



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**COMPARAÇÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE
DOENTES RENAIIS CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE EM RELAÇÃO A NÍVEIS
DE VITAMINA D**

**NOME: ANA CLARA SIMÕES FLÓRIDO ALMEIDA
ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANDRÉA NOVAIS MORENO AMARAL**

CURITIBA

2017



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**COMPARAÇÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE
DOENTES RENAIIS CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE EM RELAÇÃO A NÍVEIS DE
VITAMINA D**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Orientadora: Dra. Andréa Novais
Moreno Amaral

CURITIBA

2017

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

Almeida, Ana Clara Simões Flório
A485c Comparação entre as subpopulações de monócitos de doentes renais
2017 crônicos em hemodiálise em relação a níveis de vitamina D / Ana Clara Simões
Flório Almeida ; orientadora: Andréa Novais Moreno Amaral. – 2017.
53 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2017
Bibliografia: f. 42-50

1. Insuficiência renal crônica. 2. Hemodiálise. 3. Monócitos, Vitamina D.
I. Amaral, Andréa Novais Moreno. II. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 616.614



PUCPR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO EXAME DE DEFESA DO PROJETO DE PESQUISA DE PASSAGEM DIRETA DO MESTRADO PARA O DOUTORADO COM DEFESA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Exame de Defesa de Projeto de Pesquisa – Número: **160**

Aos sete dias do mês de abril de 2017, às 09hs e 00min, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof ^a . Dr ^a . Andrea Novais Moreno do Amaral PUCPR – Presidente	
Prof ^a . Dr ^a . Aline Johann - PUCPR	
Prof ^a . Dr ^a . Aline Borsato Hauser - UFPR	

Designada para a avaliação do Projeto de Pesquisa de Passagem com Defesa do Mestrado para o Doutorado, sob título provisório **"COMPARAÇÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DE DOENTES RENAIAS CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE EM RELAÇÃO A NÍVEIS DE VITAMINA D"** da mestrand **Ana Clara Simões Flórido Almeida**, ano de ingresso 2015, de acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os pareceres a serem distribuídos e que foram os seguintes.

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

Prof^a. Dr^a Andrea Novais Moreno do Amaral

Parecer: APROVADA

Prof^a. Dr^a. Aline Johann

Parecer: APROVADA

Prof^a. Dr^a. Aline Borsato Hauser

Parecer: Aprovada

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Andrea Novais Moreno do Amaral

Presidente da Banca Examinadora

Homologado em: 30/4/17

Prof^a. Dr^a. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a oportunidade da reencarnação.

Aos meus filhos, Jonathan e Valentina, por terem me dado forças e motivos reais para não desistir e resistir às adversidades.

Ao meu esposo, Jonathan, por ter me proporcionado, sempre com muito amor, todo apoio necessário para alcançar meu objetivo.

A meus pais, Irapuru e Débora, por todos os valores e educação concedidos, será eternamente mais fácil com vocês por perto.

À minha irmã, Nara, eterna companheira, por todos os momentos doces e agradáveis, você é insubstituível.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Natália, Gabriela, Roberto, por todos os instantes divertidos e relaxantes durante essa caminhada.

À Dra. Andréa Moreno, minha orientadora, por ter me acolhido com muito carinho desde o início e especialmente durante alguns contratemplos que surgiram durante o decorrer do projeto.

À Irê, nossa técnica de laboratório, que sempre me tratou com muito apreço, obrigada por sua amizade.

À Jane, secretária do PPGCS, por toda ajuda e orientação necessárias.

À CAPES pelo suporte financeiro.

“Na ausência de fatos, a dúvida é opinião sábia e prudente.”

Allan Kardec

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIações	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Doença renal crônica (DRC)</i>	12
1.2 <i>Distúrbio mineral e ósseo (DMO) na DRC</i>	15
1.3 <i>Vitamina D</i>	16
1.3.1 <i>Ações da vitamina D</i>	19
1.4 <i>Vitamina D e DRC</i>	25
1.5 <i>Monócitos</i>	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 <i>Objetivo geral</i>	30
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	30
4 DESENVOLVIMENTO	31
4.1 <i>Participantes</i>	31
4.2 <i>Protocolo de estudo</i>	31
4.3 <i>Parâmetros Laboratoriais</i>	31
4.4 <i>Avaliação de monócitos, apoptose e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</i>	32
4.5 <i>Análise estatística</i>	33
5 RESULTADOS	34
5.1 <i>Características demográficas</i>	34
5.2 <i>Marcadores do metabolismo mineral e ósseo</i>	34
5.3 <i>Subpopulações monocitárias</i>	34
5.4 <i>Apoptose e Produção de EROs</i>	35
6 DISCUSSÃO	36

7 LIMITAÇÕES	39
8 CONCLUSÕES	40
9 REFERÊNCIAS.....	41
<i>Anexo 1</i>	<i>50</i>
<i>Anexo 2</i>	<i>51</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estagiamento da DRC. -----	13
Figura 2: Alterações na DRC que levam à DMO-DRC.-----	15
Figura 3: Forma estrutural da vitamina D, ergocalciferol e colecalciferol. -----	17
Figura 4: Metabolismo da Vitamina D. -----	18
Figura 5: Ações clássicas da vitamina D. -----	21
Figura 6: Funções da vitamina D no sistema imune inato e adaptativo. -----	23
Figura 7: Identificação das subpopulações monocitárias. -----	33
Figura 8: Diferença das subpopulações monocitárias entre pacientes com diferentes níveis de vitamina D. (C1: monócitos clássicos; Inter 1: monócitos intermediários e NC 1 monócitos não clássicos) do Grupo 1 – menores níveis de vitamina D; C2, Inter 2 e NC 2 – subtipos de monócitos para o Grupo 2 – maiores níveis de vitamina D. **p< 0,05; ***p< 0,01). -----	35
Figura 9: A: Diferença de apoptose entre pacientes menor ou maior níveis de vitamina D. B: Diferença no estresse oxidativo entre pacientes com menor ou maior níveis de vitamina D. -----	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais fontes alimentares e alimentos fortificados com vitamina D..	16
Tabela 2: Motivos que levam à deficiência de vitamina D na DRC.	25
Tabela 3: Características demográficas e marcadores do metabolismo mineral e ósseo.....	34

LISTA DE ABREVIÇÕES

- CaSR – *Calcium Sensible Receptor* (Receptor Sensível ao Cálcio)
- CTE – *C-Terminal Structure* (Estrutura C-Terminal)
- DBD – *DNA Binding Domain* (Domínio Ligador de DNA)
- DCV – Doença Cardiovascular
- DMO – Doença Mineral e Óssea
- DPB – *Vitamin D Protein Binding* (Proteína Ligante da Vitamina D)
- DRC – Doença Renal Crônica
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- FGF – *Fibroblast Growth Factor* (Fator de Crescimento Fibroblástico)
- IFN – Interferon
- IL – Interleucina
- LBD – *Ligand Binding Domain* (Domínio Ligador do Ligante)
- MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo de Histocompatibilidade)
- PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern* (Padrão Molecular Associado ao Patógeno)
- PTH – *Parathyroid Hormone* (Hormônio Paratireoideano)
- RXR – *Retinoid X Receptor* (Receptor do Retinóide X)
- TFG – Taxa de Filtração Glomerular
- TLR – *Toll-like receptor* (Receptor do tipo *Toll*)
- TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)
- UVB – *Ultraviolet B* (Raio Ultravioleta B)
- VDR – *Vitamin D Receptor* (Receptor da Vitamina D)
- VDRE – *Vitamin D Responsive Element* (Elemento Responsivo à Vitamina D)

RESUMO

Introdução: A doença renal crônica caracteriza-se pela perda progressiva da filtração glomerular concomitante ou não à proteinúria, e subsequente retenção de toxinas urêmicas, levando os doentes renais crônicos a um estado de inflamação crônica. Além disso, esses pacientes possuem níveis reduzidos de vitamina D, a qual é amplamente estudada por possuir ações pleiotrópicas, que foram demonstradas através da presença de seu receptor e maquinaria de ativação em diversas células extrarrenais. Dentre essas, células do sistema imune inato como os monócitos/macrófagos despertam interesse por possuírem VDR expresso constitutivamente. Os monócitos compreendem três populações, clássicos, intermediários e não clássicos, sendo que os intermediários possuem características pró-inflamatórias, estando aumentados na população de doentes renais crônicos. **Objetivo:** O presente projeto foi elaborado com a finalidade de avaliar o perfil monocitário em doentes renais crônicos em hemodiálise de acordo com níveis de vitamina D. **Métodos:** Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com os níveis séricos de vitamina D: grupo 1, vitamina D < 26ng/mL (n= 15) e grupo 2, vitamina D ≥ 26ng/mL (n=18). A coleta de sangue periférico dos pacientes selecionados foi realizada antes da primeira sessão de hemodiálise da semana para avaliação de: (i) subpopulações de monócitos através da utilização de anticorpos CD14 e CD16 (BD Bioscience); (ii) liberação de espécies reativas de oxigênio através por incubação com DCFH-DA (Sigma Aldrich) e (iii) apoptose por meio de Anexina e 7AAD (BD Bioscience). A leitura foi realizada por citometria de fluxo (FACs Calibur). **Resultados:** Observamos no Grupo 1 aumento significativo na expressão de monócitos intermediários ($34,7 \pm 31,6$ vs $12,1 \pm 6,3$; $p= 0,006$) e diminuição de clássicos ($45,3 \pm 31,8$ vs $70,4 \pm 25,1$; $p= 0,017$) quando comparado ao Grupo 2. Não houve diferença entre os mesmos Grupos em relação aos monócitos não clássicos ($2,4 \pm 3,7$ vs $1,2 \pm 1,9$; $p= 0,24$), assim como em relação à apoptose ($26,1 \pm 18,7$ vs $30,9 \pm 23,8$; $p= 0,53$) e ao estresse oxidativo ($63,7 \pm 27,1$ vs $58,3 \pm 21$; $p=0,52$). **Conclusão:** Pacientes em hemodiálise com menores níveis de vitamina D possuem quantidades significativamente maiores de monócitos intermediários e menores de clássicos, o que sugere que estes pacientes possam ter um perfil inflamatório intensificado quando comparado aos pacientes com elevado nível de vitamina D.

ABSTRACT

Introduction: Chronic kidney disease (CKD) is characterized by gradual decrease in glomerular filtration rate with or without proteinuria, and subsequently uremic toxins retention, prompting CKD patients to a persistent inflammatory condition. Furthermore, these patients are known to keep diminished levels of vitamin D, which is broadly studied considering its pleiotropic actions, which were demonstrated by the presence of its receptor and activation machinery in extrarenal cells. Among these, cells belonging to innate immune system, such as monocytes/macrophages, arouse interest considering they constitutively express VDR. Monocytes comprehend three populations, classical, intermediate and non classical, where intermediate demonstrate inflammatory characteristics, being increased in CKD patients. **Objective:** This study was elaborated aiming the evaluation of CKD hemodialysis patients monocytic profile according to vitamin D levels. **Methods:** Selected patients were divided into two groups, regarding to vitamin D levels: group 1, vitamin D < 26ng/ mL (n= 15) and group 2 (n= 18), vitamin D ≥ 26ng/ mL. Before each patient first hemodialysis session, whole blood was collected in citrate tubes (BD Vacutainer) aiming evaluation of: (i) monocytic populations through CD14 and CD16 antibodies (BD Bioscience); (ii) reactive oxygen species through DCFH-DA (Sigma Aldrich) and (iii) apoptosis through Annexin and 7AAD (BD Bioscience). The analysis was performed by flow cytometry (FACs Calibur). **Results:** We observed that in group 1 there was a significantly increase in intermediate monocytes expression ($34,7 \pm 31,6$ vs $12,1 \pm 6,3$; $p= 0,006$) and decrease in classical ($45,3 \pm 31,8$ vs $70,4 \pm 25,1$; $p= 0,017$) when compared to group 2. There was no difference between the same groups regarding to non classical ($2,4 \pm 3,7$ vs $1,2 \pm 1,9$; $p= 0,24$), as well as to apoptosis ($26,1 \pm 18,7$ vs $30,9 \pm 23,8$; $p= 0,53$) and to oxidative stress ($63,7 \pm 27,1$ vs $58,3 \pm 21$; $p=0,52$). **Conclusion:** Hemodialysis patients with lower vitamin D levels have significantly increased intermediate monocytes number and decreased classical one, suggesting these patients might have an intensified inflammatory profile, when compared to patients with elevated vitamin D levels.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal crônica (DRC)

A doença renal crônica (DRC) caracteriza-se pela perda progressiva e irreversível da função renal, concomitante ou não com proteinúria (1). Estima-se que de 3 a 18% da população mundial possua DRC (2) e no Brasil, segundo o último senso publicado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia, há mais de 120 mil brasileiros em tratamento dialítico. Esta situação gera impactos econômicos causados pelo alto custo do tratamento, além dos prejuízos psicossociais que alguns pacientes adquirem. O desenvolvimento da DRC varia nos países de acordo com a etnia e a classe social, sendo que indivíduos de nível sócio econômico mais baixos têm maiores chances de desenvolver a DRC quando comparadas àqueles com níveis sócio econômicos mais elevados (3, 4). A DRC tem como principais fatores etiológicos hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM), doenças crônicas comuns na população geral (5).

Atualmente a DRC é classificada em cinco diferentes estágios, os quais são divididos de acordo com taxa de filtração glomerular estimada (TFG) e/ou presença de albuminúria, conforme indicação de diretrizes de prática clínica para a doença renal (1). Este estagiamento dá-se conforme a Figura 1, onde os estágios iniciais da DRC costumam ser assintomáticos, mas com o progresso da doença, os rins desenvolvem alterações anatômicas e marcadores de função reduzida, como hematúria e proteinúria (6), o que leva ao estágio final, quando a terapia renal substitutiva é o tratamento de escolha.

Prognóstico da DRC pela TFG e classificação da albuminúria

**Prognóstico da DRC pela TFG e
classificação da albuminúria:
KDIGO 2012**

				Classificação da albuminúria persistente Descrição e variação		
				A1	A2	A3
				Normal a levemente elevado	Moderadamente elevado	Severamente elevado
				< 30mg/g < 3mg/mmol	30 - 300mg/g 3 - 30mg/mmol	> 300mg/g > 30mg/mmol
Classificação da TFG (mL/min/1,73 m ²) Descrição e classificação	G1	Normal ou elevada	≥90			
	G2	Levemente diminuída	60-89			
	G3a	Levemente a moderadamente diminuída	45-59			
	G3b	Moderadamente a severamente diminuída	30-44			
	G4	Severamente diminuída	15-29			
	G5	Falência renal	<15			

Verde: baixo risco (se nenhum outro marcador de doença renal, sem DRC); Amarelo: risco moderadamente elevado; Laranja: risco elevado; Vermelho: risco muito elevado

Figura 1: Estadiamento da DRC.

Dados epidemiológicos têm mostrado que a baixa TFG estimada está associada ao risco de complicações sistêmicas, como doença cardiovascular (DCV), HAS, anemia, mortalidade e progressão ao estágio final da doença (6). O estágio final da DRC é associado a alta mortalidade, resultante de doenças cardiovasculares (~50%) e infecções (~20%), sendo que a mortalidade ocasionada por DCV é 500 vezes maior nesses pacientes, quando comparada a indivíduos com função renal normal (7, 8), o que pode ser explicado pelo avanço da aterosclerose devido a um comprometimento da função endotelial e inflamação persistente (9).

A redução da filtração glomerular, concomitante ou não com proteinúria, além de acúmulo de toxinas urêmicas nos estágios finais da doença, leva o paciente à síndrome urêmica (9,10). No início do século XXI um grupo de pesquisa europeu em toxinas urêmicas (EUTOX – *European Uremic Toxin Work Group*), elencou 90

diferentes solutos urêmicos e esse número tem aumentado cada vez mais (11), sendo nos dias atuais listadas aproximadamente 152 toxinas urêmicas. Estas toxinas podem ser classificadas em 3 classes, conforme seu peso molecular e comportamento durante a diálise:

1. Compostos Pequenos: solúveis em água e com massa molecular máxima de 500 Da, removíveis por diálise. Nesta condição aparecem ureia, creatinina e guanidinas (monometil arginina - MMA; dimetilarginina simétrica - SDMA e dimetilarginina assimétrica - ADMA).

2. Compostos Médios: possuem massa molecular acima de 500 Da, sendo removíveis por membranas de diálise com poros grandes, geralmente são peptídeos e afetam muitos órgãos e sistemas. Neste grupo estão microglobulina- β_2 e leptina.

3. Compostos ligados a Proteínas: exercem muitos efeitos tóxicos e sua remoção é difícil por diálise. A baixa remoção via diálise convencional é justificada pelo tamanho do complexo (toxina + proteína plasmática), o qual não atravessa a membrana do dialisato (até mesmo em técnicas mais aprimoradas, como na hemodiálise de alto fluxo). Encaixam-se nesta classificação os fenóis e os indóis (11).

Ao passo que ocorre a progressão da DRC, com os rins perdendo massa e função, o acúmulo de toxinas urêmicas, passa a ser um problema cada vez mais importante, gerando efeitos biológicos indesejáveis ao organismo e contribuindo para o estado inflamatório do paciente (11), junto ao aumento de citocinas de fase aguda, piora do estado nutricional e aterosclerose acelerada (11,12). Além disso, os pacientes renais crônicos encontram-se em estado de inflamação crônica, levando a alterações na imunidade inata e adquirida com relação estreita à DCV e infecções (13, 14). Outras complicações prevalentes no paciente renal crônico são as relacionadas aos distúrbios minerais e ósseos, sendo importantes causas de morbidade, diminuição da qualidade de vida e calcificação extra esquelética nesses pacientes (16).

1.2 Distúrbio mineral e ósseo (DMO) na DRC

A DRC leva a diversas alterações no metabolismo mineral-ósseo, que em conjunto são denominadas DMO-DRC, conforme Figura 2. Estas alterações incluem hipocalcemia, hiperfosfatemia, hiperparatireoidismo, hipovitaminose D e aumento de FGF-23. Alterações na morfologia óssea, como volume, *turnover*, mineralização e força, resultantes do hiperparatireoidismo secundário, são modificações que também ocorrem, assim como calcificação de tecidos moles e vasos sanguíneos. Esses dados justificam o porquê de pacientes renais crônicos em hemodiálise terem de 3 a 4 vezes mais chances de sofrer fratura, quando comparados à população geral (15). Algumas dessas anormalidades são consideradas fatores possivelmente modificáveis através de intervenções farmacológicas e, dentro desse contexto a vitamina D é passível de destaque, uma vez que esta, em níveis inadequados no organismo, leva ao desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário (17).

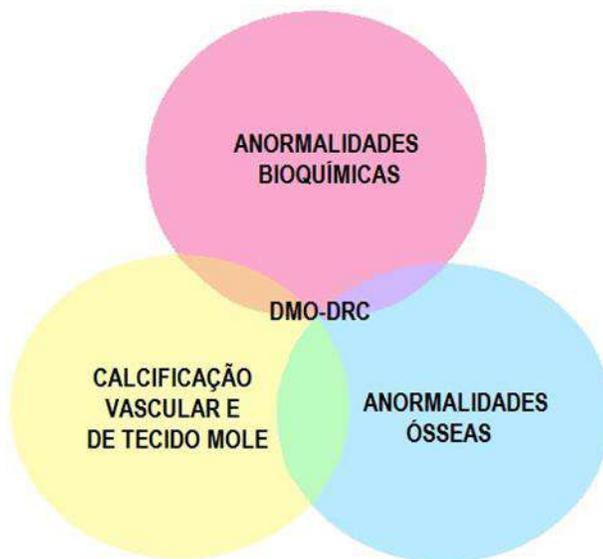


Figura 2: Alterações na DRC que levam à DMO-DRC.

1.3 Vitamina D

A denominação Vitamina D é dada a um grupo de moléculas secosteróides relacionadas entre si através de reações fotolíticas e enzimáticas (18). Dentre estas moléculas, as vitaminas D₃, colecalciferol, e D₂, ergocalciferol, são amplamente estudadas por demonstrarem possuir um importante papel em diversas regulações no organismo e, apesar de serem denominadas vitaminas, funcionalmente tratam-se de pré-hormônios (19). A obtenção da vitamina D pelo organismo humano pode ocorrer pela dieta (D₂ e D₃) ou ainda por produção endógena (D₃). Na grande maioria dos vertebrados, incluindo os seres humanos, a maior fonte de vitamina D é obtida através da produção a partir da luz solar (20), sendo que apenas de 10 a 20% da vitamina D necessária às funções adequadas do organismo são adquiridas pela ingestão alimentar (18).

Porém a exposição excessiva ao sol não resultará em intoxicação por vitamina D, isto é evitado pela sua inativação (21), podendo ainda ser absorvida e armazenada nos adipócitos (21, 22). As principais fontes alimentares de vitamina D e os alimentos mais comumente ingeridos fortificados com a mesma estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Principais fontes alimentares e alimentos fortificados com vitamina D.

ALIMENTO	PORÇÃO	FORMA	QUANTIDADE APROXIMADA (UI)
Fontes Naturais			
Gema de ovo	Unidade	D ₂ e D ₃	20
Atum enlatado	100 g	D ₃	230
Óleo de fígado de bacalhau	Colher chá	D ₃	400 - 1000
Sardinha enlatada	100 g	D ₃	300
Salmão selvagem	100 g	D ₃	600 - 1000
Salmão de criação	100 g	D ₃	100 - 250
Salmão enlatado	100 g	D ₃	300 - 600
Cogumelo shiitake fresco	100 g	D ₂	100
Cogumelo shiitake seco ao sol	100 g	D ₂	1600
Alimentos fortificados			
Leite	240 mL	D ₃	100
Sucode laranja	240 mL	D ₃	100
Iogurte	240 mL	D ₃	100
Manteiga	100 g	D ₃	50
Margarina	100 g	D ₃	430
Queijo	85 g	D ₃	100

Ambas as formas da vitamina D são ativadas da mesma maneira, e diferem entre si estruturalmente pelo fato do ergocalciferol possuir um carbono a mais, uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 e um grupo metila no carbono 24 (Figura 3) (23).

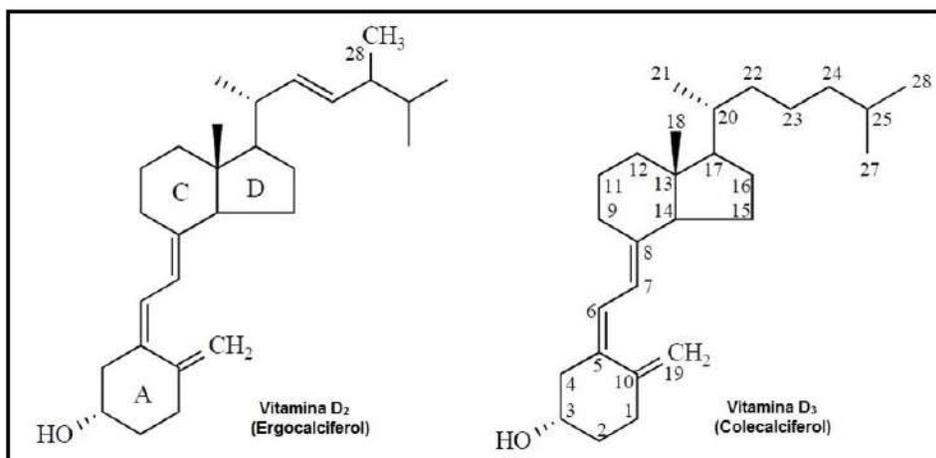


Figura 3: Forma estrutural da vitamina D, ergocalciferol e colecalciferol.

Tanto a vitamina D₂ quanto a D₃ sofrem hidroxilações que ocorrem em diferentes órgãos, com a finalidade de formar a vitamina D ativa, conforme demonstrado na Figura 4 (23). A exposição aos raios ultravioletas B (UVB) do sol, com comprimentos de onda que variam entre 270 e 300 nanômetros, leva a conversão fotolítica do 7-deidrocolesterol, presente nas camadas profundas da epiderme, em pré-vitamina D₃. Esta é termo instável e é imediatamente isomerizada pelo calor para assim, tornar-se estável, sendo denominada então colecalciferol. Após este processo tanto o colecalciferol quanto o ergocalciferol são incorporados a quilomícrons e alcançam a circulação sanguínea (24), onde são acoplados à proteína ligante da vitamina D (DBP, *vitamin D binding protein*) e chegam ao fígado a fim de sofrer a primeira hidroxilação (22). Este processo ocorre no carbono 25 através da ação da enzima 25-hidroxilase (CYP27A1, CYP2R1), formando a 25-hidroxivitamina D₃, 25(OH)D ou calcidiol (25).

Este metabólito é a forma mais abundante da vitamina D na circulação sanguínea e é estável devido sua afinidade pela DBP (26), porém é biologicamente

inativo, precisando ainda ser convertido, preponderantemente, nos rins em 1,25-diidroxivitamina D₃, 1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol (22). A enzima mitocondrial responsável por esta conversão é a 1 α -hidroxilase e está presente principalmente nas células dos túbulos contorcidos proximais dos rins (22). Alguns estudos revelam a presença desta enzima em tecidos extra renais, tais como intestino, pele, pâncreas, adipócitos, placenta, monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B (24, 25, 27 - 30). O gene codificador da 1 α -hidroxilase é o CYP27B1, o qual faz parte da família do citocromo P450, e três hormônios calcêmicos regulam sua transcrição, o hormônio paratireoídiano (PTH), o fator de crescimento fibroblástico-23 (FGF-23) e a própria 1,25(OH)₂D₃ (24). Os rins também são os principais responsáveis por degradar o calcitriol, através da 24-hidroxilase, enzima codificada pelo gene CYP24A1, e a própria vitamina D induz seu catabolismo (23).

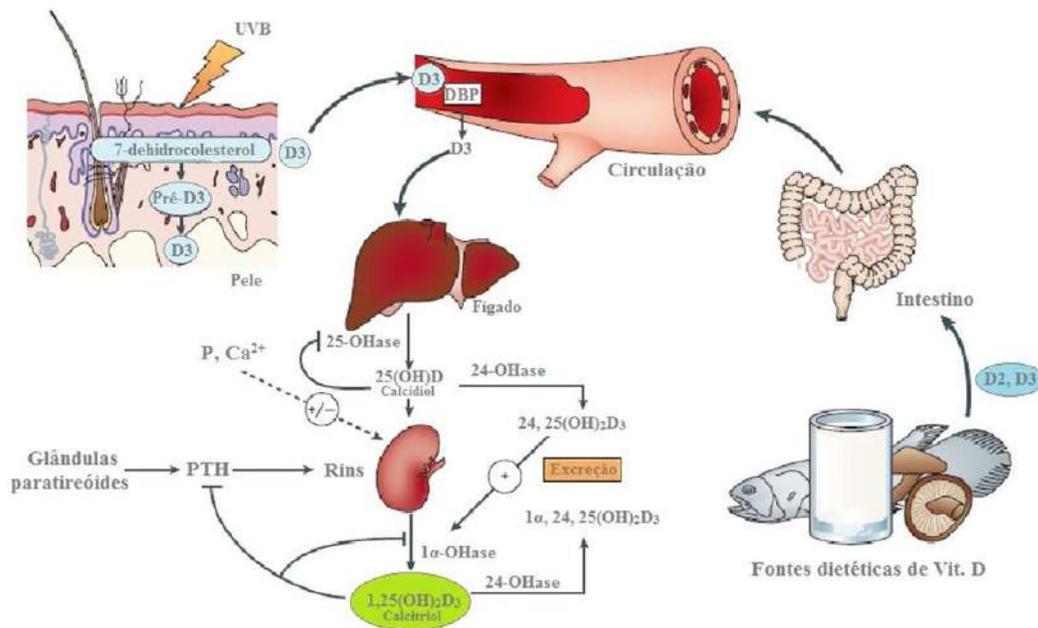


Figura 4: Metabolismo da Vitamina D.

A maior parte das atividades desempenhadas pela 1,25(OH)₂D₃ requerem a presença do receptor da vitamina D (VDR, *vitamin D receptor*) (27). Este pertence à superfamília de receptores nucleares (28) e está presente em praticamente todas as células nucleadas dos seres humanos (27).

Os membros desta família possuem a mesma estrutura molecular com vários domínios funcionais, domínio N-terminal (região A/B), um domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*, região C), uma região de dobradiça (região D) e um domínio de ligação do ligante (LBD, *ligand binding domain*, região E/F) (25). A região A/B é muito variável e é responsável pela ligação induzida pela transativação do VDR, já o domínio LBD é menos variável e encontra-se na região C-terminal do receptor (31). A ligação entre VDR e DBD resulta em uma estrutura composta por 66 aminoácidos conservados e 44 variáveis. Como o domínio dos receptores nucleares mais constante o DBD forma um dímero com o DNA, em uma interação proteína-proteína ou ligando-se à cavidade menor do DNA através de sua estrutura central, formado por dois dedos de zinco e uma estrutura C-terminal (CTE), local de interação com o receptor do retinóide X (RXR, *retinoid X receptor*) (31).

Para desempenhar suas funções no organismo, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ liga-se ao VDR e este complexo hormônio-receptor irá formar um heterodímero com o RXR. O heterodímero liga-se aos elementos responsivos à vitamina D (VDRE, *vitamin D responsive elements*) na região promotora dos genes-alvos, estabelecendo, assim, uma resposta biológica (28, 29). A resposta biológica pode ativar ou inibir a transcrição gênica, o que vai depender da presença de moléculas co-ativadoras ou co-repressoras (29, 30) na célula alvo.

1.3.1 Ações da vitamina D

A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é responsável pela regulação de mais de 5% dos genes do genoma humano, e destes, mais de 900 são seus alvos diretos (29). Estas ações genômicas da vitamina D resultam em mudanças na expressão de milhares de proteínas transcritas por RNAs e também em pós-transcritos (32), o que nos leva às diversas funções que este hormônio desempenha direta ou indiretamente.

Ações clássicas

A principal e mais conhecida função endócrina que a vitamina D desempenha é o ajuste do metabolismo mineral e ósseo, através da regulação do cálcio, em que rins, intestino, ossos e glândulas da paratireoide relacionam-se para garantir a

homeostase do organismo (Figura 5) (20). O calcitriol age nos enterócitos absorvendo o cálcio ativamente (duodeno) e passivamente (jejuno) (18). De forma ativa, o transporte de cálcio é atribuído a importantes proteínas (TRPV5, TRPV6, calbindinas, NCX1 e PMCA1b) que são transcritas através de estímulos da vitamina D (33).

O receptor sensível ao cálcio (CaSR) das células da paratireoide são capazes de identificar diminuições nos níveis sanguíneos de cálcio, levando à liberação de PTH na circulação (34). O PTH estimula a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nos rins, a qual inibe o próprio PTH para impedir absorção óssea, resultando em um importante *feedback* e evitando o hiperparatireoidismo secundário, muito comum na DRC (35).

O calcitriol aumenta a absorção intestinal de cálcio ao interagir com o complexo VDR-RXR, aumentando, dessa forma, a expressão dos canais, por onde o cálcio é passivamente transferido por gradiente de concentração para dentro dos enterócitos, e da calbindina 9K, uma proteína transportadora ligante de cálcio. VDRs presentes nos osteoblastos ligam-se à $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, elevando a expressão do ligante do receptor nuclear ativador do NF- κ B (RANKL), que ao ligar-se com RANK, induz a maturação dos osteoclastos. Estas células mantêm níveis adequados de cálcio e fósforo no sangue ao retirar estes elementos dos ossos, de modo que haja equilíbrio e mineralização apropriados (34).

Porém, a própria $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ diminui sua síntese através de um *feedback* negativo, catabolizando seus excessos em ácido calcitróico, o qual será excretado pela bile (34, 35). Outro potente regulador negativo do calcitriol é o FGF-23, o qual diminui a expressão de CYP27B1 e aumenta a expressão de CYP24A1, e consequentemente de $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ (38).

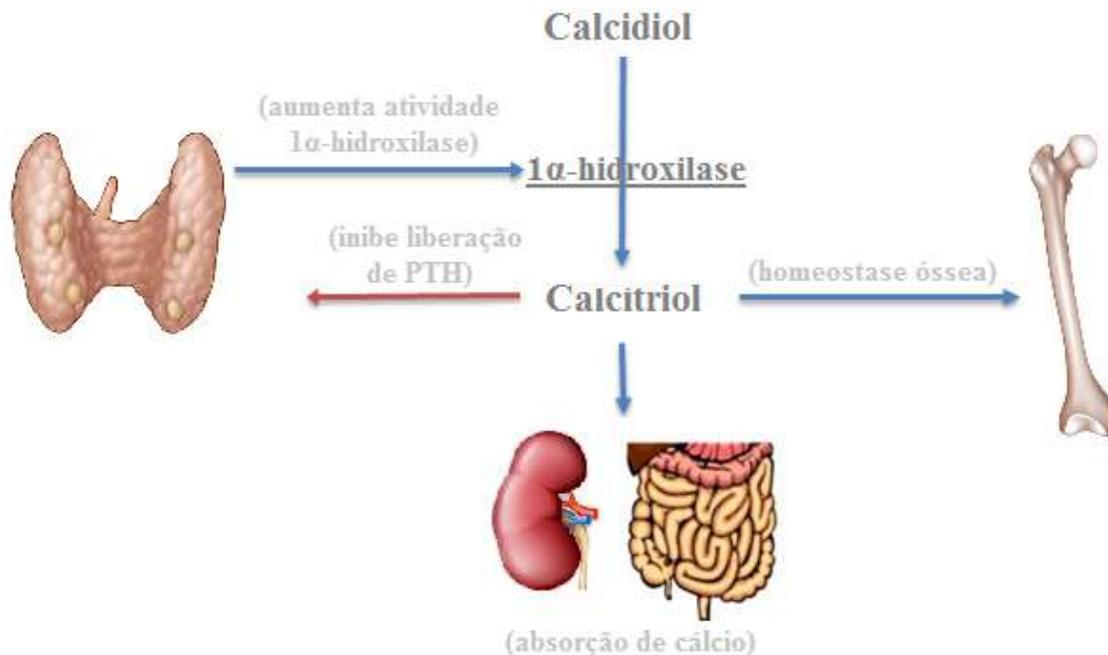


Figura 5: Ações clássicas da vitamina D.

Ações não clássicas

A 1α -hidroxilase e o VDR estão presentes não apenas em tecidos que regulam o metabolismo do cálcio, mas também em vários tipos de células e tecidos do organismo humano, o que nos leva às funções pleiotrópicas que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ desempenha.

Sistema Nervoso - A abundância da 1α -hidroxilase e do VDR em diversas regiões do cérebro humano, tanto em células neuronais quanto em células da glia, indicam uma produção local de vitamina D (39). Há trabalhos que relatam a função reguladora da vitamina D sobre o gene da tirosina hidroxilase, responsável pela ativação da dopamina, na medula adrenal (40) e a interação com neurotransmissores (41), sugerindo um importante papel na função neurológica.

Células β -pancreáticas - Níveis de vitamina D e desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo 2 possuem uma correlação inversa entre si (42). Este panorama pode ser explicado tanto pelo fato da vitamina D exercer uma ação positiva sobre a função das células β -pancreática (43), como pelo efeito protetor sobre estas células produtoras de insulina contra respostas imunes exacerbadas, o

que ocorre devido à ação do calcitriol em diferentes células imunes. Além disso, este hormônio inibe a síntese de renina desencadeando o aumento da produção de insulina (37).

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) - O SRAA tem um papel crucial na regulação da pressão sanguínea e homeostase eletrolítica, sendo que se ativado inapropriadamente, pode desencadear hipertensão (37). Já foi descrito que a vitamina D pode suprimir o gene que expressa a renina, responsável por clivar o precursor da angiotensina II – agente desencadeador de vasoconstrição e consequente hipertensão, o que explica a correlação inversa entre $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e pressão sanguínea (36).

Sistema Reprodutivo - A presença do VDR nos ovários, útero, placenta e testículos, sugere uma interferência da vitamina D na fisiologia reprodutiva (44). Bloomberg e colaboradores compararam um grupo de homens sub-férteis e outro de homens saudáveis, mostrando que no primeiro grupo havia uma diminuição na expressão de CYP24A1 e VDR, além disso, esta expressão foi correlacionada positivamente com concentração, motilidade e morfologia espermática (45). Em relação ao sistema reprodutivo feminino, alguns estudos intervencionais mostraram correlações positivas entre níveis de vitamina D e normalização do ciclo menstrual em mulheres com síndrome do ovário policístico (46), níveis adequados de testosterona circulante (47) e melhora nos parâmetros de foliculogênese e ovulação (48), sugerindo o efeito positivo do calcitriol no sistema reprodutivo humano.

Sistema Imune - Evidências indicam que a vitamina D tem um importante papel na regulação do sistema imune, inato e adaptativo (Figura 6), o que pode ser comprovado pela presença do VDR na maioria das células imunes, incluindo linfócitos T (CD4^+ e CD8^+), monócitos, macrófagos e células dendríticas (49). A presença do VDR também em células inflamatórias ativadas, inibição de linfócitos T pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e produção deste hormônio por macrófagos são outros fatores que apontam para a importância da vitamina D no sistema imunológico (50).

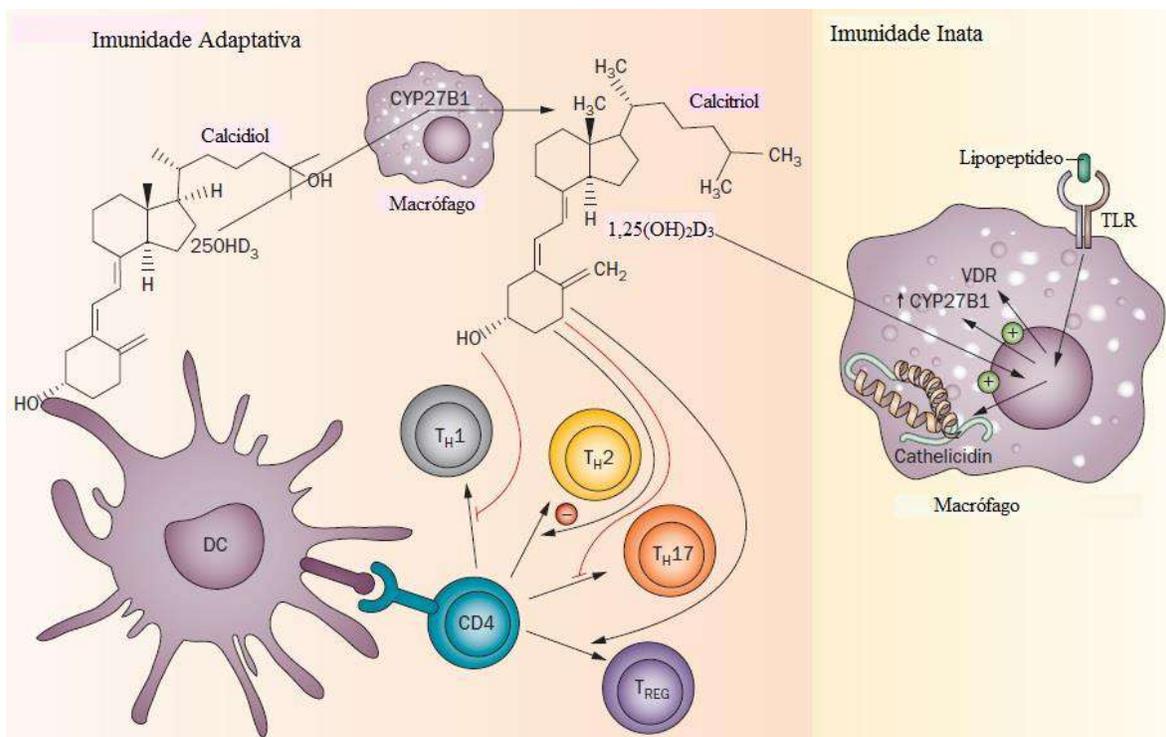


Figura 6: Funções da vitamina D no sistema imune inato e adaptativo.

A resposta imune inata participa da ativação de receptores do tipo *Toll* (TLR, *Tolllike receptor*) pelos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*), em células polimorfonucleares, monócitos, macrófagos e diversas células epiteliais (49)(51). Sabe-se que monócitos e macrófagos possuem a enzima 1α -hidroxilase, a qual tem sua plena função quando em níveis adequados de calcitriol, para assim obter a forma ativa da vitamina D, cujos efeitos autócrinos e parácrinos interferem na ação dessas células do sistema imune inato (52). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promove a diferenciação de monócitos em macrófagos (53), porém inibe a maturação de células dendríticas por impedi-las de realizar a apresentação antigênica, reduzindo a liberação de citocinas (54). Algumas citocinas e agonistas de TLR regulam a atividade de CYP27B1 em determinadas células (55).

Quando expostos a baixos níveis de calcitriol, ocorre um comprometimento da função fagocitária dos macrófagos, com menor resposta bactericida quando comparada a indivíduos com níveis normais (54, 55). Ainda em macrófagos, a

ativação do heterodímero TLR 1/2 pelo *Mycobacterium tuberculosis* resulta na regulação positiva do VDR e do CYP27B1, levando à indução da transcrição do gene que codifica a catelicidina, eliminando o patógeno (56, 57). A catelicidina é um peptídeo antimicrobiano que exerce uma ampla atividade contra inúmeros microrganismos patogênicos, bactérias gram positivas e negativas, e sua deficiência leva a uma série de complicações infecciosas (60). Há um estudo que mostra pacientes em quadros de septicemia apresentando baixos níveis de vitamina D e de catelicidina, além de alta mortalidade (55). Essa correlação entre níveis de catelicidina e mortalidade por causa infecciosa também foi observada em pacientes em hemodiálise (61).

A resposta imune adaptativa tem início com células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos, estas células são responsáveis por apresentar antígenos que serão especificamente reconhecidos por linfócitos T e B (62). A vitamina D no sistema imune adaptativo parece ter um papel inibitório (63), levando-se em conta que ela interfere na maturação de células dendríticas por agir na inibição da expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) do tipo II (HLA-DR) e de moléculas coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86), necessários para ativação de células T (64, 65). Na presença de níveis adequados de calcitriol há diminuição de citocinas responsáveis pela ativação de células T auxiliares (Th1 e Th17), aumento da produção de Th2 e aumento da função de células T regulatórias (Tregs) (66)(67).

Após uma resposta inflamatória adequada, faz-se necessário um mecanismo de feedback negativo, para que a inflamação não se torne persistente e leve a consequências prejudiciais ao organismo. Para tanto, o complexo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR regula a inflamação modulando a sinalização dos TLRs, pela regulação negativa do miRNA-155, estimulando o supressor de sinalização de citocinas 1 (SOCS1), inibindo a fosforilação de p38 MAPK e a ativação do sinal do NF- κ B em macrófagos humanos (68). Essas medidas irão minimizar a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, e MCP-1, levando a uma diminuição do recrutamento de monócitos e macrófagos (49). Visto isso, fica claro

que a vitamina D possui potentes efeitos imunomodulatórios tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo.

1.4 Vitamina D e DRC

Deficiência e insuficiência de vitamina D, definidas, respectivamente, por níveis séricos de 25(OH) vitamina D (25D) <15 ng/mL e entre 16–29 ng/mL, são comuns na população geral, mesmo em um país considerado ensolarado como o Brasil (69). Diversos estudos mostram a importante influência da deficiência da vitamina D sobre a DRC. Como descrito anteriormente, a vitamina D desempenha funções clássicas e não clássicas no organismo e os rins têm um papel central no seu metabolismo e regulação de seus níveis circulantes, conseqüentemente, uma função renal reduzida leva à deficiência da vitamina D, como observado em doentes renais crônicos (70), onde de 70 a 100% dessa população é acometida (71). Este grupo de doentes possui ainda a peculiaridade de apresentar, além da redução dos níveis de vitamina D, uma incapacidade de converter a 25(OH)D em sua forma ativa, a 1,25(OH)₂D, a qual se liga ao receptor de vitamina D (VDR) para exercer suas ações (72). Alguns dos motivos que levam à essa deficiência nos pacientes renais crônicos estão especificados na Tabela 2 (73).

Tabela 2: Motivos que levam à deficiência de vitamina D na DRC.

DEFICIÊNCIA DE CALCIDIOL	Diminuição de alimentos ricos em vitamina D, perda de DBP através da proteinúria
DEFICIÊNCIA DE CALCITRIOL	Diminuição de calcidiol, menor disponibilidade de 1 α -hidroxilase por hiperfosfatemia e FGF-23, aumento da degradação de calcitriol por PTH e FGF-23
RESISTÊNCIA AO CALCITRIOL	Diminuição da expressão do VDR das glândulas paratireoides, redução na ligação de vitamina D ao receptor

1.5 Monócitos

Monócitos, macrófagos e células dendríticas integram o sistema fagocítico mononuclear, o qual pertence à imunidade inata e que promove assistência à adaptativa e mantem a homeostase tecidual. O sistema imune inato reconhece organismos patogênicos e desencadeia uma sequência de eventos que resulta na produção e secreção de citocinas e também na ativação de macrófagos e monócitos (74).

Os monócitos são células circulantes que representam de 5 a 10% dos leucócitos totais, além de serem os precursores mielóides responsáveis pela renovação de macrófagos e células dendríticas (56). Compreendem uma população celular heterogênea, integrando três subpopulações, as quais podem ser classificadas de acordo com a expressão de receptores na superfície celular: clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (75).

Cada uma destas subpopulações desempenha diferentes funções no organismo, o que pode ser explicado por diferirem em seus perfis de metilação de DNA (76). Há evidências de que, após formação na medula óssea, os monócitos circulam na corrente sanguínea como clássicos, para em situações, não totalmente esclarecidas, diferenciarem-se em intermediários e/ou em não clássicos (59), o que pode ocorrer pela diferente expressão de miRNA, que controlam a diferenciação de células levando a diferentes populações leucocitárias (77). Os monócitos clássicos podem invadir tecidos inflamatórios e diferenciarem-se em macrófagos e/ ou células dendríticas. Porém, tanto monócitos intermediários quanto não clássicos não conseguem realizar a renovação de macrófagos e células dendríticas ao invadirem o conjuntivo através do endotélio vascular (78).

Os monócitos intermediários têm sido caracterizados como pró inflamatórios e potenciais biomarcadores de risco cardiovascular (77). Isso pode ser comprovado por alguns fatores: (i) alta produção de EROs e mediadores inflamatórios, como TNF e IL1 β ; (ii) regulação de uma variedade de receptores de quimiocinas importantes para o desenvolvimento da aterosclerose, como CCR2, CCR5 e CX3CR1; (iii) capacidade pro angiogênica, comprovada pela expressão de TIE-2,

VEGFR e endoglina (CD105) (78). Estas células ainda expressam altos níveis de moléculas do MHC de classe II (HLA-DR) e de moléculas de superfície como CD40, CD54 e CD74 (73, 74), revelando um papel destas células na apresentação antigênica.

1.5.1 Monócitos e DRC

A disfunção imune resultante da uremia, presente nos doentes reais crônicos, pode ser caracterizada tanto por imunoativação quanto por imunossupressão. Monócitos possuem um papel muito importante tanto na aterogênese, por expressarem moléculas de adesão, quanto nas respostas infecciosas, e já está bem estabelecido que diante de um estado urêmico há distúrbios funcionais e de distribuição das suas subpopulações (66) .

Trabalhos mostraram tanto *in vivo* quanto *in vitro* que em condições urêmicas, há um aumento significativo de monócitos intermediários quando comparado com condições fisiológicas, além de ocorrer aumento na produção de EROs e na fagocitose (58)(78). Outros trabalhos mostraram a eficiência da hemodiálise em decrescer por um certo período as quantidades de monócitos CD16+ (66, 67, 79), porém pacientes submetidos a esse procedimento apresentam maiores quantidades destas células quando comparados a pacientes com DRC em tratamento conservador ou em diálise peritoneal (80)(81).

Em doentes renais crônico nos estádios 3, 4 e 5, monócitos apresentaram maior propensão a sofrer apoptose e desenvolver atividades pro-inflamatórias mais acentuadas (82)(63). Pacientes com DRC apresentam maiores quantidades de monócitos CD16+ tanto no sangue periférico quanto no interstício inflamatório, além de alterações em determinadas citocinas (TNF- α e IL-10), diminuindo a resposta imune, levando estes pacientes à maior susceptibilidade infecciosa e inflamação crônica, com conseqüente aumento da mortalidade por sepse e/ ou pneumonia (9). Visto isso, pode-se dizer que monócitos de doentes renais crônicos em estágios mais avançados apresentam uma diversidade funcional interessante, algumas aumentadas e outras minimizadas. De um lado, há uma produção aumentada de citocinas como TNF- α , IL-1 β ou IL-8 e IL-6 quando em condições de repouso do

organismo, revelando um estado crônico de ativação monocitária. Por outro lado, há uma diminuição em suas respostas pela falta de controle próprio, levando a uma falha funcional (82).

2 JUSTIFICATIVA

Até o presente momento, não há evidências de correlação entre presença de monócitos intermediários e níveis de vitamina D na população de doentes renais crônicos. Portanto, o presente projeto foi desenhado de forma a contribuir com dados de níveis de vitamina D e sua influência na modulação das diferentes populações monocitárias em pacientes renais crônicos em hemodiálise, sendo um fator importante para a compreensão do processo inflamatório crônico presente nos mesmos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar os subtipos de monócitos de pacientes renais crônicos em hemodiálise de acordo com níveis séricos de vitamina D.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as diferentes subpopulações de monócitos em doentes renais crônicos em hemodiálise conforme níveis de vitamina D;
- Avaliar o perfil oxidativo de monócitos em pacientes renais crônicos em hemodiálise em relação aos níveis de vitamina D;
- Analisar a apoptose monocitária de acordo com níveis de vitamina D em doentes renais crônicos em hemodiálise.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Participantes

Foram selecionados pacientes renais crônicos em hemodiálise convencional no centro de diálise da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba e do Instituto do Rim do Paraná. O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – número do parecer 1.682.929 (Anexo 1). Os critérios de inclusão foram ser portador de DRC e estar em hemodiálise há pelo menos três meses, idade maior ou igual a 18 anos e ser apto a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). Os critérios de exclusão foram doença infecciosa crônica (exemplo: hepatite B, hepatite C e HIV), infecção aguda há menos de um mês, diferente doença inflamatória crônica (exemplo: doença intestinal inflamatória, lúpus, artrite reumatoide), câncer, PTH intacto > 600 pg/mL, uso de cinacalcete, hipercalcemia e/ou hiperfosfatemia severas (Ca > 10,02 mg/dL e P > 6,2 mg/dL), paratireoidectomia prévia, transplante renal prévio, uso de medicação imunossupressora, ser gestante ou lactante.

4.2 Protocolo de estudo

Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a mediada dos níveis séricos de vitamina D (25OH).

- Grupo 1: Níveis séricos de 25(OH)D < 26 ng/mL, (n=15);
- Grupo 2: Níveis séricos de 25(OH)D ≥ 26ng/mL, (n=18).

4.3 Parâmetros Laboratoriais

Amostras de sangue periférico foram coletadas para dosagem de colecalciferol pelo método de quimiluminescência (DB – Diagnósticos do Brasil). Cálcio e fósforo séricos foram mensurados através de método colorimétrico. O PTH intacto (iPTH) sérico foi avaliado através do método de imunoquimioluminescência.

4.4 Avaliação de monócitos, apoptose e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O sangue periférico coletado dos pacientes em tubo citrato (BD Vacutainer) foi utilizado para análise da expressão das subpopulações de monócitos. As amostras de sangue total (300 µL mL) foram incubadas por 8 minutos em solução de tampão de lise, 1:10, (6 mL) e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. O sedimento celular (*pellet*) formado foi ressuscitado em Tampão Tris, contendo 5,5 mM de Glucose, sendo separado em: Tubo Controle (somente tampão); Tubo MO onde foi realizada a marcação celular com anticorpos CD14-FITC e CD16-PE (BD Bioscience); Tubo Apoptose onde as células foram previamente ressuscitadas em *Anexin Binding Buffer* e marcadas com Anexina-PE e 7AAD (BD Bioscience) e Tubo ERO onde foi realizada a marcação com *2',7'-Dichlorofluorescein diacetate* (DCFH-DA; Sigma Aldrich).

Os primeiros dois tubos de cada paciente foram incubados por 30 minutos a 20°C, os tubos contendo anexina e 7AAD foram incubados por 15 minutos também a 20°C e o tubo contendo a sonda DCFH-DA foi incubado por 30 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Após a incubação foi adicionada solução FixFacs (paraformaldeído 4% em tampão fosfato PBS) para então ser realizada a análise através da citometria de fluxo (FACs Calibur).

Para realizar a identificação das subpopulações monocitárias, estas células foram delimitadas em *gates* de acordo com a expressão de receptores de superfície, LPS e FcγIIIR. Na Figura 6 pode-se observar como foi realizada tal fenotipagem.

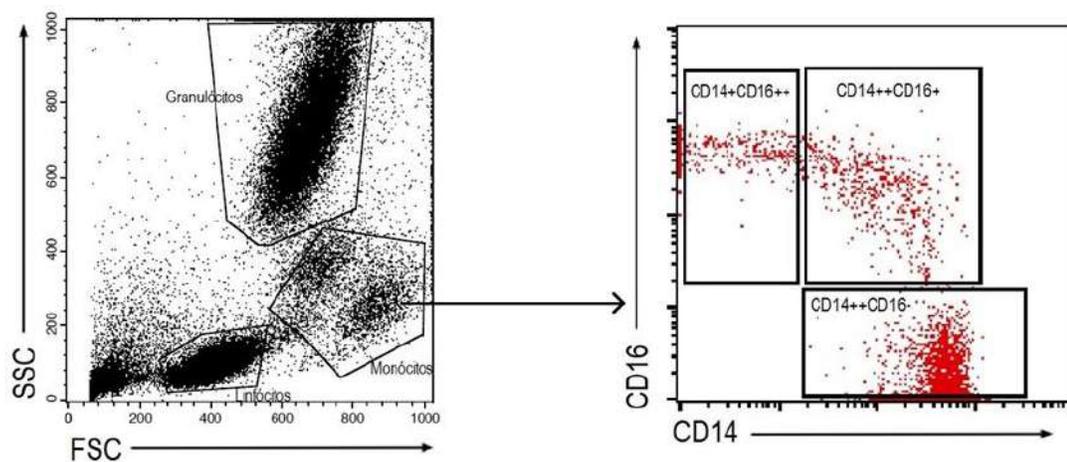


Figura 7: Identificação das subpopulações monocitárias.

4.5 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise de comparação entre os diferentes grupos, no que diz respeito às variáveis quantitativas foi utilizado o teste t de Student. Para as variáveis dicotômicas, a análise de comparação foi realizada através do teste de qui-quadrado. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Características demográficas

Não houve diferença estatística significativa entre gênero, raça, idade, tempo em hemodiálise e tabagismo. Porém, no grupo que apresentava menores níveis de vitamina D, havia um maior número de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2, sendo estatisticamente significativo (Tabela 3).

5.2 Marcadores do metabolismo mineral e ósseo

Níveis de fósforo e de iPTH séricos não diferiram significativamente entre os grupos, o mesmo não aconteceu com os níveis de cálcio, que foram significativamente menores no grupo com menor concentração de vitamina D (Tabela 3).

Tabela 3: Características demográficas e marcadores do metabolismo mineral e ósseo.

	GRUPO 1 (N= 15)	GRUPO 2 (N= 18)	P
GÊNERO (%)			
MASCULINO	47	83	0,06
FEMININO	53	17	
IDADE	58 ± 13,83	61 ± 13,16	0,57
TEMPO EM HD (MESES)	33,13 ± 26,56	65,11 ± 66,52	0,091
PRESENÇA DE DM2 (%)	46,7	11,1	0,047
TABAGISMO (%)	6,7	16,7	0,61
PTH	171,11 ± 88,97	198,72 ± 87,46	0,38
CÁLCIO	8,84 ± 0,39	9,36 ± 0,72	0,018
FÓSFORO	4,92 ± 1,0	4,93 ± 1,1	0,971

5.3 Subpopulações monocitárias

Aumento significativo na expressão de monócitos intermediários (34,7 ± 31,6 vs 12,1 ± 6,3; p= 0,006) e diminuição de clássicos (45,3 ± 31,8 vs 70,4 ± 25,1; p= 0,017) foi observado no Grupo 1 quando comparado com o Grupo 2. Não houve

diferença entre os grupos em relação aos monócitos não clássicos (Grupo 1: $2,4 \pm 3,7$ vs Grupo 2: $1,2 \pm 1,9$; $p= 0,24$) (Figura 7).

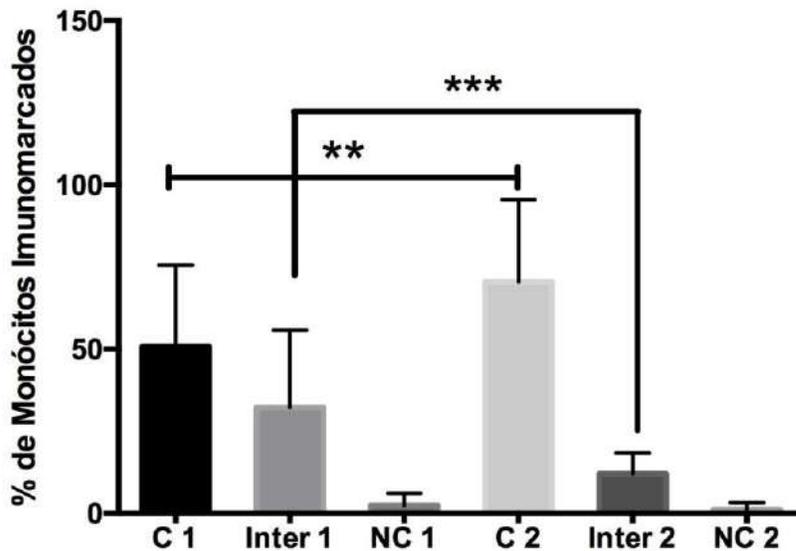


Figura 8: Diferença das subpopulações monocitárias entre pacientes com diferentes níveis de vitamina D. (C1: monócitos clássicos; Inter 1: monócitos intermediários e NC 1 monócitos não clássicos) do Grupo 1 – menores níveis de vitamina D; C2, Inter 2 e NC 2 – subtipos de monócitos para o Grupo 2 – maiores níveis de vitamina D. ** $p < 0,05$; *** $p < 0,01$).

5.4 Apoptose e Produção de EROs

Não houve diferença entre os grupos em relação à expressão de fosfatidilserina pelos monócitos (Grupo 1: $26,1 \pm 18,7$ vs Grupo 2: $30,9 \pm 23,8$; $p= 0,53$) (Figura 8A), bem como em relação à produção de espécies reativas de oxigênio (Grupo 1: $63,7 \pm 27,1$ vs Grupo 2: $58,3 \pm 21,02$; $p=0,52$) (Figura 8B).

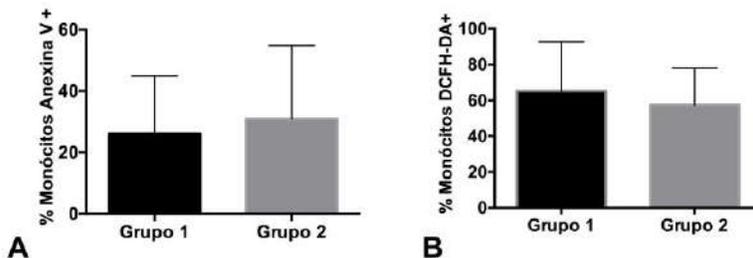


Figura 9: A: Diferença de apoptose entre pacientes menor ou maior níveis de vitamina D. B: Diferença no estresse oxidativo entre pacientes com menor ou maior níveis de vitamina D.

6 DISCUSSÃO

O crescente interesse pela vitamina D tem-se dado não apenas por suas já conhecidas funções clássicas, relacionadas ao metabolismo mineral e ósseo, mas também devido às ações pleiotrópicas que esse pré-hormônio desempenha. Estudos vêm demonstrando a função da vitamina D em células do sistema imune e, dentre elas, uma se destaca por suas importantes funções no organismo, o monócito. Esta célula desempenha algumas funções possivelmente auxiliadas pela vitamina D e isto pode ser fundamentado pelo fato de possuir todo o maquinário necessário para conversão (1α -hidroxilase), além de expressar o receptor da vitamina D (VDR) (83).

Entre a população estudada no presente trabalho, não houve diferenças estatísticas no que diz respeito à idade, gênero, tabagismo, tempo em hemodiálise e parâmetros laboratoriais, como fósforo e iPTH. O mesmo não aconteceu com níveis séricos de cálcio, que se apresentaram significativamente mais baixos em pacientes com menores níveis de vitamina D. Este último dado corrobora com a literatura, como mostrou Kim e colaboradores (84), que ao suplementarem doentes renais crônicos com níveis séricos de vitamina D menores que 30 ng/mL observaram um aumento significativo em níveis séricos de cálcio após 3 e 6 meses de intervenção com colecalciferol. O mesmo ocorreu no estudo de Marckmann e colaboradores, no qual pacientes com doença renal crônica, em hemodiálise e em estágios conservadores, foram suplementados também com colecalciferol e mostraram um aumento em níveis séricos de cálcio (85).

O papel da vitamina D no sistema imune já está bem descrito, apesar de não se conhecerem com precisão todas as suas vias de ação. Os resultados aqui apresentados mostram que pacientes com níveis séricos de vitamina D diminuídos apresentam maior porcentagem de monócitos intermediários e por outro lado, menor porcentagem de monócitos clássicos, o que sugere uma modulação entre os padrões celulares de acordo com o ambiente interno em que as células se encontram. Conhecidos como monócitos pró-inflamatórios, estas células intermediárias podem contribuir com o estado inflamatório aumentado na população renal crônica, e com mais intensidade em indivíduos com níveis inferiores de

vitamina D. Pacientes renais crônicos em diferentes estágios da doença possuem número aumentado dos monócitos intermediários de maneira crescente à progressão da doença, como foi mostrado por Bonan e colaboradores (88), não levando em consideração os níveis de vitamina D. Nossos resultados intensificam esses dados, uma vez que revelam a presença aumentada desse tipo celular inflamatório em relação ao monócito clássico e que este aumento é significativamente maior em pacientes com níveis muito baixos de vitamina D.

Stubbs e colaboradores mostraram que ao suplementar pacientes renais crônicos em HD com colecalciferol ocorreu um aumento da expressão de VDR, principalmente em monócitos CD16 positivos, que possuem um perfil pró-inflamatório, com conseqüente diminuição dos marcadores inflamatórios séricos IL-6, IL-8 e de TNF- α (89). Da mesma forma, um aumento na expressão de VDR e de CYP27B1 em monócitos foi observado em estudo conduzido por Meireles e colaboradores, mostrando que a repleção de 25(OH) $_2$ D $_3$ regula positivamente a expressão desses fatores. O trabalho revelou ainda, uma conseqüente diminuição de marcadores inflamatórios na circulação (85). Alvarez e colaboradores confirmaram que a suplementação adequada de vitamina D em doentes renais crônicos, em estágios iniciais, levam a uma diminuição sérica de MCP-1, quimiocina pró-inflamatória (90), inculindo mais uma vez a participação da vitamina D no sistema imunológico através de monócitos.

Nosso estudo não mostrou diferenças entre os grupos em relação à apoptose, ou seja, expressão de fosfatidilserina na superfície dos monócitos, bem como, não observamos diferença significativa entre os grupos em relação a produção de EROs. Outro estudo *in vitro*, mostrou uma diminuição da apoptose quando na presença de vitamina D (91) e ainda, já foi observado que ao se tratar monócitos submetidos à glutathione com a 1,25(OH) $_2$ D $_3$, ocorre uma diminuição da liberação de EROs (92). Esta pode ser considerada outra limitação do nosso estudo, uma vez que não houve realização de cálculo amostral prévio ao início do estudo, o que provavelmente comprometeu os resultados funcionais dessas células.

Portanto, mesmo com limitações, este é o primeiro relato que demonstra a relação entre níveis de vitamina D e a modulação de monócitos clássicos em

intermediários ou pró-inflamatórios. Não podemos inferir se a vitamina D tem uma atividade direta nessa modulação, mas podemos sugerir que essa importante molécula possui alguma função inibitória na modulação de células clássicas em inflamatórias.

Assim, nossos resultados sugerem que a presença de vitamina D pode ter um caráter protetor ao modular ou diminuir a quantidade de monócitos inflamatórios.

7 LIMITAÇÕES

1. Não realização do cálculo amostral;
2. Não realização de pareamento entre grupos em relação à presença de diabetes *melittus* do tipo 2;
3. Seleção de pacientes com níveis de PTH intacto menor igual a 600pg/mL.

8 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, podemos inferir que pacientes com menores níveis de vitamina D possuem quantidades significativamente maiores de monócitos intermediários e menores de clássicos, quando comparados a pacientes com maiores níveis de vitamina D

Entretanto, não houve diferença significativa entre os pacientes quando níveis de vitamina D foram avaliados em relação à apoptose e estresse oxidativo.

9 REFERÊNCIAS

1. Journal O, The OF, Society I, Nephrology OF. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 2013;3(1):Supplement.
2. Glassock RJ, Warnock DG, Delanaye P. The global burden of chronic kidney disease: estimates, variability and pitfalls. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2016.163>
3. Webster AC, Nagler E V, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* [Internet]. 2016;6736(16):1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27887750><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616320645>
4. Morton RL, Schlackow I, Mihaylova B, Staplin ND, Gray A, Cass A. The impact of social disadvantage in moderate-to-severe chronic kidney disease: An equity-focused systematic review. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(1):46–56.
5. Lugon J. End-Stage Renal Disease and Chronic Kidney Disease in Brazil. *Ethn Dis* [Internet]. 2009;19(1):7–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484865>
6. Vassalotti JA, Centor R, Turner BJ, Greer RC, Choi M, Sequist TD. Practical Approach to Detection and Management of Chronic Kidney Disease for the Primary Care Clinician. *Am J Med* [Internet]. 2016;129(2):153–162.e7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934315008554>
7. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system. *Circulation.* 2007;116(1):85–97.
8. Tonelli M, Wiebe N, Culeton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic Kidney Disease and Mortality Risk: A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006;17(7):2034–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738019><http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2005101085>
9. Wallquist C, Paulson JM, Hylander B, Lundahl J, Jacobson SH. Increased Accumulation of CD16+ Monocytes at Local Sites of Inflammation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Scand J Immunol.* 2013;78(6):538–44.
10. Vanholder R, De Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(8):1815–23.
11. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J,

- et al. A bench to bedside view of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2008;19(5):863–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287557>
12. Suliman ME, Stenvinkel P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* [Internet]. 2008;19(3):329–45. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-53949083575&partnerID=40&md5=070a6864ba92c069727fbb7e02612e0c>
 13. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H, Macleod B, Salem DN, Griffith JL, et al. Level of Kidney Function as a Risk Factor for Atherosclerotic Cardiovascular Outcomes in the Community. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2003;41(1):47–55. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)02663-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(02)02663-3)
 14. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF- α : Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*. 2005;67(4):1216–33.
 15. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I. Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients. *Semin Dial*. 2007;20(5):440–51.
 16. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2006;69(11):1945–53.
 17. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* [Internet]. 2006;71(1):31–8. Available from: <http://www.nature.com/ki/journal/v71/n1/full/5002009a.html> <http://www.nature.com/ki/journal/v71/n1/pdf/5002009a.pdf>
 18. Castro LCG de. The vitamin D endocrine system. *Arq Bras Endocrinol Metabol* [Internet]. 2011;55(8):566–75. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302011000800010&lang=pt <http://www.scielo.br/pdf/abem/v55n8/10.pdf>
 19. Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, Silva DMW, Borges JLC, Bandeira F, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabology (SBEM) for the diagnosis and treatment of hypovitaminosis D. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(5):411–33.
 20. Holick M. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266–81.

21. Rosenstreich SJ, Rich C, Volwiler W. Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat. *J Clin Invest*. 1971;50(3):679–87.
22. Holick MF. Vitamin D: evolutionary, physiological and health perspectives. *Curr Drug Targets*. 2011;12(1):4–18.
23. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2005;289:F8--F28.
24. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* [Internet]. 2014;21(3):319–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>
25. Rochel N, Wurtz JM, Mitschler a, Klaholz B, Moras D. The crystal structure of the nuclear receptor for vitamin D bound to its natural ligand. *Mol Cell*. 2000;5:173–9.
26. Jones G, Strugnell S a, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev*. 1998;78(4):1193–231.
27. Dusso AS. Kidney disease and vitamin D levels: 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, and VDR activation. *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2011;1(4):136–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/kisup.2011.30>
28. Choi M, Yamamoto K, Masuno H, Nakashima K, Taga T, Yamada S. Ligand recognition by the vitamin D receptor. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2001;9(7):1721–30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089601000608%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425573>
29. Gröschel C, Tennakoon S, Kállay E. Cytochrome P450 Vitamin D Hydroxylases in Inflammation and Cancer. *Adv Pharmacol*. 2015;74:413–58.
30. Issa LL, Leong GM, Eisman JA. Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm Res*. 1998;47(1998):451–75.
31. Wan L-Y, Zhang Y-Q, Chen M-D, Liu C-B, Wu J-F. Relationship of Structure and Function of DNA-Binding Domain in Vitamin D Receptor. *Molecules* [Internet]. 2015;20(7):12389–99. Available from: <http://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/12389/>
32. Campbell MJ. Vitamin D and the RNA transcriptome: More than mRNA regulation. *Front Physiol*. 2014;5 MAY(May):1–13.
33. Hoenderop JGJ, Nilius B, Bindels RJM. Calcium Absorption Across Epithelia. *Physiol Rev* [Internet]. 2005;85(1):373–422. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/85/1/373.abstract>
34. Canaff L, Hendy GN. Human calcium-sensing receptor gene. *J Biol Chem*.

2002;277(33):30337–50.

35. Vieth R, Ladak Y, Walfish PG. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):185–91.
36. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: A negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89–90:387–92.
37. Sung C-CC, Liao M-TT, Lu K-CC, Wu C-CC. Role of Vitamin D in Insulin Resistance. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012(Figure 1):1–11.
38. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, Van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, et al. Vitamin D and human health: Lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev.* 2008;29(6):726–76.
39. Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the Vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat.* 2005;29(1):21–30.
40. Stachowiak MK. Vitamin D increases expression of the tyrosine hydroxylase gene in adrenal medullary cells. *Mol Brain Res.* 1996;36:193–6.
41. Matkovits T, Christakos S. Ligand occupancy is not required for vitamin D receptor and retinoid receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol [Internet].* 1995;9(2):232–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7776973>
42. Parker J, Hashmi O, Dutton D, Mavrodaris A, Stranges S, Kandala NB, et al. Levels of vitamin D and cardiometabolic disorders: Systematic review and meta-analysis. *Maturitas.* 2010;65(3):225–36.
43. Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and β cell dysfunction. *Clin Nutr.* 2004;25(4):820–5.
44. Luk J, Torrealday S, Neal Perry G, Pal L. Relevance of vitamin D in reproduction. *Hum Reprod.* 2012;27(10):3015–27.
45. Blomberg Jensen M, Jørgensen A, Nielsen JE, Bjerrum PJ, Skalkam M, Petersen JH, et al. Expression of the vitamin D metabolizing enzyme CYP24A1 at the annulus of human spermatozoa may serve as a novel marker of semen quality. *Int J Androl.* 2012;35(4):499–510.
46. Thys-Jacobs S, Donovan D, Papadopoulos a, Sarrel P, Bilezikian JP. Vitamin D and calcium dysregulation in the polycystic ovarian syndrome. *Steroids.* 1999;64(6):430–5.
47. Selimoglu H, Duran C, Kiyici S, Ersoy C, Guclu M, Ozkaya G, et al. The

- effect of vitamin D replacement therapy on insulin resistance and androgen levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(4):234–8.
48. Rashidi B, Haghollahi F, Shariat M, Zayerii F. The Effects of Calcium-Vitamin D and Metformin on Polycystic Ovary Syndrome: A Pilot Study. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2009;48(2):142–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60275-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60275-8)
 49. Bikle DD. Vitamin D and the immune system: role in protection against bacterial infection. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(4):348–52.
 50. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science* (80-). 2006;311(March):1770–3.
 51. Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res*. 2014;7(1):69–87.
 52. Jeng L, Yamshchikov A V, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med* [Internet]. 2009;7:28. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2684740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 53. Naim MM. The non-calcitropic actions of vitamin d: recent clinical developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(4):408–15.
 54. Bar-shavitt Z, Teitelbaumt SL, Reitsmat P, Hallt ANN, Peggt LE, Trial J, et al. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80(October):5907–11.
 55. Bikle DD, Pillai S, Gee E, Hincenbergs M. Tumor necrosis factor-alpha regulation of 1,25-dihydroxyvitamin d production by human keratinocytes. *Endocrinology*. 1991;129(1):129–33.
 56. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71–82.
 57. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4(FRB):1–5.
 58. Zawada AM, Schneider JS, Michel AI, Rogacev KS, Hummel B, Krezdorn N, et al. DNA methylation profiling reveals differences in the 3 human monocyte subsets and identifies uremia to induce DNA methylation changes during differentiation. *Epigenetics*. 2016;11(4):259–72.
 59. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14 ++CD16 + monocytes as a third monocyte

subset. *Blood*. 2011;118(12):50–62.

60. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* [Internet]. 2001;414(6862):454–7. Available from: <http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6862/abs/414454a0.html%5Cnh> <http://www.nature.com/nature/journal/v414/n6862/pdf/414454a0.pdf>
61. Gombart AF, Bhan I, Borregaard N, Tamez H, Camargo C a, Koeffler HP, et al. Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;48(4):418–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133797>
62. Raj DS, Sterling KA, Eftekhari P, Girndt M, Kimmel PL, Raj DS. The immunoregulatory function of vitamin D: implications in chronic kidney disease. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2012;8(10):403–41293. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.93>
63. Dounousi E, Kolioussi E, Papagianni a, Ioannou K, Zikou X, Katopodis K, et al. Mononuclear leukocyte apoptosis and inflammatory markers in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* [Internet]. 2012;36(6):531–6. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84870292150&partnerID=40&md5=3d380089a2eb1750968df10ac9f3aa9a>
64. Van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: Basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005;97(1–2):93–101.
65. Seibert E, Levin NW, Kuhlmann MK. Immunomodulating effects of vitamin D analogs in hemodialysis patients. *Hemodial Int*. 2005;9(SUPPL. 1):25–9.
66. Sester U, Sester M, Heine G, Kaul H, Girndt M, Köhler H. Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2001;16(7):1402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427632>
67. Nockher WA, Wiemer J, Scherberich JE. Haemodialysis monocytopenia: Differential sequestration kinetics of CD14+CD16+ and CD14++ blood monocyte subsets. *Clin Exp Immunol*. 2001;123(1):49–55.
68. Chen Y, Liu W, Sun T, Huang Y, Wang Y, Deb DK, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D promotes negative feedback regulation of TLR signaling via targeting microRNA-155-SOCS1 in macrophages. *J Immunol* [Internet]. 2013;190(7):3687–95. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3608760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Unger MD, Cuppari L, Titan SM, Magalhães MCT, Sasaki AL, dos Reis LM, et al. Vitamin D status in a sunny country: Where has the sun gone? *Clin*

- Nutr. 2010;29(6):784–8.
70. Williams S, Malatesta K, Norris K. Vitamin D and chronic kidney disease. *Ethn Dis*. 2009;19(4 Suppl 5):S5-8–11.
 71. Cuppari L, Garcia-Lopes MG. Hypovitaminosis D in Chronic Kidney Disease Patients: Prevalence and Treatment. *J Ren Nutr* [Internet]. 2009;19(1):38–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2008.10.005>
 72. Brancaccio D, Cozzolino M, Pasho S, Fallabrino G, Olivi L, Gallieni M. New acquisitions in therapy of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease and peritoneal dialysis patients: Role of vitamin d receptor activators. *Contrib Nephrol*. 2009;163:219–26.
 73. Nigwekar SU, Tamez H, Thadhani RI. Vitamin D and chronic kidney disease-mineral bone disease (CKD-MBD). *Bonekey Rep* [Internet]. 2014;3(February):498. Available from: <http://www.nature.com/bonekeyreports/2014/140205/bonekey2013232/full/bonekey2013232.html>
 74. Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2002;72(4):621–7. Available from: <http://www.jleukbio.org/content/72/4/621.abstract>
 75. Ziegler-Heitbrock HWLW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today* [Internet]. 1996;17(9):424–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&opt=Citation&list_uids=8854561
 76. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74(7):2527–34.
 77. Zawada AM, Zhang L, Emrich IE, Rogacev KS, Krezdorn N, Rotter B, et al. MicroRNA profiling of human intermediate monocytes. *Immunobiology* [Internet]. 2016; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298516304351>
 78. Heine GH, Fliser The Fundación Jiménez Díaz D, Institutet K, Européen Georges Pompidou H, Heine GH, Ortiz A, et al. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2012;8(810):362–36941. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2012.41>
 79. Koc M, Toprak A, Arıkan H, Odabasi Z, Elbir Y, Tulunay A, et al. Toll-like receptor expression in monocytes in patients with chronic kidney disease and haemodialysis: relation with inflammation. *Nephrol Dial Transplant*

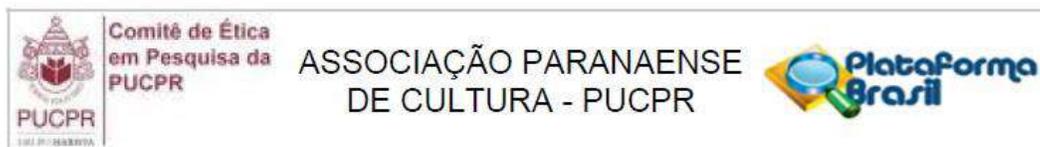
[Internet]. 2011;26(3):955–63. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729266>

80. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, et al. CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J*. 2011;32(1):84–92.
81. Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, et al. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* [Internet]. 2008;73(5):622–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160960>
82. Laudański K, Nowak Z. Aberrant function and differentiation of monocytes in end stage renal disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(6):453–9.
83. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):123–33.
84. Kim SM, Choi HJ, Lee JP, Kim DK, Oh YK, Kim YS, et al. Prevalence of Vitamin D Deficiency and Effects of Supplementation With Cholecalciferol in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Ren Nutr* [Internet]. 2014;24(1):20–5. Available from:
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L1052854801%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1053/j.jrn.2013.07.003%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=10512276&id=doi:10.1053%2Fj.jrn.2013.07.003&atitle=Prevalence+of+Vitami>
85. Marckmann P, Agerskov H, Thinesh Kumar S, Bladbjerg E-M, Sidelmann JJ, Jespersen J, et al. Randomized controlled trial of cholecalciferol supplementation in chronic kidney disease patients with hypovitaminosis D. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2012;27(9):3523–31. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22822092>
86. Eliades M, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes. *Clin Rev Bone Miner Metab* [Internet]. 2009;7(2):185–98. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.11.021>
87. Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2010;39(2):419–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889852910000150>
88. Bonan NB, Steiner TM, Kuntsevich V, Virzì GM, Azevedo M, Nakao LS, et al. Uremic Toxicity-Induced Eryptosis and Monocyte Modulation: The Erythrophagocytosis as a Novel Pathway to Renal Anemia. *Blood Purif*. 2016;41(4):317–23.
89. Stubbs JR, Idiculla A, Slusser J, Menard R, Quarles LD. Cholecalciferol

supplementation alters calcitriol-responsive monocyte proteins and decreases inflammatory cytokines in ESRD. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2010;21(2):353–61. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20007751

90. Alvarez JA, Zughair SM, Law J, Hao L, Wasse H, Ziegler TR, et al. Effects of high-dose cholecalciferol on serum markers of inflammation and immunity in patients with early chronic kidney disease. *Eur J Clin Nutr*. 2013;67(3).
91. Arfian NUR, Muflikhah K, Soeyono SRIK, Sari CR, Tranggono U, Anggorowati N, et al. Vitamin D Attenuates Kidney Fibrosis via Reducing Fibroblast Expansion , Inflammation , and Epithelial Cell Apoptosis. 2016;62(2):38–44.
92. Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013;437(1):7–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.004>

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VIVO E IN VITRO DA FUNÇÃO IMUNOMODULADORA DA VITAMINA D SOBRE A ATIVIDADE MONOCITÁRIA DE PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS COM DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D EM HEMODIÁLISE

Pesquisador: Fellype de Carvalho Barreto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41213215.3.0000.0020

Instituição Proponente: Associação Paranaense de Cultura - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.682.929

Recomendações:

Sem recomendações relevantes

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências nem inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
nascido na data _____, de nacionalidade _____,
portador do RG _____, estou sendo convidado a
participar de um estudo denominado “Avaliação in vivo e in vitro da função
imunomoduladora da vitamina D sobre a atividade monocitária de pacientes renais
crônicos com deficiência de vitamina D em hemodiálise”, cujos objetivos e
justificativas são avaliar o sistema imune dos pacientes renais em hemodiálise
através da suplementação oral com a vitamina D ou placebo.

A minha participação no referido estudo será no sentido de doar sangue a cada
três meses e tomar vitamina D semanalmente por seis meses.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios,
tais como apresentar suficiência de vitamina D e melhorar meu sistema imune.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis
desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma
pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a
sua realização.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou
qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar,
será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar
meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar
sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho
recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Felype de Carvalho
Barreto e Ana Clara S F Almeida e com eles poderei manter contato pelos
telefones 9534 8228 e 9662 4918 respectivamente.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido
o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo

