescence (Architect System, Abbott, Wiesbaden, Germany) and 1,25(OH)₂vitamin D (1,25(OH)₂D₃) by radioimmunoassay. Urinary protein to creatinine ratio was given as mg of protein/g of creatinine. Uric acid was determined by the enzymatic method of uricase. Homocysteine dosage was done by chemiluminescence (Architect® System, Abbott, Wiesbaden, Germany), the determination of the ultra-sensitive CRP was performed by nephelometry (Behring

Nephelometer II, Dade Behring®, Marburg, Germany), fibrinogen was analyzed by the method of Klauss and hemoglobin was quantified by automated blood count (ADVIA-120®, Siemens HealthCare). The proteinuria was analyzed in a urine sample by the kinetic method of pyrogallol red. FGF-23 and IL-6 levels were determined by ELISA system (FGF-23 - Millipore®, Park Drive, Missouri, USA; IL-6 - eBioscience®, Science Center, California, USA).

The total Peroxyl Radical-trapping Antioxidant Potential (TRAP) levels were evaluated by chemiluminescence. The system was calibrated with analogues of vitamin E (Trolox) and the results were expressed in $\mu\text{mol/L}$ Trolox divided by the value of serum uric acid to correct the influence of elevated uric acid on TRAP. The estimation of NO_x was done by the determination of the concentration of its serum metabolites and the results were expressed in micromol/L. Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) technique was based on the formation of protein oxidation products by the action of oxidizing agents and subsequent reaction of these oxidation products with potassium iodide in acid environment with result expressed in $\mu\text{mol/L}$ and corrected for triglycerides by interference that causes in AOPP in CKD patients; lipid hydroperoxides (LOOH) levels were evaluated by chemiluminescence and results expressed in counts per minute (CPM) .

Statistical Analyses

The evaluation of the normal distribution of data was done by the Shapiro-Wilk test. Continuous variables were expressed as median and quartiles or mean and standard deviation and presented in tables. To compare continuous variables the Mann-Whitney test or Wilcoxon or ANOVA when appropriate were used. To compare categorical variables the chi-square test was used. The software used for analysis was the SPSS Statistic® v.20 (IBM, Armonk, NY, USA).

DISCLOSURE

No interest to disclose.

REFERENCES

1. Cachofeiro V, Goicochea M, Vinuesa SG, et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2008; 74(Suppl111): S54-S59.
2. Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298: F662-F671.
3. Kalantar-Zadeh K. Inflammatory marker mania in chronic kidney disease: Pentraxins at the crossroad of universal soldiers of inflammation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 872-875.
4. Kooman JP, Broers NJH, Usvyat L, et al. Out of control: accelerated aging in uremia. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 48-54.
5. Vaziri ND. CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21(6): 587-592.
6. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, et al. Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 133-141.
7. Slee AD. Exploring metabolic dysfunction in chronic kidney disease. *Nutrition and Metabolism* 2012; 9: 36.
8. Nakai K, Kono FH, Goto S, et al. Vitamin D activates the Nrf2-Keap1 antioxidant pathway and ameliorates nephropathy in diabetic rats. *Am J Hypertens* 2014; 27(4): 586-595.

9. Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* 2012; 188: 2127-2135.
10. Cohen-Lahav M, Shany S, Tobvin D, et al. Vitamin D decreases NF κ B activity by increasing I κ B α levels. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 889-897.
11. Tarcin O, Yavuz D G, Ozben B, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4023-4030.
12. Dutta D, Mondal SA, Choudhuri S et al. Vitamin D supplementation in prediabetes reduced progression to type 2 diabetes and was associated with decreased insulin resistance and systemic inflammation: an open label randomized prospective study from eastern India. *Diabetes Res Clin Pract* 2014; 103(3): e18-23.
13. Grossmann RE, Zughaier SM, Liu S, et al. Impact of vitamin D supplementation on markers of inflammation in adults with cystic fibrosis hospitalized for a pulmonary exacerbation. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(9): 1072-1074.
14. Asemi Z, Samimi M, Tabassi Z, et al. Vitamin D supplementation affects serum high-sensitivity C-reactive protein, insulin resistance, and biomarkers of oxidative stress in pregnant women. *J Nutr* 2013; 143(9): 1432-1438
15. Kovesdy CP, Lu JL, Malakauskas SM, et al. Paricalcitol versus ergocalciferol for secondary hyperparathyroidism in CKD stages 3 and 4: a randomized controlled trial. *Am J Kidney Dis* 2012; 59(1): 58-66.
16. Marckmann P, Agerskov H, Thinesh Kumar S, et al. Randomized controlled trial of cholecalciferol supplementation in chronic kidney disease patients with hypovitaminosis D. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 3523-3531.

17. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(Suppl2): S1-S266.
18. Levey AS, Greene T, Kusek JW et al. MDRD Study Group. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 155A.
19. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(Suppl3): S1-S170.
20. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guidelines for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009; 76(Suppl113): S22-S49.
21. Lips P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements. *J Bone Mineral Res* 2007; 22(11): 1668-1671.
22. Wu-Wong JR, Nakane M, Chen YW, et al. Different effects of calcidiol and calcitriol on regulating vitamin D receptor target gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Dis* 2013; 1(2): 15-20.
23. Al-Badr W, Martin KJ. Vitamin D and kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 1555-1560.
24. Dusso AS. Vitamin D receptor: mechanisms for vitamin D resistance in renal failure. *Kidney Int* 2003; 63(Suppl85): S6-S9.
25. Shab-Bidar S, Neyestani TR, Djazayeri A. Efficacy of vitamin D₃-fortified-yogurt drink on anthropometric, metabolic, inflammatory and oxidative stress biomarkers according to vitamin D receptor gene polymorphisms in type 2 diabetic patients: a

- study protocol for a randomized controlled clinical trial. *BMC Endocrine Disorders* 2011; 11: 12.
26. Stubbs JR, Idicula A, Slusser J, et al. Cholecalciferol supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(2): 353-361.
 27. Matias PJ, Jorge C, Ferreira C, et al. Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 905-911.
 28. Bucharles S, Barberato SH, Stinghen AE, et al. Impact of cholecalciferol treatment on biomarkers of inflammation and myocardial structure in hemodialysis patients without hyperparathyroidism. *J Ren Nutr* 2012; 22(2): 284-291.
 29. Mose FH, Vase H, Larsen T, et al. Cardiovascular effects of cholecalciferol treatment in dialysis patients – a randomized controlled study. *BMC Nephrology* 2014; 15: 50.
 30. Baum M, Schiavi S, Dwarakanath V, et al. Effects of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules. *Kidney Int* 2005; 68: 1148-1153.
 31. Wolf M. Update on fibroblast growth factor 23 in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2012; 82(7): 737-747.
 32. Fliser D, Kolleritz B, Neyer U et al. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) study. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2601-2608.
 33. Heine GH, Seiler S, Fliser D. FGF-23: the rise of a novel cardiovascular risk marker in CKD. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 3072-3081.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the research support given by Araucaria Foundation, the Research Foundation of the Paraná State, Brazil.

FIGURES AND LEGENDS

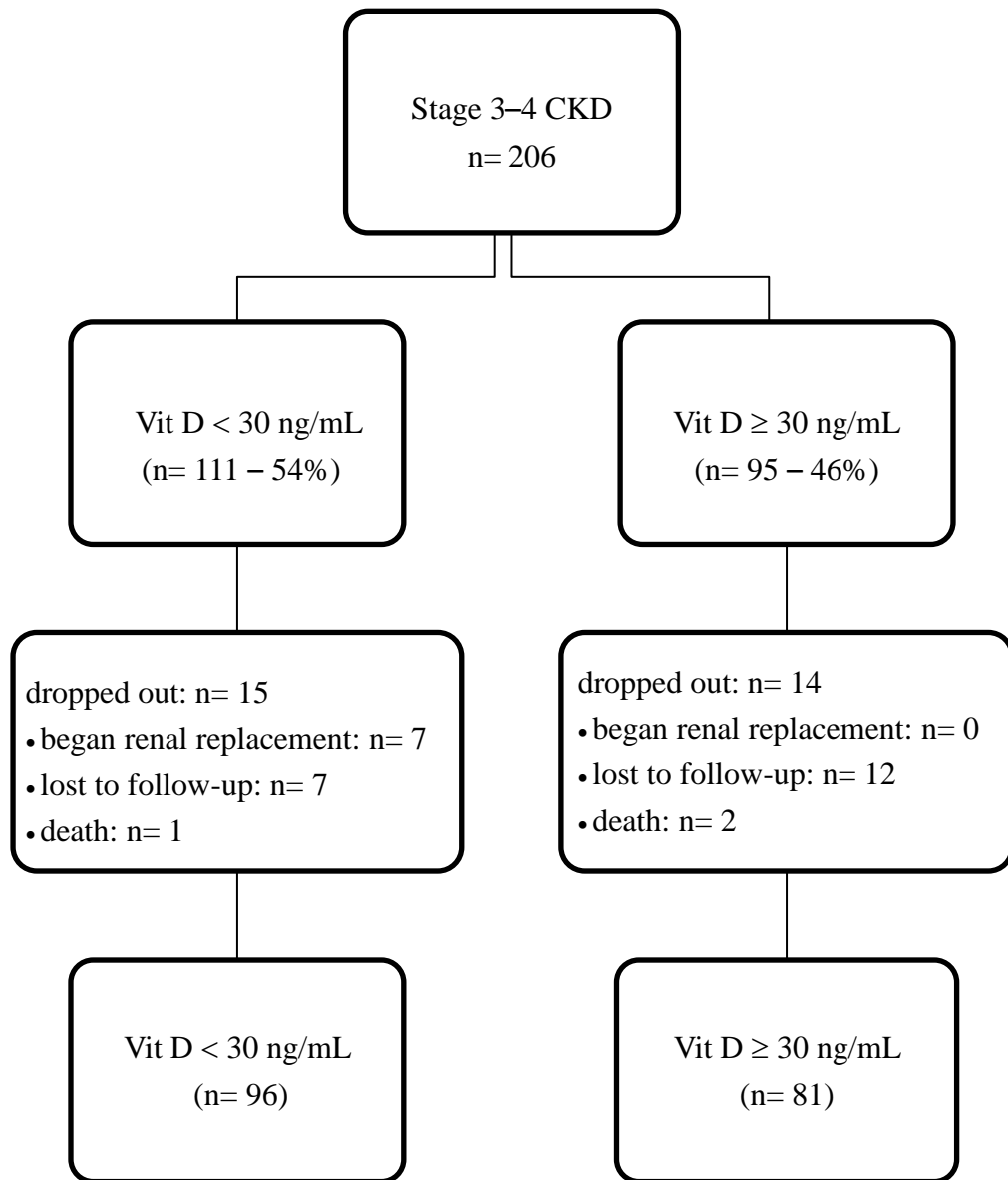


Figure 1

Abbreviations: CKD: chronic kidney disease; Vit D: 25(OH)vitD

Table 1

Comparison of baseline characteristics				
Variable		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	<i>P</i>
Age (years)		67.50 (62–77)	68 (58–76)	1.00
Gender	Male	60 (62.5%)	60 (74.1%)	0.101
Race	Caucasian	83 (86.5%)	71 (87.7%)	0.814
BMI (Kg/m ²)		27.73 (24.99–31.90)	27.1 (23.82–31.51)	0.308
BP (mmHg)	systolic	130 (120–150)	130 (120–140)	0.013§
	diastolic	80 (80–90)	80 (70–85)	0.046§
Current smokers	Yes	9 (9.4%)	7 (8.6%)	0.865
CVD	Yes	36 (37.5%)	30 (37%)	0.949
Current statin	Yes	70 (72.9%)	56 (69.1%)	0.580
Current ACEI/ARB	Yes	34 (35.40%)	36 (44.40%)	0.221
Epo	Yes	2 (2.1%)	2 (2.5%)	0.863

Values are frequencies (%); Values are median (interquartile range); §: Mann-Withney test

Abbreviations: BMI: body mass index; CVD: cardiovascular disease; ACEI/ARB: angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin II type 1 receptor blockers; Epo: erythropoietin; eGFR: estimated glomerular filtration rate

Table 2

Variable		Groups		
		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	<i>P</i>
Hemoglobin (g/dL)	baseline	13.50 (12.45–14.75)	13.90 (13.15–15.20)	0.026§
	endpoint	13.35 (12.60–15.07) <i>P</i> =0.523	14.20 (13.25–15.35) <i>P</i> =0.006†	0.013§
Serum creatinine (mg/dL)	baseline	1.83 (1.60–2.34)	1.65 (1.42–1.93)	0.002§
	endpoint	1.89 (1.53–2.58) <i>P</i> =0.066	1.66 (1.38–2.05) <i>P</i> =0.009†	0.011§
eGRF (mL/min/1.73m ²)	baseline	33 (26.26–41)	41 (33–49)	<0.0001§
	endpoint	32 (23.50–39.50) <i>P</i> : 0.056	39 (30–47) <i>P</i> : 0.032†	0.001§
Albumin (g/dL)	baseline	4.03 (3.81–4.27)	4.08 (3.87–4.34)	0.297
	endpoint	3.95 (3.79–4.18) <i>P</i> =0.002†	4 (3.8–4.33) <i>P</i> =0.197	0.150
Glucose (mg/dL)	baseline	101.50 (92–119.25)	104 (94–116.50)	0.598
	endpoint	99.50 (91–125.75) <i>P</i> =0.918	100 (91.50–116) <i>P</i> =0.370	0.723
Uric acid (mg/dL)	baseline	6.77 (5.64–7.95)	6.86 (5.91–7.91)	0.379
	endpoint	7.22 (5.65–8.12) <i>P</i> =0.358	6,7 (5.80–7.76) <i>P</i> =0.275	0.451
Prot-creat ratio (mg/g)	baseline	0.31 (0.14–0.86)	0.15 (0.08–0.39)	0.001§
	endpoint	0.33 (0.14–0.80) <i>P</i> =0.993	0.15 (0.08–0.36) <i>P</i> =0.636	<0.001§

Values are median (interquartile range); †: Wilcoxon test; §: Mann-Whitney test

Abbreviations: eGRF: estimated glomerular filtration rate; Prot-creat ratio: urinary protein to creatinine ratio

Table 3

Variable		Groups		<i>P</i>
		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	
25(OH)vitD (ng/mL)	baseline	20.20 (15.62–25.60)	38.40 (33.40–46.55)	<0.001§
	endpoint	36.65 (29.72–42.70) <i>P</i> =0.001†	35,9 (28.95–45.40) <i>P</i> =0.026†	0.774
1,25(OH)vitD (pg/mL)	baseline	23.50 (21.52–26.55)	30.90 (27.75–37.65)	<0.001§
	endpoint	33.05 (27.27–39.37) <i>P</i> =<0.001†	33.35 (25.92–42.17) <i>P</i> =0.475	0.857
Calcium (mg/dL)	baseline	8.51 (8.09–8.81)	8.60 (8.16–8.89)	0.242
	endpoint	8.78 (8.47–9.11) <i>P</i> =<0.001†	8.67 (8.36–9.03) <i>P</i> =0.064	0.223
Phosphate (mg/dL)	baseline	3.80 (3.30–4.19)	3.30 (3.04 – 3.82)	0.001§
	endpoint	3.46 (3.14–4.14) <i>P</i> =<0.001†	3.45 (2.93 – 3.99) <i>P</i> =0.703	0.205
PTH (pg/mL)	baseline	140.40 (99.27–195.07)	98.90 (73.35–147)	<0.001§
	endpoint	126.35 (83.82–185.15) <i>P</i> =0.003†	108.70 (70.65–145.75) <i>P</i> =0.638	0.029*
Alkaline phosphatase (U/L)	baseline	97.50 (77–121.50)	91 (75–105)	0.173
	endpoint	95 (77–119) <i>P</i> =0.667	91 (75–114.30) <i>P</i> =0.148	0.586
FGF-23 (pg/mL)	baseline	22.15 (8.62–35.88)	16.30 (10.05–38.18)	0.524
	endpoint	25.90 (14.25–46.82) <i>P</i> =0.003†	15,2 (3.28–34.60) <i>P</i> =0.850	0.003§

Values are median (interquartile range); †: Wilcoxon test; §: Mann-Whitney test

Abbreviations: 25(OH)vitD: 25-hydroxyvitamin D; 1,25(OH)vitD: 1,25 dihydroxyvitamin D; PTH: parathyroid hormone; FGF-23: fibroblast growth factor-23

Table 4

Variable		Groups		<i>P</i>
		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	
Fibrinogen (mg/dL)	baseline	389.50 (349.25–460.75)	388 (336.50–432.50)	0.225
	endpoint	405 (358–449) <i>P</i> =0.696	396 (337.25–446) <i>P</i> =0.701	0.236
C-reactive protein (mg/L)	baseline	3.09 (1.19–6.52)	2.62 (1.35–6.65)	0.893
	endpoint	1.91 (1.05–5.66) <i>P</i> =0.186	2.69 (1.18–8.07) <i>P</i> =0.936	0.334
Homocysteine (μmol/L)	baseline	23.35 (18.68–29.96)	21.62 (17.46–25.85)	0.152
	endpoint	21.25 (17.33–26.31) <i>P</i> =0.121	20.04 (17.39–25.18) <i>P</i> =0.629	0.563
Interleukin-6 (pg/mL)	baseline	2.49 (1.22–4.96)	2.82 (1.20–5.38)	0.780
	endpoint	2.62 (1.61–3.96) <i>P</i> =0.097	2.77 (1.30–6.76) <i>P</i> =0.881	0.395
TRAP/UA (μmol of Trolox/mg/dL)	baseline	133.13 (111.02–155.66)	131.29 (114.30–152.40)	0.742
	endpoint	127 (112.55–152.48) <i>P</i> =0.651	133.13 (114.36–152.51) <i>P</i> =0.499	0.470
Nitric oxide metabolites (μmol/L)	baseline	6.92 (5.01–9.53)	6.88 (4.73–10.35)	0.752
	endpoint	7.46 (5–11.17) <i>P</i> =0.059	6.66 (5.05–9.23) <i>P</i> =0.781	0.393
AOPP/TG (μmol/L/mg/dL)	baseline	0.73 (0.56–0.99)	0.82 (0.63–1.01)	0.180
	endpoint	0.78 (0.66–1.07) <i>P</i> =0.555	0.78 (0.58–0.99) <i>P</i> =0.554	0.546

LOOH	baseline	35187 (23652–54717)	36736 (24326–55070)	0.604
(cpm)	endpoint	30390 (20413–46545)	34648 (25532–48652)	0.067
		<i>P</i> =0.051	<i>P</i> =0.120	

Values are median (interquartile range); †: Wilcoxon test; §: Mann-Whitney test

Abbreviations: TRAP/UA: Total Plasma Antioxidant Potential/Uric acid; AOPP: Advanced Oxidation Protein Products/Triglycerides; LOOH: lipid hydroperoxides; CPM: counts per minute.

TITLES AND LEGENDS

Figure 1 - Flow diagram showing recruitment and follow-up of patients

Table 1 - Demographic, epidemiological and clinical data of the patients with CKD treated and not treated with cholecalciferol

Table 2 - Effect of vitamin D treatment on some laboratory parameters of patients with CKD treated and not treated with cholecalciferol

Table 3 - Effect of vitamin D treatment on some laboratory parameters of mineral and bone disorders of patients with CKD treated and not treated with cholecalciferol

Table 4 - Effect of vitamin D treatment on some laboratory parameters of inflammation and oxidative stress of patients with CKD treated and not treated with cholecalciferol

ARTIGO 2

**Addition of Vitamin D reverses the decline in GFR following treatment
with ACE Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers
in patients with Chronic Kidney Disease**

Title: Addition of vitamin D reverses the decline in GFR following treatment with ACE Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers in patients with Chronic Kidney Disease

Authors: Abel Esteves Soares M.Sc.¹, Vinicius Daher Alvares Delfino Ph.D.¹, Paula Godeny M.Sc.², Décio Sabattini Barbosa Ph.D.³, Taysa Antonia F. da Silva M.D.⁴, Flávio Henrique M. O. Souza M.D.⁴, Michael Maes Ph.D.^{5,6,7}

1. Nephrology Section, Department of Internal Medicine, State University of Londrina, Londrina, Brazil
2. Department of Biochemistry and Pathology, Pitágoras Faculty, Londrina, Brazil
3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, State University of Londrina, Londrina, Brazil
4. Medical Doctor, University Hospital, State University of Londrina, Brazil
5. IMPACT Research Center, Deakin University, Geelong, Australia
6. Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
7. Health Sciences Graduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Brazil

Corresponding Author: Dr Abel Esteves Soares, Instituto do Rim de Londrina, Rua Engenheiro Omar Rupp, número 100, 86.015-360, Jardim Londrilar, Londrina, Brazil. [email: abelsoares@uol.com.br](mailto:abelsoares@uol.com.br), Phone/FAX 55 43 33769100; cell phone: 55 43 91618730

Word count:

- 1. Abstract: 237**
- 2. Body of the manuscript: 2543**

Acknowledgement: We thank the research support given by Araucaria Foundation, the Research Foundation of the Paraná State, Brazil.

Disclosure: All authors declare no conflicts of interest.

ABSTRACT

Addition of Vitamin D reverses the decline in GFR following treatment with ACE Inhibitors/Angiotensin Receptor Blockers in patients with Chronic Kidney Disease

Objective: To study a possible beneficial effect of vitamin D supplementation in chronic kidney disease patients using angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin receptor blockers on chronic kidney disease progression.

Design: Clinical study involving Vitamin D supplementation to chronic kidney disease patients with deficiency of this vitamin.

Setting: Two chronic kidney disease clinics in the city of Londrina, Brazil, from October 2010 to December 2012.

Subjects: Stage 3 and 4 chronic kidney disease (estimated glomerular filtration rate between 60 and 15 mL/min/1.73m²) patients with and without vitamin D deficiency, in regular follow-up in two Brazilian chronic kidney disease clinics.

Intervention: six-month cholecalciferol 50,000IU oral supplementation to chronic kidney disease patients with vitamin D deficiency.

Main outcome measure: changes in estimated glomerular filtration rate over study period.

Results: preservation of estimated glomerular filtration with cholecalciferol supplementation to chronic kidney disease patients taking angiotensin-converting enzyme inhibitors /angiotensin receptor blockers.

Conclusion: The combination treatment of angiotensin-converting enzyme inhibitors / angiotensin receptor blockers with cholecalciferol prevents the decline in estimated glomerular filtration in patients with chronic kidney disease following treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors / angiotensin receptor blockers and may represent a valid approach to try to reduce renal disease progression in chronic kidney disease patients with vitamin D deficiency. This result needs confirmation in prospective controlled clinical trials.

Key words: Vitamin D deficiency. Chronic kidney disease. Renin-angiotensin system. Glomerular filtration rate.

INTRODUCTION

End stage renal disease (ESRD) incidence is increasing worldwide, especially in developing countries, resulting in substantial burden to patients and to health-care systems¹. Effective measures aimed at reducing the progression rate of chronic kidney disease (CKD) are, therefore, necessary and welcome. Reduced glomerular filtration rate (GFR), proteinuria, and hypertension are strongly associated risk factors for CKD progression^{2,3}. Drugs that block the renin-angiotensin system (RAS) are more effective than other classes of antihypertensive drugs for slowing down renal progression⁴, emphasizing the importance of this system in the pathophysiology of the progressive kidney damage seen in CKD.

Vitamin D (vit D) deficiency is very common in general population⁵⁻⁸, even in countries with high insolation like Brazil^{9,10}. Vit D deficiency is additionally more frequent in CKD patients (11-13) where, similarly to findings in the general population, it is associated with increased mortality. International guidelines have suggested to monitor and treat vit D deficiency in CKD patients^{14,15}.

A renoprotective role has been suggested for vit D and its analogs, and it may involve, among other possible mechanisms, anti-inflammatory action, attenuation of interstitial fibrosis, and inhibition of intrarenal RAS¹⁶. Clinical studies have demonstrated the benefit of vit D supplementation in reducing albuminuria in CKD of various etiologies¹⁷, an effect that may be even more intense in patients treated with RAS system blockers. It is therefore plausible that vit D supplementation and concomitant inhibition of the RAS in patients with CKD not yet on dialysis may help to attenuate CKD progression.

The aim of the study is to examine the combined effects of vit D supplementation and RAS blocking on the GFR in vit D deficient CKD patients.

SUBJECTS AND METHODS

Study Protocol

The study was a controlled study conducted at the CKD clinics of the State University of Londrina and Kidney Institute of Londrina, Brazil, from October 2010 to December 2012. Inclusion criteria included age greater than 18 years, and CKD stages 3 to 4, according to National Kidney Foundation (NKF) classification¹⁸. This classification is based upon estimation of glomerular filtration rate (eGFR) from serum creatinine and it defines stages 3 and 4 as follow: stage 3: eGFR 60–30 mL/min/1,73m²; stage 4: eGFR 29–15 mL/min/1,73m². The eGFR was calculated by the 4-variable Modification of Diet in Renal Disease Study equation¹⁹. Exclusion criteria were: age less than 18 years; patients already on dialysis or renal transplant recipients; history of intestinal malabsorption disease, intestinal bypass or bowel resection surgery, presence of liver cirrhosis, infectious disease or active malignancy; unexplained loss of more than 5% of body weight within the last six months; use of steroids orally or via inhalation; use of anticonvulsants drugs or vit D supplementation. This study was approved by the Ethics Committee of the University of Londrina (086-10 – 07/08/2010) and all included patients signed the written informed consent for the study.

Vit D deficiency was defined as serum levels of 25(OH)vitamin D (calcidiol or 25(OH)D) <30 ng/mL. CKD patients with serum calcidiol <30 ng/mL received oral supplementation of cholecalciferol according to *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) 2003 guidelines*²⁰. All cholecalciferol utilized in the study contained 50,000 IU. Patients with serum calcidiol < 5 ng/mL received 1 capsule of vit D₃ for 12 weeks, followed by 1 capsule per month for 3 months; patients with serum calcidiol between 5 – 15 ng/mL received 1 capsule of vit D₃ per week for 4 weeks, followed by 1 capsule monthly for 5

months; patients with serum calcidiol between 16 and 30 ng/mL received 1 capsule vit D₃ per month for 6 months.

Two hundred and sixteen patients met the inclusion criteria and 206 started the study (111 with vit D deficiency and 95 with normal levels of vit D). At the beginning of the study, the clinical history was assessed using a structured interview, patients underwent physical examination, and laboratory tests were obtained. At this occasion, data on self-declared ethnicity, current nicotine dependence and medication use were obtained. The same routine procedures were followed at the end of the study period. One hundred and seventy seven patients completed the six-month follow-up (96 in the group of vit D deficient patients).

Laboratory Tests

Blood samples for the assay of biochemical parameters were drawn after overnight fasting (12 hours). Serum creatinine, glucose and albumin were determined by biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring®, Deerfield, IL, USA), using Dade Behring® kits. 25(OH)vitamin D levels were evaluated by chemiluminescence (Architect®, Abbott, Wiesbaden, Germany) and 1,25(OH)₂vitamin D by radioimmunoassay. Urinary protein to creatinine ratio was given as mg of protein/g of creatinine. These variables were measured before beginning and after supplementation with cholecalciferol.

Statistic

Data management and statistical were performed with SPSS Statistic® 20 (IBM, Armonk, NY, USA). Associations between two categorical systems were checked using analyses of contingency Tables (Chi-square tests) or Fisher's exact probability test. Differences in continuous variables between groups were assessed using analyses of variance (ANOVA). Measurements both before and after treatment with vit D were assessed using

univariate repeated measurement (RM) design general linear model (GLM) analyses, examining time effects, and time X vit D treatment effects. Moreover, we have examined the effects of the three-way interaction time X vit D treatment X Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) / Angiotensin receptor blockers (ARB) treatment on the eGFR values. The Kolmogorov–Smirnov goodness of-fit test was used to assess normality of distribution and the Levene test was used to check heterogeneity of variance. Significance was set at $P = 0.05$ (two tailed).

RESULTS

From the total 206 patients who were recruited to participate in the study, 177 completed the study. Patients' mean age was 67 ± 12.28 years. A hundred and twenty were men (67.8%). Underling nephropathy types were hypertensive nephropathy 108 (61%) diabetic nephropathy 51 (28.8%), glomerulonephritis nephropathy 10 (5.6%), polycystic kidney disease 6 (3.4%) and others 2 (1.2%). Overall, 137 (77%) and 40 (23%) of the patients were classified according to eGFR at CKD stages 3 and 4, respectively. At baseline, deficiency of vit D was present in 111 patients (54%) and all of these individuals were supplemented with vit D₃, as previously described. During the study period, three patients died (only 1 from cardiovascular cause - myocardial infarction); 7 needed to start renal replacement therapy (RRT), all in the vit D supplementation group D.

Table 1 shows the demographic, epidemiological and clinical data of the patients, divided into those who were treated with cholecalciferol versus those who were not treated with cholecalciferol. There were no significant differences in age, gender, BMI and ethnicity between the two groups. The group with hypovitaminosis D presented higher systolic and diastolic blood pressure compared with the normal vit D group. There were no significant

differences in use of statins and ACEI or ARB between both study samples. There were no differences between both groups in number of the individuals with nicotine dependence.

Table 2 shows the results of multivariate RM GLM analysis performed on all variables listed in this table. This analysis showed a significant effect of time ($F=11.90$, $df=7/159$, $P<0.001$), a significant interaction time X treatment ($F=19.33$, $df=7/159$, $P < 0.001$) and a significant between-subject effect for the vit D groups ($F=14.57$, $df=7/159$, $P<0.001$). The significant effects of time showed that eGFR significantly decreased from baseline (estimated mean \pm SE: 38.129 ± 0.832 mL/min/1,73m²) to endpoint (36.129 ± 0.832 mL/min/1,73m²). The interaction time X treatment was not significant. Tests of between-subjects effects showed significant differences between subjects with high baseline vit D versus those a normal vit D in eGFR ($F=13.02$, $df=1/165$, $P<0.001$). Baseline GFRe was lower in the group with hypovitaminosis D than in those with normal vit D levels. We have also examined the effects of the three-way interaction time x treatment x use of ACEI/ARB on eGFR. RM GLM analysis showed that this three-way interaction term was significant ($F=4.54$, $df=1/359$, $P=0.034$). Thus, ACE inhibitors without vit D reduced the eGFR (43.944 ± 1.795 at baseline versus 39.944 ± 2.019 mL/min/1,73m² at endpoint), while combining ACEI or ARB with vit D prevented this decrease in eGFR (38.912 ± 1.847 at baseline versus 38.324 ± 2.078 mL/min/1,73m² at endpoint).

Table 2 shows also the results of the univariate tests following the multivariate within and between-subjects analyses on 25(OH)vitD, 1,25(OH)vitD, hemoglobin, albumin, glucose and the prot-creat ratio. These univariate tests showed significant effects of time on 25(OH)vitD, and 1,25(OH)vitD and significant interactions between time X treatment. Tests of between-subjects effects showed significant differences between subjects with high baseline vit D versus those a normal vit D in 25(OH)vitD ($F=88.25$, $df=1/165$, $P<0.001$) and 1,25(OH)vitD ($F=24.35$, $df=1/165$, $P<0.001$). At baseline there were highly significant

differences in 25(OH)vitD between both study groups ($F=296.39$, $df=1/175$, $P<0.001$), whereas at endpoint there were no significant differences ($F=0.101$, $df=1/175$, $P=0.751$). In baseline conditions there were significant differences in 1,25(OH)vitD between the treatment groups ($F=77.85$, $df=1/175$, $P<0.001$), whereas at endpoint these significant differences were no longer present ($F=0.11$, $df=1/175$, $P=0.743$). Thus, treatment vit D had normalized 25(OH)vitD and 1,25(OH)vitD levels in subjects with initially lowered vit D levels. In the group of untreated patients, levels of vit D had fallen below the normal range in 19 of the 81 patients (27%). In patients who were treated, endpoint vit D levels were normalized in 72 out of 96 patients (75%) and from the 24 remaining, 16 presented showed an elevation of at least 25% in serum vit D levels.

Table 2 shows also that there was a significant effect of time on hemoglobin, but no significant time X treatment effect. Tests of between-subjects effects showed significant differences in hemoglobin between both study groups ($F=4.57$, $df=1/165$, $P=0.034$) with increased levels in subjects with high versus normal baseline vit D levels. Hemoglobin was significantly higher at endpoint than at baseline. Table 2 shows that there were significant effects of time on albumin and that the interaction between time x treatment was not significant. Albumin was significantly lower at endpoint than in baseline conditions. Test of between-subject analysis showed that there were no significant differences in albumin between the two study groups ($F=2.08$, $df=1/165$, $P=151$). There were no significant effects of time and interactions between time x treatment on glucose or the prot-creat ratio. Tests of between-subjects effects showed a significant but small difference in the prot-creat ratio between subjects with high versus normal vit D baseline levels ($F=4.29$, $df=1/165$, $P=0.040$).

DISCUSSION

Vit D is an essential micronutrient for many biological functions and it has many implications on health²¹. Vit D serum levels are lower in women, in afro descent and obese people, and in the aged²². Vit D deficiency is highly prevalent in CKD patients not yet on renal replacement therapy and in hemodialysis and peritoneal dialysis (PD) patients. Indeed, almost all patients with PD suffer from vit D deficiency²³. Low vit D levels in individuals with CKD are associated with higher blood pressure^{21,24}, higher proteinuria^{25,26} and more frequent need for dialysis^{22,27-29}. In CKD patients, treatment with vitamin D decreases proteinuria^{17,30-33}, cardiovascular events³⁴ and all-cause mortality in CKD patients, without an increase in side effects³⁵.

In the present study, oral vit D₃ supplementation raised calcidiol in 72 (75%) of the CKD patients with vit D deficiency (96 patients with vit D < 30 ng/mL, after treatment: 72 increased \geq 30 ng/mL) to levels which are considered adequate for the general population and subjects with CKD^{5,8,14,15}. Thirty four patients (35%) in the vit D₃ supplementation group were using RAS inhibitors while 36 patients (44%) in the control group used this class of drugs.

Patients in the vit D treatment group had higher baseline proteinuria and although the majority of patients receiving vit D₃ supplementation achieved calcidiol levels about 30 ng/mL at the end of the study period there was not a significant reduction in proteinuria in this group. These findings differ from previous studies^{17,30-33}.

The effects of the interaction between time (baseline versus endpoint) X treatment (vit D₃ supplementation or not) X ACEI / ARB (use or no use) on the eGFR values shows that vit D₃ supplementation prevented the significant eGFR decrease in CKD patients using -RAS

blockers. This mechanism of vit D nephroprotection observed in the present study may be explained by beneficial effects on other pathways leading to kidney damage not related to proteinuria reduction.

Seven patients in the vit D supplementation group needed RRT during the study time. We believe that this outcome was not directly dictated by vit D as patients from this group had, at baseline, lower eGFR levels, in mL/min/1.73 m² (considering the 7 patients that progressed to reach RRT: four patients 15; one patient 16; one patient 21, and one patient 24) and proteinuria. Additionally, patients who progressed to RRT used vit D for only a few months (2 patients for one month; 3 patients for two months; 1 patient for 3 months; 1 patient for 4 months). Due to a very low eGFR none of these patients were taking RAS blockers.

Hypertension is a risk factor for progression of kidney disease, especially in the presence of proteinuria³⁴⁻³⁷ and its treatment is crucial to slow the progression of CKD. Kidney cells are able to synthesize renin and angiotensin II. Increases in renal angiotensin II production impact the progression of renal injury through, increased glomerular capillary pressure, production of pro inflammatory cytokines, immune cells infiltration, extracellular matrix expansion and podocyte injury⁴⁰. Currently, ACEI / ARB are considered the drugs of choice for the treatment of hypertension in patients with nephropathy either diabetic or not^{38,39}. The efficacy of prolonged use of ACEI / ARB can be reduced by a compensatory increase in renin synthesis caused by disruption of inhibitory feedback of the RAS, which triggers increased production of renin, which in turn leads to increased angiotensin II, that perpetuates renal injury⁴⁰.

The beneficial effect of vit D in reducing the progression of renal disease in CKD patients with vit D deficiency using RAS blockers seen in this study may be related to an additional blockade of intrarenal RAS by vit D. Indeed, studies in animal models of diabetes^{38,41-45} and obstructive nephropathy^{44,45} showed that vit D attenuated the compensatory

increase in the RAS associated with the use of ACEI / ARB. Li et al.⁴⁸ showed that 1,25OHvitD inhibits RAS by suppressing renin transcription. Tan et al.¹⁶ demonstrated that treatment with paricalcitol, an analogue of vit D, attenuated interstitial fibrosis in mice subjected to unilateral ureteral obstruction, and Freundlich et al.⁴⁹ and Zhang et al.⁵⁰ using the same experimental model as described above showed that paricalcitol suppressed local activation of RAS, decreased glomerular and tubulointerstitial injury and reduced blood pressure and proteinuria. In hypertensive individuals with normal renal function, treatment with vit D was effective in attenuating the stimulation of the RAS⁵¹ and the combined use of ACEI / ARB and vit D in diabetic patients with CKD reduced proteinuria^{30,40,52} and urinary pro-fibrotic cytokines⁵², suggesting a protective effect of this combination on the progression of CKD.

PRACTICAL APPLICATION

As blockers of the RAS are effective in protecting CKD course, and as vit D supplementation to CKD patients is suggested by international guidelines^{34,35}, this combination is highly justified and may represent one possible renoprotective measure aimed at reducing the progression rate of CKD, if confirmed in additional clinical studies.

REFERENCES

- 1 Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. Chronic kidney disease and risks of death: cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351: 1296-305.
- 2 Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010; 375: 2073-81.
- 3 Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2974-2984.
- 4 Hou FF, Xie D, Zhang X, et al. Renoprotection of optimal antiproteinuric doses (ROAD) study: A randomized controlled study of benazepril and losartan in chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1889-1898.
- 5 Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
- 6 Kimball S, Fuleihan GE, Vieth R. Vitamin D: A growing perspective. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008; 45(4): 339-414.
- 7 Thacher TD, Clarke BL. Vitamin D insufficiency. *Mayo Clin Proc* 2011; 86(1): 50-60.
- 8 Rosen CJ. Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011; 364: 248-54.
- 9 Cuppari L, Carvalho AB, Draibe SA. Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country. *J Renal Nutr* 2008; 18(5): 408-414.

- 10 Figueiredo-Dias V, Cuppari L, Garcia-Lopes MG, et al. Risk factors for hypovitaminosis D in nondialyzed chronic kidney disease patients. *J Renal Nutr* 2012; 22(1): 4-11.
- 11 LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in United States. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 1026-1033.
- 12 Levin A, Bakris GL, Molitch M, 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: 31-38.
- 13 Li YC. Vitamin D in chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013; 180: 98-109.
- 14 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013; 3: 1-150.
- 15 Johnson DW, Atai M, Chan M, et al. KHA-CARI Guideline: Early chronic kidney disease: detection, prevention and management. *Nephrology* 2013; 18: 340-350.
- 16 Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3382-3393.
- 17 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.

- 18 National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(suppl2): S1-S266.
- 19 Levey AS, Greene T, Kusek JW, Beck GL. MDRD Study Group. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. (abstract) *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 155A.
- 20 National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(suppl3): S1-S170.
- 21 Scragg R, Sowers M, Bell C. Serum 25-hydroxyvitamin D, ethnicity, and blood pressure in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hypertens* 2007; 20: 713-719.
- 22 Ravani P, Malberti F, Tripepi G, et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 88-95.
- 23 Shah N, Bernardini J, Piraino B. Prevalence and correction of 25(OH) vitamin D deficiency in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2005; 25: 362-366.
- 24 Forman JP, Williams JS, Fisher NDL. Plasma 25-Hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. *Hypertension* 2010; 55: 1283-1288.
- 25 Damasiewicz M, Magliano DJ, Daly RM, et al. 25-hydroxyvitamin D levels and chronic kidney disease in the AusDiab (Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle) study. *BMC Nephrology* 2012; 13: 55.

- 26 Isakova T, Gutiérrez OM, Patel NM, et al. Vitamin D deficiency, inflammation, and albuminuria in chronic kidney disease: complex interactions. *J Renal Nutr* 2011; 21: 295-302.
- 27 Wolf M, Shah A, Gutierrez O, et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; 72: 1004-1013.
- 28 Dreschsler C, Verduijn M, Pilz S, et al. Vitamin D status and clinical outcomes in incident dialysis patients: results from the NECOSAD study. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 1024-1032.
- 29 Fernández-Juárez G, Luño J, Barrio V, et al. 25(OH) Vitamin D levels and renal disease progression in patients with type 2 diabetic nephropathy and blockade of the renin-angiotensin system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 1870-1876.
- 30 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: 1543-1551.
- 31 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: 249-255.
- 32 Cheng J, Zhang W, Zhang X, et al. Efficacy and safety of paricalcitol therapy for chronic kidney disease: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 391-400.
- 33 Jørgensen HS, Winther S, Povlsen JV, et al. Effect of vitamin-D analogue on albuminuria in patients with non-dialysed chronic kidney disease stage 4-5: a retrospective single center study. *BMC Nephrology* 2012; 13: 102.

- 34 Lishmanov A, Dorairajan S, Pak Y, et al. Treatment of 25-OH Vitamin D deficiency in older men with chronic kidney disease stages 3 and 4 is associated with reduction in cardiovascular events. *Am J Therap* 2013; 20: 480-486.
- 35 Zheng Z, Shi H, Jia J, et al. Vitamin D supplementation and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of 20 observational studies. *BMC Nephrology* 2013; 14: 199
- 36 Inker LA, Coresh J, Levey AS, et al. Estimated GFR, albuminuria, and complications of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 2322-2331.
- 37 Hallan, SL, Matsushita K, Sang Y, et al. Age and association of kidney measures with mortality and end-stage renal disease. *JAMA* 2012; 308(22): 2349-2360.
- 38 Drawz PE, Rosenberg ME. Slowing progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; 3: 372-376.
- 39 Sukmark T, Sukmark S. Predictors of faster progression in chronic kidney disease. *J Med Assoc Thai* 2014; 97(8): 812-819.
- 40 de Borst MH, Hajhosseiny R, Tamez H, et al. Active Vitamin D treatment for reduction of residual proteinuria: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 1863-1871.
- 41 James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults. Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311(5): 507-520.
- 42 Li, YC. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney Int* 2010; 78: 134-139.

- 43 Zhang Z, Zhang Y, Ning G, et al. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: Blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci USA (PNAS)* 2008; 105(41): 15896-15901.
- 44 Zhang Y, Deb DK, Kong J, et al. Long-term therapeutic effect of vitamin D analog doxercalciferol on diabetic nephropathy: strong synergism with AT1 receptor antagonist. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297: F791-F801.
- 45 Deb DK, Sun T, Wong KE, et al. Combined vitamin D analog and AT1 receptor antagonist synergistically block the development of kidney disease in a model of type 2 diabetes. *Kidney Int* 2010; 77: 1000-1009.
- 46 Ohara I, Tanimoto M, Gohda T, et al. Effect combination therapy with angiotensin receptor blocker and 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in type 2 diabetic nephropathy in KK-A^Y/Ta Mice. *Nephron Exp Nephrol* 2011; 117: e124-e132.
- 47 Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a Vitamin D analog suppress the progression of renal insufficiency in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 1796-1806.
- 48 Li YC, Kong J, Wei M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ is a negative endocrine regulator of the rennin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002; 110: 229-238.
- 49 Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, et al. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008; 74: 1394-1402.
- 50 Zhang Y, Kong J, Deb D K, et al. Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppression the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 966-973.

- 51 Carrara D, Bernini M, Bacca A, et al. Cholecalciferol administration blunts the systemic renin-angiotensin system in essential hypertensives with hypovitaminosis D. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2014; 15: 82-87
- 52 Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, et al. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- β 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int* 2011; 80: 851-860.

Table 1 - Demographic, epidemiological and clinical data of the patients with CKD treated or not with vitamin D

Variable		Vit D < 30 ng/mL (n=96)	Vit D ≥ 30 ng/mL (n=81)	F / χ^2	df	P
Age (years)		67.66 ± 12.12	66.25 ± 12.50	0.58	1/175	0.448
Gender	Male / female	60 / 36	60 / 21	2.70	1	0.101
Race	Caucasian / non	83 / 13	71 / 10	0.06	1	0.814
BMI (Kg/m ²)		28.62 ± 4.84	28.19 ± 5.60	0.29	1/172	0.592
BP (mmHg)	systolic	135.34 ± 18.63	129.07 ± 17.34	5.27	1/174	0.023
	diastolic	82.41 ± 11.18	78.95 ± 11.06	4.23	1/174	0.041
Nicotine dependence	Yes / No	9 / 87	7 / 74	0.029	1	0.865
Current statin	Yes / No	70 / 26	56 / 25	0.306	1	0.580
Current ACEI/ARB	Yes / No	34 / 62	36 / 45	1.50	1	0.221

Values are shown as mean ± SD; F / χ^2 : results of analyses of variance (F values) or analyses of contingency tables (χ^2 values)

Abbreviations: BMI: body mass index; BP: blood pressure; ACEI/ARB: angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin II type 1 receptor blockers

Table 2 - Effect of cholecalciferol supplementation on GFR_e, proteinuria and some laboratory parameters of patients with CKD treated or not with vitamin D

Variables	time	VitD < 30 ng/mL (n=96)	Vit D > 30 ng/mL (n=81)	F1/F2	df	P
eGFR (mL/min/1,73m ²)	Baseline	34.11 ±11.22	40.74 ±11.17	F1=6.03	1/165	0.015
	Endpoint	33.10 ±12.47	39.22 ±12.30	F2=0.21	1/165	0.6476
25(OH)vitD (ng/mL)	Baseline	19.97 ±6.39	41.05 ±9.77	F1=51.65	1/165	<0.001
	Endpoint	37.47 ±10.50	36.96 ±11.06	F2=114.76	1/165	<0.001
1,25(OH)vitD (pg/mL)	Baseline	24.31 ±5.49	33.81 ±8.70	F1=38.96	1/165	<0.001
	Endpoint	34.10 ±9.59	34.61 ±10.85	F2=20.99	1/165	<0.001
Hemoglobin (g/dL)	Baseline	13.57 ±1.64	14.07 ±1.49	F1=4.59	1/165	0.034
	Endpoint	13.77 ±1.60	14.33 ±1.56	F2=0.07	1/165	0.795
Albumin (g/dL)	Baseline	4.06 ±0.52	4.12 ±0.41	F1=10.11	1/165	0.002
	Endpoint	3.97 ±0.38	4.05 ±0.35	F2=0.22	1/165	0.644
Glucose (mg/dL)	Baseline	110.89 ±39.08	111.41 ±33.66	F1=0.31	1/165	0.578
	Endpoint	116.00 ±45.55	108.25 ±30.30	F2=1.80	1/165	0.644
Prot-creat ratio (mg/g)	Baseline	0.87 ±1.67	0.36 ±0.58	F1=0.13	1/165	0.719
	Endpoint	0.78 ±1.61	0.53 ±1.47	F2=1.83	1/165	0.178

F1/F2: all results of repeated measurement GLM analysis; F1: effects of time. F2: effects of the interaction between time X vit D treatment.

Values are mean ± standart deviation. Abbreviatures: eGRF: estimated glomerular filtration rate; Prot-creat ratio: urine protein/creatinine ratio; 25(OH)vitD: 25-hydroxyvitamin D; 1,25(OH)vitD: 1,25 dihydroxyvitamin D₃

APÊNDICE - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Caro participante:

Gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário da pesquisa intitulada: Deficiência de vitamina D, inflamação e estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica não dialítica, que se refere a um projeto dos Professores: Vinicius Daher Alvares Delfino e Abel Esteves Soares da disciplina de Nefrologia, Décio Sabbatini Barbosa do departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas e Tiemi Matsuo (departamento de Matemática Aplicada) e da aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde Paula Godeny, todos da Universidade Estadual de Londrina.

O objetivo deste estudo é avaliar possíveis correlações entre deficiência de vitamina D e estresse oxidativo e inflamação em pacientes com Doença Renal Crônica. Sua participação consiste em fornecer, durante a coleta de seus exames laboratoriais rotineiramente solicitados pelos docentes dos ambulatórios de nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, um adicional de cerca de 30 mL de sangue para análise dos níveis de vitamina D e alguns marcadores de estresse oxidativo e de inflamação.

Seu nome não será divulgado em qualquer etapa da pesquisa e a divulgação dos resultados da pesquisa será feita de forma a preservar seu anonimato. Não será cobrado nada, não haverá gastos e os riscos de sua participação são mínimos, restritos à retirada adicional de 30 mL de sangue em uma de suas avaliações clínicas rotineiras nos ambulatórios de nefrologia do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina. Se você for identificado como apresentando insuficiência/deficiência de vitamina D você receberá orientação para suplementação oral desta vitamina como recomendado pelas sociedades internacionais de nefrologia, sem custos para você, por 6 meses. Ao final deste período haverá retirada de sangue (novamente cerca de 30 mL) para determinação dos testes laboratoriais específicos deste estudo. Não estão previstos ressarcimentos ou indenizações e não haverá benefícios imediatos de sua participação. Os resultados contribuirão para elucidar o papel da deficiência de vitamina D no estresse oxidativo e na inflamação aumentados dos doentes com Doença Renal Crônica.

Gostaríamos de deixar claro que sua participação é voluntária e que você poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, ou ainda descontinuar sua

participação se assim o preferir, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Neste momento, você está recebendo uma cópia deste Termo de Conhecimento Livre e Esclarecido para sua guarda. Desde já agradecemos a sua atenção e participação e nos colocamos à sua disposição para maiores informações que se fizerem necessárias.

Eu, _____(nome e número do documento de identidade do participante), confirmo que

(nome do pesquisador) explicou-me os objetivos desta pesquisa, bem como a forma de minha participação. Eu li e compreendi este Termo de Conhecimento e concordo em dar meu consentimento para participar como voluntário desta pesquisa.

Londrina, ____/____/_____(data),

_____(assinatura do sujeito da pesquisa)

Eu, _____(nome do membro da equipe que apresentou o TCLE), obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito da pesquisa para sua participação na mesma.

(assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

(Identificação e assinatura do pesquisador responsável pelo projeto - Fone: 3371 2216)

Comitê de Ética em Pesquisa – UEL – fone: 3371 2490

Londrina, ____ de _____ de 20____

ANEXO

ANEXO

Parecer do Comitê de Ética em pesquisa envolvendo seres humanos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
Registro CONEP 268

Parecer de Aprovação Nº 086/10
CAAE Nº 0083.0.268.000-10
FOLHA DE ROSTO Nº 326324

Londrina, 08 de julho de 2010.

PESQUISADOR: VINICIUS DAHER ALVARES DELFINO
CCS/DEPTO DE CLINICA MÉDICA

Prezado Senhor:

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA"

Situação do Projeto: **APROVADO**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL