

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

***TESE DE ALUNO DE DOUTORADO***

**Hipovitaminose D e sua Suplementação com  
Colecalciferol: Efeitos em Marcadores do Metabolismo  
Mineral, Biomarcadores Inflamatórios e em Variáveis  
Ecocardiográficas de Pacientes em Hemodiálise**

**Aluno: Sérgio Gardano Elias Bucharles**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho**

Curitiba, 26 de Novembro de 2010

**Sérgio Gardano Elias Bucharles**

Hipovitaminose D e sua Suplementação com Colecalciferol: Efeitos em Marcadores do Metabolismo Mineral, Biomarcadores Inflamatórios e em Variáveis Ecocardiográficas de Pacientes em Hemodiálise

*Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.*

*Orientador: Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho*

*Co-orientador: Dr. Silvio Henrique Barberato*

**Curitiba, Novembro de 2010**

## **Lista de Abreviaturas**

---

**DRC** – Doença Renal Crônica

**TFG** – Taxa de Filtração Glomerular

**VE** – Ventrículo Esquerdo

**HVE** – Hipertrofia de Ventrículo Esquerdo

**HD** – Hemodiálise

**ECA** – Enzima Conversora da Angiotensina

**m-TOR** – do inglês: mammalian target of rapamycin

**BRA** – Bloqueador de Receptor de Angiotensina

**PCR** – Proteína C Reativa

**IL-6** – Interleucina 6

**MCP-1** – do inglês: monocyte chemoattractant protein-1

**TNF- $\alpha$**  – do inglês: tumoral necrosis factor- $\alpha$

**25(OH)D<sub>3</sub>** – 25 Hidroxivitamina D, Calcidiol

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** – 1,25 Dihidroxivitamina D, Calcitriol

**TGF- $\beta$ 1** – do inglês: transforming growth factor  $\beta$  (beta) 1

**FGF-23**: do inglês: Fibroblast growth factor 23

**VDR** – do inglês Vitamin D receptor

**PTHi** – paratormônio molécula intacta

## Resumo

---

**Introdução:** Hipovitaminose D (25(OH)D) é fator de risco para doença cardiovascular (DCV) na população em hemodiálise (HD). Pelos efeitos desta vitamina na ativação de receptores sistêmicos no sistema imune e miocárdico, pacientes com hipovitaminose D apresentariam inflamação sistêmica e alterações miocárdicas mais acentuadas que poderiam ser revertidas pela repleção com Colecalciferol. Objetivos: identificar a prevalência de hipovitaminose D em pacientes de HD com níveis baixos de PTHi e sua associação com inflamação e parâmetros ecocardiográficos, e analisar o impacto do tratamento de seis meses, com Colecalciferol, nas variáveis do metabolismo mineral, em biomarcadores de inflamação sistêmica e nos parâmetros ecocardiográficos (miocardiopatia).

**Materiais e Métodos:** Foram estudados pacientes em HD com PTHi < 300 pg/ml, não recebendo Vit D e sem manifestação clínica de DCV. 25(OH)D foi quantificada por quimioluminescência e níveis < 30ng/ml definiram hipovitaminose D. Proteína C reativa (PCR) (Nefelometria), Interleucina-6 (IL-6; ELISA) e albumina sérica foram usadas como marcadores inflamatórios. Ecocardiograma realizado em dia interdialítico avaliou função sistólica e diastólica e padrão geométrico do miocárdio. Os exames laboratoriais e o exame de ecocardiograma foram realizados no início do estudo (previamente à administração de Colecalciferol) e após seis meses de tratamento.

**Resultados:** Estudamos 61 pacientes (56±15 anos, 52% masculino, 93% brancos, 31% diabéticos) em hemodiálise por 23 (3-50) meses. 46 pacientes (75%) apresentavam hipovitaminose D, mais freqüentemente observada entre diabéticos e mulheres. A proporção de pacientes com PCR > 3 mg/L entre aqueles portando hipovitaminose D foi maior (73%) quando comparada aos com níveis normais de 25(OH)D (43%; p< 0,05). Observamos uma correlação positiva entre níveis de albumina e os de 25(OH)D<sub>3</sub> (r = 0,34; p = 0,007) e os níveis de IL-6 e os de 25(OH)D não se correlacionaram. Ao ecocardiograma, pacientes portadores de hipovitaminose D apresentaram maior espessura relativa de parede de VE (0,48 ± 0,11mm vs. 0,42 ± 0,10mm; p =0,05) e menores diâmetros diastólico (49,8 ± 6,2mm vs. 54,7 ± 5,8mm; p=0,013) e sistólico desta cavidade (31,9 ± 5,7mm vs. 36,8 ± 7,2mm; p=0,012) quando comparados aos pacientes com níveis normais de Vit D. Os pacientes com hipovitaminose D que puderam ser seguidos por seis meses (N = 30, 58±15 anos, 95% brancos, 53% feminino, 33% diabéticos) em HD por 25 (4-50 meses) foram tratados com Colecalciferol 50.000UI

semanais por 12 semanas e a seguir por mais 12 semanas com 20.000 UI semanais. Após 12 semanas ocorreu aumento de 25(OH)D ( $18,1 \pm 6,6 \times 46,2 \pm 14,4$  ng/ml;  $p < 0,0001$ ) e redução em PCR (mediana de  $0,62 \times 0,32$  mg/L ;  $p = 0,03$ ). Nenhum efeito significativo foi observado nos níveis séricos médios de cálcio, fósforo, albumina e hemoglobina. Após 24 semanas, os níveis de 25(OH)D permaneciam adequados ( $18,1 \pm 6,6 \times 40,4 \pm 10,4$ ;  $p < 0,0001$ ), os níveis de PCR mais baixos (mediana de  $0,62 \times 0,50$ ;  $p = 0,04$ ) e os valores médios de IL-6 se reduziram significativamente (mediana de  $6,44 \times 3,83$  pg/ml;  $p = 0,018$ ). Os valores médios de cálcio sofreram, após 24 semanas de tratamento, elevação significativa ( $9,0 \pm 0,6 \times 9,4 \pm 0,6$  mg/dl;  $p = 0,02$ ). Ao ecocardiograma, após 24 semanas de tratamento, observamos redução significativa no índice de massa de VE ( $175,1 \pm 63,1 \times 159,0 \pm 55,2$  g/m<sup>2</sup>;  $p=0,035$ ) e nenhuma alteração significativa nos demais parâmetros ecocardiográficos quando comparados ao “baseline”.

**Conclusões:** Hipovitaminose D em pacientes de hemodiálise com níveis baixos de PTHi associou-se a resposta inflamatória mais intensa e a um padrão geométrico concêntrico de VE. Suplementação com Colecalciferol em pacientes de HD foi eficiente, determinou abrandamento do processo inflamatório sistêmico, algum impacto em variáveis do metabolismo mineral e causou redução no índice de massa de VE, potencialmente colaborando para regressão da miocardiopatia associada à doença renal crônica.

## Abstract

---

**Background:** Hypovitaminosis D (25(OH) D<sub>3</sub> deficiency) is a cardiovascular risk factor in chronic kidney disease hemodialysis (HD) population, for its potential actions on systemic vitamin D receptors present in immune system and myocardium. We hypothesize that HD patients may present a more pronounced inflammatory response and uremic cardiomyopathy, even in the presence of low iPTH levels. Thus, the aim of this study was to identify hypovitaminosis D in hemodialysis patients with low iPTH levels and to analyze its association with systemic inflammation and echocardiographic parameters. Additionally, verify the impact of 24 weeks of Cholecalciferol supplementation on mineral metabolism parameters, inflammatory markers and echocardiographic variables.

**Subjects and Methods:** Patients on HD with iPTH lower than 300pg/ml not receiving vitamin D therapy were recruited. Hypovitaminosis D was defined when (25(OH)D) levels were <30ng/ml. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), Interleukin-6 (IL-6) and seric albumin were used as inflammation markers. Echocardiograms were performed in an interdialytic mid week day. Subsequently, hypovitaminosis D patients received a 24 –week supplementation period with Cholecalciferol and the impact on mineral metabolism parameters, inflammatory markers and echocardiographic variables were analyzed. The biochemical analyses (including mineral metabolism markers) were done before and after three and six months of Cholecalciferol supplementation

**Results:** Sixty-one patients (mean age of 56±15 years-old, 52% males, 93% caucasians, 31% diabetic) were included, and 75% presented hypovitaminosis D. Inflammation was more prevalent among those with hypovitaminosis D, and these patients presented higher relative wall thickness (0.48 ± 0.11mm vs. 0.42 ± 0.10mm; p =0.05) and lower left ventricular (LV) diastolic (49.8 ± 6.2mm vs. 54.7 ± 5.8mm; p=0.013) and systolic (31.9 ± 5.7mm vs. 36.8±7.2mm; p=0.012) diameters. During the follow-up period 30 patients were treated for the entire period and there was a significantly increased in serum 25(OH)D levels at 3 months of Cholecalciferol supplementation (18.1 ± 6.6 vs 46.2 ± 14.4 ng/ml; p < 0.001) and a significantly reduction on hs-CRP levels (median 0.62 vs 0.32 mg/L; p = 0.02). After 6 months on supplementation 25(OH)D levels were still on normal range (18.1 ± 6.6 vs 40.4 ± 10.4 ng/ml; p < 0.001), hs-CRP on lower levels (median 0.62 vs 0.50 mg/L; p = 0.04) and there was a reduction on IL-6 levels (median 6.44 vs 3.83 pg/ml; p = 0.018). There was not significantly change on alkaline phosphatase, iPTH, phosphorus and seric albumin levels, but there was a slightly and significantly increasing on calcium levels after

six months on Cholecalciferol supplementation ( $9.0 \pm 0.6$  vs  $9.4 \pm 0.6$  mg/dl;  $p = 0.02$ ). Left ventricular mass index was significantly reduced at the end of supplementation ( $175.1 \pm 63.1$  vs  $159.0 \pm 55.2$  g/m<sup>2</sup>;  $p = 0.03$ ).

**Conclusions:** Hypovitaminosis D is associated with inflammation and concentric geometric pattern of the left ventricle, even in the absence of high iPTH levels. Cholecalciferol supplementation in HD patients was safe and efficient to correct hypovitaminosis D, and established little impact on mineral metabolism markers. Additionally, we observed mitigation of systemic inflammation, with reduction on hs-CRP and IL-6 levels, and reduction of left ventricular mass index, suggesting an anti-inflammatory action and possibly improvement of cardiac dysfunction.

## **Agradecimentos**

---

Antes de tudo e de todos gostaria de agradecer ao apoio que recebi de minha família. Minha esposa **Vanessa Flumignan Bucharles** sempre esteve disposta a me ajudar nas tarefas do dia a dia com **nossas filhas Anna Carolina e Mellissa**, me garantindo o tempo livre necessário para a progressão de meus estudos. A presença das três em minha vida certamente me garante o fôlego para que as tarefas diárias sejam vencidas com mais facilidade e para que eu almeje sempre mais uma conquista.

À minha mãe **Marilena Gardano Bucharles** e meu **pai, já falecido, José Elias Bucharles Filho**, que me garantiram a educação e cuidados para que hoje eu estivesse onde estou. Ao meu sogro **Izidoro Flumignan** e minha sogra **Eiko Flumignan** que muito pacientemente sempre me trataram como filho, ao me acolherem em sua família 16 anos atrás.

Às minhas irmãs **Daniela e Andréa** e ao meu irmão **Luciano**, que sempre me auxiliaram em todas as etapas da minha vida profissional e pessoal, dando conselhos, apoio econômico ou simplesmente servindo de apoio emocional, meu carinho e agradecimento eterno.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Roberto Pecoits-Filho**. Jamais tive a oportunidade até hoje de trabalhar com colega em tão elevado grau de profissionalismo, competência, sensibilidade e sabedoria. Roberto sempre me manteve focado, orientando o caminho certo a ser seguido. Jamais me deixou esmorecer, quando as dificuldades apareciam e sempre esteve a minha disposição. Orgulho-me muito de tê-lo escolhido como orientador. Agradeço a oportunidade de ser seu aluno.

Ao meu co-orientador **Dr. Silvio Henrique Barberato**, cardiologista e ecocardiografista de indiscutível competência, também sempre esteve próximo me orientando e discutindo nosso e outros trabalhos com os quais tive oportunidade de compartilhar seus conhecimentos.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Andréa Stingen**, excelente profissional e amiga, com quem pude trabalhar no laboratório da pós-graduação e que foi a responsável pelas análises dos marcadores inflamatórios de nossos estudos.

Aos amigos **Fábio Branco e Betina Gruber**, à época alunos da Prof<sup>ª</sup> Andréa, pela dedicação junto ao laboratório da pós-graduação e participação ativa nos resultados dos estudos.

Aos meus colegas de trabalho no Instituto do Rim do Paraná **Luis Gustavo Buselato, Gina Moreno Gordon e Fabíola Costa**, que sempre estiveram à disposição para me substituir nas unidades de diálise para que eu pudesse desenvolver meus trabalhos e comparecer às aulas teóricas na PUCPR.

A todos os **professores da pós-graduação da PUCPR** com quem tive a oportunidade de aprender (e foram muitos). Não posso deixar de reconhecer a importância de cada um na formação desse aluno que agora completa mais uma etapa na nossa longa jornada.

Aos Diretores das unidades de diálise participantes do nosso estudo, **Dr. José Rubens Carvalho, Dr. Hélio Vida Cassi e Dr. Sérgio Marks**, destacados nefrologistas de nossa cidade.

A toda **equipe de enfermagem** que trabalha nas unidades de diálise: Unidades Buenos Aires, Santa Casa, UNIRIM e São José, pelo apoio e cuidados com as amostras de sangue coletadas durante o estudo. Quero aqui destacar os nomes Elias da Silva, Clarice Anselmo dos Santos, Lourdes de Fátima da Silva ,Enf<sup>a</sup> Caroline Aurora Franco, Márcia Cléia Duarte, Marcos Bassani, Lilian Kalarga, Rociane da Silva, Sivanildo Campos, Creciê de Fátima Chaves, Silvana Cardoso, Silvana Fernandes.

Aos **meus pacientes**, que se submeteram aos testes propostos, sempre com disposição e alegria, vocês que são a razão principal de meus estudos, meu respeito a todos vocês.

Ao **CNPq**, que através de projeto apresentado aos seus respeitáveis comitês avaliadores, me agraciou com uma bolsa de estudos utilizada durante a minha formação.

Direta ou indiretamente **outras tantas pessoas** participaram de alguma forma da execução desse estudo. Não posso aqui listar todas, mas certamente me lembrarei com carinho de cada uma delas.

# Sumário

---

<b>Introdução</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos</b>	<b>37</b>
<b>Materiais e Métodos</b>	<b>38</b>
<b>Resultados</b>	<b>46</b>
<b>Primeiro Artigo</b>	<b>47</b>
<b>Segundo Artigo</b>	<b>70</b>
<b>Conclusões</b>	<b>90</b>
<b>Considerações Finais</b>	<b>92</b>
<b>Anexos</b>	<b>103</b>
<b>Referências</b>	<b>112</b>

## 1) INTRODUÇÃO

Define-se doença renal crônica (DRC) como a presença de dano permanente e progressivo do tecido renal por um período superior a três meses, incluindo-se nesta definição anormalidades estruturais ou funcionais (1). Adicionalmente, a verificação de taxa de filtração glomerular (TFG) abaixo de 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> de superfície corporal, estando presente ou ausente dano renal, também caracteriza esta condição patológica.

A doença renal crônica, em geral de caráter progressivo, é classificada em cinco estágios potencialmente evolutivos, levando-se em conta a taxa de filtração glomerular observada e seguida prospectivamente. Alguns estudos observacionais realizados até o momento sugerem que a prevalência de pacientes portadores de doença renal crônica em qualquer estágio de evolução é muito alta (2), atingindo até 10% da população geral. Um dos grandes interesses no estudo desta patologia nefrológica reside no fato de que a presença é determinante para elevação substancial no risco cardiovascular, operando como um multiplicador desse risco. A doença renal em estágio final de evolução ou DRC estágio V está associada com um aumento de 10 a 20 vezes na mortalidade cardiovascular quando comparado à população geral, sendo que morte súbita de origem cardíaca é responsável por grande parte dessas mortes (3).

### ***Doença Renal Crônica e Risco Cardiovascular***

Estudos prospectivos revelam que em qualquer fase de evolução da doença renal crônica existe maior probabilidade de que o paciente sofra um evento cardiovascular fatal antes de progredir para um novo estágio da doença (4). Na medida em que ocorre progressiva queda na TFG, ocorre aumento exponencial no risco cardiovascular, especialmente ligado ao fato de que o paciente portador de doença renal crônica exibe uma marcada disfunção imunológica, presente desde as fases iniciais da doença e que contribui diretamente para diversas

complicações crônicas como aterosclerose acelerada, disfunção miocárdica e calcificações vasculares (5).

Conseqüentemente, as doenças cardiovasculares se constituem nas principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes portadores de doença renal crônica, sendo responsáveis por quase 40% das hospitalizações e 50% das mortes nesta população, incluindo-se aqui aqueles pacientes com doença renal em estágio V de evolução ou em diálise (6). Do ponto de vista anatomopatológico doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca congestiva e miocardiopatia são responsáveis pela maior parte das mortes de origem cardiovascular na população em terapia renal substitutiva (7-9). Ao tempo de entrada em tratamento dialítico crônico, 22% dos pacientes exibem história de angina pectoris ou infarto agudo do miocárdio prévio (8) e 31% se apresentam com insuficiência cardíaca congestiva (9).

Muito embora exista uma elevada prevalência de fatores de risco de Framingham (dislipidemia, tabagismo, diabetes mellitus e hipertensão arterial) neste segmento populacional portador de DRC, as elevadas taxas de mortalidade não podem ser explicadas adequadamente apenas pela presença desses fatores. Em estudos observacionais feitos com grande número de pacientes renais crônicos em hemodiálise e que sofreram eventos cardiovasculares, observou-se que fatores tradicionais como dislipidemia e hipertensão arterial sistólica pré - dialítica não estiveram fortemente associados com doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e doença vascular periférica (10). Baseado nessas informações e em outros estudos epidemiológicos postula-se que fatores de risco não tradicionais e/ou peculiares da uremia como anemia, toxicidade urêmica, inflamação sistêmica e, mais recentemente, distúrbios do metabolismo mineral possam ser ainda mais importantes na fisiopatologia da doença cardiovascular relacionada à DRC.

### ***Miocardiomatia e Doença Renal Crônica***

A anormalidade cardiovascular mais freqüentemente vista na população em diálise de manutenção é a hipertrofia de ventrículo esquerdo (HVE), presente em até 75 % dos pacientes que iniciam tratamento por hemodiálise (HD) (11) e associando-se comumente a eventos cardiovasculares adversos (12, 13). Além de ser um achado comum, esta alteração ventricular desenvolve-se precocemente no curso da doença renal crônica.

Um estudo observacional com 175 pacientes portando doença renal crônica em diversos estágios de evolução revelou prevalência de HVE de 26% em pacientes com taxa de filtração glomerular > 50 ml/minuto, 30% quando a taxa de filtração glomerular estava entre 49 e 25 ml/ml e de 45% ou mais quando havia severo “déficit” de função renal (14, 15).

A presença dessa alteração individual do ventrículo esquerdo está associada com o desenvolvimento subsequente de insuficiência cardíaca congestiva de tipo sistólico e diastólico na população em diálise (9), bem como opera como um fator de risco independente para arritmias cardíacas, morte súbita e isquemia miocárdica (7). A miocardiomatia relacionada à doença renal apresenta certas peculiaridades em relação àquela observada fora do ambiente urêmico e os fatores fisiopatogênicos que predispõe os pacientes portadores de DRC ao desenvolvimento de hipertrofia de ventrículo esquerdo são múltiplos e podem ser classificados em três categorias: a) fenômenos de pré-carga, b) fenômenos de pós-carga e c) fenômenos não relacionados às alterações de pré ou de pós-carga (16, 17).

Dentre os fenômenos de pré-carga destacam-se a expansão crônica de volume extracelular, a presença de anemia e a criação de shunt arteriovenoso para hemodiálise, cujo impacto na parede ventricular esquerda determina um padrão de hipertrofia miocárdica ou de remodelamento de tipo assimétrico ou excêntrico, visto em cerca de 30% da população em HD (18). A sobrecarga de volume ou expansão crônica de volume de espaço extracelular contribui para o desenvolvimento de hipertrofia de ventrículo esquerdo tanto por seus efeitos na

pressão arterial sistêmica quanto pela própria hiperhidratação (19). A importância do adequado controle da volemia em pacientes de hemodiálise pode ser documentada pela observação em paralelo de regressão nos níveis tensionais e redução nas dimensões de VE que se seguem a um rigoroso regime de ultrafiltração e redução na ingestão de sal (20).

Anemia determina importantes conseqüências deletérias para a função e estrutura do miocárdio, especialmente quando os níveis de hemoglobina encontram-se consistentemente abaixo de 10 g/dl (21), o que resulta em compensatórios aumentos de freqüência cardíaca e no volume de sangue ejetado na aorta, causando aumento no débito cardíaco e na contratilidade cardíaca por aumento na atividade simpática (22), alterações fisiopatológicas que colaboram para o desenvolvimento de hipertrofia miocárdica. A correção da anemia com alfaepoetina pode reduzir o débito e a freqüência cardíaca, induzindo, pelo menos em parte, regressão da HVE.

Finalmente, a criação de um “shunt” arteriovenoso como acesso vascular definitivo para hemodiálise (HD) é parcialmente responsável pela dilatação ventricular e por um estado de alto débito visto nesses pacientes em HD. A presença de fistula arteriovenosa de elevado fluxo sanguíneo determina redução na resistência vascular periférica, e a pressão arterial é mantida através de elevação no débito cardíaco, em decorrência de um aumento na freqüência e no trabalho cardíaco (18).

Com relação aos fenômenos de pós-carga, aqueles que operam como determinantes potenciais para HVE são hipertensão arterial sistêmica, tanto sistólica quanto diastólica, elevada resistência arterial sistêmica (arteriosclerose) e ativação do sistema renina-angiotensina intracardíaco (23). Este último processo pode estar relacionado à hipertrofia de VE e mesmo fibrose miocárdica independentemente da presença de alterações na pós-carga (17). Os fatores relacionados com aumento de pós-carga resultam num padrão de remodelamento ou hipertrofia de VE de tipo concêntrico (16), observado em até 45% dos pacientes em hemodiálise (18).

Dentre os fenômenos não relacionados com pré e pós-carga, ou seja, de desarranjos em sistemas de mediadores celulares, é importante ressaltar que em pacientes submetidos à terapia dialítica crônica, o grau de hipertrofia de VE correlaciona-se também com a atividade plasmática de renina (24). Além disso, o potencial efeito da hiperatividade do sistema renina-angiotensina na patogênese das alterações miocárdicas em pacientes de hemodiálise foi demonstrado pelo efeito do bloqueio desse sistema em estudos experimentais (25) e por regressão de hipertrofia de VE que ocorre com o uso de drogas inibidoras da enzima conversora da angiotensina (ECA), regressão essa mediada por efeitos não diretamente relacionados ao controle de pressão arterial (26).

Na maior parte das vezes a hipertrofia miocárdica vista na doença renal crônica se desenvolva em padrões ecocardiográficos isolados, de hipertrofia concêntrica ou excêntrica, porém é importante ressaltar que as mesmas podem até coexistir, como resultado de uma combinação de sobrecargas de pressão e volume associadas (18) e pela presença dos demais fatores já citados anteriormente.

A hipertrofia ventricular que se desenvolve no ambiente urêmico apresenta certas peculiaridades e se caracteriza não somente por aumento na massa de cardiomiócitos, mas também por exacerbada fibrose intersticial (27), caracterizada histopatologicamente por um rápido incremento na síntese de colágeno e um aumento desproporcional na matriz extracelular (28). A ativação de fatores de crescimento locais estimulando a proliferação e maior atividade de fibroblastos cardíacos se deve a uma combinação de fatores, entre os quais se destacam isquemia miocárdica, exacerbada liberação de catecolaminas, além de hiperatividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (29). Concomitantemente, observam-se modificações nos vasos cardíacos resultantes de redução na complacência (arteriosclerose) e de aterosclerose de microcirculação, que favorecem, respectivamente, hipertrofia e, adicionalmente, isquemia miocárdicas (27, 30).

Assim, as três modificações ou lesões que constituem o processo de remodelamento do miocárdio de pacientes renais crônicos (hipertrofia de cardiomiócitos, fibrose miocárdica e espessamento das artérias e arteríolas intramurais) são anormalidades freqüentes em biópsias ou necrópsias de pacientes portadores de DRC (31, 32). O resultado dessa combinação, especialmente exagerada fibrose miocárdica, se traduz pelo desenvolvimento de disfunção diastólica, cuja prevalência é muito maior entre pacientes portadores de DRC do que entre aqueles sem doença renal crônica (33).

Embora os agentes etiológicos que colaboram para as modificações deletérias de VE na uremia, como delineado, sejam múltiplos, existe evidência crescente sugerindo que outros fatores não relacionados aos fenômenos de pré e de pós-carga tradicionais, como sistemas de mediadores celulares, também devam estar envolvidos na geração de HVE no ambiente urêmico. Dentre esses processos destacam-se a ativação de m-Tor (mammalian target of Rapamycin) (34), o processo de inflamação sistêmica de baixo grau (16) e distúrbios do metabolismo mineral, particularmente o “déficit” de ativação sistêmica de receptores para vitamina D, em decorrência de hipovitaminose D (35).

### ***Miocardiopatia na DRC: Papel da Hipovitaminose D***

Evidências ligando a deficiência de vitamina D a doenças cardíacas existem já há algum tempo, porém a importância dessa associação vem se tornando mais clara na medida em que os mecanismos moleculares envolvidos nas ações da vitamina D no leito cardiovascular vão sendo elucidados (36).

Acredita-se que tanto o excesso de hormônio das paratireóides (hiperparatireoidismo secundário) quanto à hipovitaminose D, muitas vezes associada ao primeiro, pode ocasionar modificações estruturais e funcionais no leito cardiovascular no ambiente urêmico (tabela 1). Operando por mecanismos fisiopatológicos variados, os resultados finais incluem o desenvolvimento de hipertrofia de cardiomiócitos, geração de disfunção ventricular esquerda e fenômenos de calcificações vasculares e valvulares. A vitamina D parece

desempenhar um papel crucial na organização do tecido cardíaco, através da regulação dos níveis de cálcio intracelulares, proliferação, diferenciação e maturação de cardiomiócitos e seu “déficit” poderia resultar em desorganização estrutural das células contráteis cardíacas.

**Tabela 1 – Potenciais efeitos deletérios que o hiperparatireoidismo e a hipovitaminose D determinam sobre o tecido miocárdico e leito cardiovascular\*.**

<b><i>Hiperparatireoidismo</i></b>	<b><i>Hipovitaminose D</i></b>
↑ Pressão arterial	↑ Pressão arterial
↑ Conteúdo citoplasmático de cálcio	↑ Produção de PTH
↑ Força de contração	↑ Massa ventricular
↑ Massa ventricular	↑ Conteúdo de colágeno do miocárdio
↑ Fibrose intersticial	↑ Proliferação celular
↑ Processo aterosclerótico	↑ Processo aterosclerótico por ↓ HDL e APO-A
↑ Calcificações valvares	↑ Calcificações valvares (excesso de Vitamina D)
? Calcificação miocárdica	

\* Modificado de Rostand, S.G. *Kidney International*, 1999.

Revisões de literatura médica (37-39) exploram os efeitos biológicos da Vitamina D e a ativação de seus receptores sistêmicos nos processos celulares que governam a integridade e a saúde do endotélio vascular, revelando um grande número de ações desta vitamina não relacionadas ao tecido ósseo. Existe, de fato, uma ampla distribuição de receptores teciduais para vitamina D no organismo (tabela 2) e em diversos tipos celulares suas funções estão bem definidas, como no tecido renal, sistema imune e em cardiomiócitos. A inativação de receptores para vitamina D em modelos experimentais (40, 41) determinou um sustentado aumento na expressão tecidual de renina, além de maior produção de

angiotensina II, o que resultou em hipertensão arterial e hipertrofia miocárdica. Por outro lado, em modelos animais com hipertrofia de VE induzida por ingestão excessiva de sal, a administração de análogos de vitamina D determinou a regressão da hipertrofia por mecanismos independentes do controle de pressão arterial (42, 43).

**Tabela 2. Distribuição de Receptores Sistêmicos para Vitamina D\*.**

<b>Sistema</b>	<b>Tecidos</b>
Endócrino	Paratireóides, Células $\beta$ Pâncreas, Células C Tireóide
Cardiovascular	Células musculares lisas arteriais, Cardiomiócitos
Musculoesqueléticas	Osteoblastos, Condrócitos, Musculatura Estriada
Renal	Túbulos, Aparelho Justa-glomerular (renina), Podócitos
Gastrointestinal	Esôfago, Estômago, Intestinos, Fígado
Imune	Células T, Células B, Medula Óssea, Timo
Respiratório	Células alveolares pulmonares
Pele	Queratinócitos, Folículos pilosos

\*Modificado de Andress, D.L. *Kidney International*, 2006.

Em pacientes sob tratamento por hemodiálise, diversos trabalhos chamam atenção para os efeitos benéficos da administração de vitamina D nas funções sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (44) e na redução da hipertrofia ventricular (45, 46), além de influenciar beneficemente o conteúdo de colágeno do coração e a maturação do tecido cardíaco (36). Assim, a deficiência de vitamina D poderia predispor ao desenvolvimento de HVE por diversos mecanismos fisiopatológicos, incluindo prejuízo na contratilidade cardíaca, aumento no conteúdo de colágeno do miocárdio (36), alteração na expressão protéica das cadeias de miosina (47) e ativação do eixo renina-angiotensina-aldosterona (37, 40).

As três lesões que constituem o remodelamento estrutural do miocárdio observado em pacientes portadores de DRC são hipertrofia miocárdica, fibrose intersticial e espessamento intramural de artérias e arteríolas (31, 32). Fibrose miocárdica ocorre como conseqüência de um excessivo acúmulo de fibras colágenas, especialmente colágeno de tipo I e IV, no interstício e ao redor das artérias e arteríolas intramiocárdicas. O acúmulo desse tecido resulta de um desequilíbrio entre a síntese exagerada por miofibroblastos e degradação reduzida pelas metaloproteinases (48). Vários fatores desencadeantes podem participar da geração de fibrose miocárdica no paciente portador de DRC. Alguns desses fatores poderiam ser mais importantes em estágios iniciais da doença renal (inflamação, estresse oxidativo e sobrecarga de volume), enquanto outros, como anemia, hiperparatireoidismo e déficit de vitamina D agiriam em fases mais avançadas da DRC (49).

O diagnóstico das alterações miocárdicas através do exame de ecocardiografia (figura 1) é uma importante ferramenta para caracterização mais apropriada do risco cardiovascular, estimando a prevalência de patologias cardíacas primárias, determinando prognóstico e avaliando o resultado de intervenções que possam resultar em atenuação de hipertrofia de VE (50). Tradicionalmente o modo M e o ecocardiograma bi-dimensional permitem uma acurada análise da massa ventricular esquerda, bem como de suas dimensões cavitárias e função sistólica. Adicionalmente, técnicas geradas a partir do Doppler tecidual podem gerar informações a respeito do relaxamento ventricular em diástole e o comportamento da função diastólica (presença ou ausência de disfunção).

### ***Inflamação Sistêmica e Doença Renal Crônica***

Inflamação sistêmica freqüentemente acompanha a doença renal crônica por diversos mecanismos fisiopatológicos, dentre as quais destacamos a redução no clearance renal de citocinas pró-inflamatórias, comorbidades associadas (diabetes mellitus e doenças renais inflamatórias) e fatores associados ao próprio

tratamento dialítico (exposição do sangue às membranas de diálise e produtos sintéticos) (51). Em pacientes portadores de doença renal em seus diversos estágios observa-se progressivo aumento nos níveis de proteína C reativa ultrasensível (PCR) de forma paralela ao curso da própria doença renal (52, 53), enquanto em pacientes sob tratamento hemodialítico os níveis médios de proteína-C reativa são maiores do que controles da população geral (54). O estudo desse processo inflamatório sistêmico é importante na presença de doença renal crônica, pois o mesmo está intimamente relacionado a mecanismos e progressão de doença aterosclerótica, agravamento da condição cardiovascular e relacionado à desnutrição.

Associações entre níveis séricos elevados dos biomarcadores PCR e Interleucina-6 (IL-6) e mortalidade por doenças cardiovasculares já estão adequadamente estudados na literatura médica nefrológica (55-62), especialmente entre pacientes portadores de DRC em suas várias fases de evolução. Rao M e cols (58) estudaram 206 pacientes renais crônicos em hemodiálise e observaram que elevados níveis plasmáticos de IL-6 estiveram intimamente associados à comorbidades e à mortalidade cardiovascular.

De maneira semelhante, Iseki K e colaboradores (60), acompanharam 163 em hemodiálise crônica por cinco anos e observaram que os maiores valores de PCR (> 10 mg/L) estiveram fortemente associados à mortalidade por todas as causas, independentemente de outras possíveis variáveis impactantes em mortalidade, como presença de hipoalbuminemia, idade avançada e diabetes mellitus.

Honda H e colaboradores (56), utilizando como ferramenta de análise os biomarcadores cardiovasculares IL-6, PCR e albumina sérica, analisaram dados laboratoriais e clínicos de 173 pacientes, desde sua entrada em tratamento dialítico crônico e, após um período médio de observação de 26 meses, concluíram que todos esses marcadores estiveram associados com desnutrição, doença cardiovascular e mortalidade, muito embora os níveis de IL-6 tenham se mostrado mais fortemente relacionados aos desfechos clínicos estudados.

Aumento nos níveis de PCR, ainda que durante uma sessão de hemodiálise, pode se apresentar como preditor de mortalidade cardiovascular (63), enquanto dosagem de PCR imediatamente antes de transplante renal se constitui em ferramenta de apoio para avaliar prognóstico geral e cardiovascular do paciente (64).

O biomarcador Interleucina-6 estimula a produção hepática de proteína C reativa, maior síntese de proteína quimioatratadora de monócitos (MCP-1) por macrófagos e também maior expressão de moléculas de adesão e citocinas, esta últimas pelas células endoteliais (65). Além destas fontes tradicionais, a produção adipocitária de IL-6 explica em parte a associação entre adiposidade abdominal e aumento nos níveis de PCR na doença renal crônica (66). De maneira semelhante ao comportamento da PCR, elevados níveis séricos de IL-6 se correlacionam negativamente com a taxa de filtração glomerular (52, 53), são significativamente maiores em pacientes em hemodiálise do que em controles saudáveis (67) e operam como fortes preditores de mortalidade cardiovascular em pacientes de hemodiálise (58, 68).

Um melhor entendimento de como esse processo inflamatório se desenvolve, a determinação de novos fatores que colaboram para o seu surgimento, além da criação de estratégias terapêuticas que possam atenuá-lo pode causar efeitos favoráveis em abrandamento do risco cardiovascular ligado à DRC.

### ***Inflamação Sistêmica e DRC: Papel potencial da Hipovitaminose D***

A descoberta de que macrófagos ativados produzem 1,25 Dihidroxitamina D (calcitriol) e que diversos tipos celulares do sistema imune expressam receptores para vitamina D sugere que o sistema endócrino relacionado a essa vitamina deve exercer influência sob a regulação do sistema imunológico (69, 70). Adicionalmente, hipovitaminose D parece estar intimamente relacionada à gênese de doenças mediadas por desregulação do sistema imune, como doenças inflamatórias intestinais, asma e esclerose múltipla, além de processos infecciosos crônicos como tuberculose (71).

Uma possível interação do sistema imune com a vitamina D (calcitriol) é bastante atraente em modelos “in vitro” (72, 73), onde esta vitamina exerceu efeito inibidor sobre a expressão de fator de necrose tumoral - alfa (TNF-alfa) em macrófagos, reduzindo, também, a expressão de outros mediadores pró- inflamatórios. Além disso, a vitamina D parece exercer efeito direto sobre as células mononucleares, modulando a produção de citocinas envolvidas no processo de aterogênese e de calcificação vascular (74-76), resultando em uma melhor orquestração do sistema imunológico e um perfil de produção de citocinas com menor potencial gerador de inflamação sistêmica.

Alguns estudos recentes (77-82) observaram os efeitos que a deficiência de vitamina D pode determinar em marcadores teciduais renais de inflamação e quais os possíveis efeitos benéficos bioquímicos que a administração de análogos de vitamina D pode produzir no processo inflamatório renal.

Pacientes portadores de diversas formas de doença renal crônica, com inflamação em atividade do parênquima renal e baixos níveis de 1,25 dihidroxivitamina D, apresentaram aumento na excreção urinária de MCP-1, aumento na expressão tecidual desse biomarcador e maior infiltração de macrófagos quando comparados a pacientes com doença renal crônica de causa isquêmica, sugerindo que o déficit de vitamina D possa colaborar para o processo inflamatório do tecido renal na doença renal crônica (83).

Em modelos animais de uropatia obstrutiva onde predominam lesões túbulo-intersticiais a utilização de Paricalcitol, um análogo de vitamina D ativada, em comparação com placebo, atenuou significativamente o processo de fibrose intersticial, reduzindo a deposição de colágeno de tipo I e III, além de reduzir a expressão do fator de crescimento tecidual beta (TGF- $\beta$ 1) e seu receptor tecidual, preservando em parte a integridade epitelial tubular (77).

Estudos em pacientes portadores de DRC não dialítica sugerem que a vitamina D possa apresentar um papel atenuador em progressão de doença renal em transplantados renais (78). Em pacientes apresentando doença renal crônica em estágios III e IV de evolução, a utilização de Paricalcitol determinou

significativa redução em proteinúria, independente do uso de drogas bloqueadoras do sistema renina-angiotensina-aldosterona (79). Os efeitos diretos da vitamina D no processo inflamatório (80), na proliferação de células mesangiais (81) e nas células tubulares proximais (82) podem ter sido os responsáveis pelos efeitos observados. Como os túbulos proximais correspondem ao sítio renal de síntese de calcitriol, uma adequada ativação de receptores de vitamina D a esse nível pode ser necessária para se manter a integridade estrutural e funcional desse segmento tubular.

### ***Fisiologia da Vitamina D e Suas Outras Funções Sistêmicas***

Com o progressivo declínio na taxa de filtração glomerular, grande parte dos pacientes portadores de doença renal crônica passa a apresentar alterações do metabolismo mineral, como a deficiência na produção de vitamina D ativada, diminuição da excreção de fósforo, hipocalcemia, elevação dos níveis do fator de crescimento derivado de fibroblastos – 23 (FGF-23) e hiperparatireoidismo secundário, determinando alterações ósseas, calcificações em tecidos moles e outras alterações metabólicas que causam importante morbi-mortalidade nessa população (84). Embora historicamente a osteodistrofia e as anormalidades na função das paratireóides sejam os principais achados clínicos, complicações cardiovasculares e calcificações extra-esqueléticas no leito cardiovascular vêm sendo cada vez mais reconhecidos como fatores intimamente relacionados aos distúrbios do metabolismo mineral, sendo o adequado manejo destas alterações importante para a redução de morbi-mortalidade dessa classe de pacientes (85, 86).

Atualmente, pelas suas importantes repercussões clínicas e por sua complexa fisiopatologia, essa ampla variedade de distúrbios clínicos e laboratoriais relacionados ao metabolismo mineral não pode ser qualificada mais como osteodistrofia renal e é mais bem definida com o termo distúrbios do metabolismo mineral e ósseo relacionados à doença renal crônica (85), conforme recentemente estabelecido em literatura médica.

Tradicionalmente, a vitamina D tem sido associada primariamente com a saúde do tecido ósseo e já está bem estabelecido que a deficiência de vitamina D determina raquitismo em crianças e osteomalácia e osteoporose em adultos (87). Contudo, atualmente, sabe-se que níveis séricos adequados de vitamina D também são importantes para o bom funcionamento de diversos tipos celulares, incluindo o leito cardiovascular e o sistema imunológico (88).

Do ponto de vista fisiológico, a vitamina D é um pró-hormônio produzido normalmente na pele através de um processo fotolítico sobre o 7-deidrocolesterol, que se converte em pré-vitamina D, a qual é posteriormente e lentamente isomerizada na pele em vitamina D. Esta forma, biologicamente inerte, é liberada da pele e transportada ao fígado ligada à proteína específica (ligadora da vitamina D) e onde a mesma sofre uma conversão enzimática em 25 hidroxivitamina D (25 (OH) D). A liberação da forma 25(OH)D no plasma também se segue a uma ampla ligação com sua proteína carreadora e esse complexo proteína – vitamina D, após sofrer filtração glomerular, ganha acesso as células tubulares proximais, aonde sofre ação da enzima  $1\alpha$  – hidroxilase, resultando na síntese de 1,25 Dihidroxivitamina D<sub>3</sub>, a forma ativada da mesma e que age através de um receptor nuclear em diversos tipos celulares gerenciando inúmeras funções biológicas no organismo (89)

A vitamina D exerce suas funções teciduais através da interação da mesma com receptor específico denominado receptor para vitamina D (VDR) membro de uma família de receptores nucleares que ativa a transcrição gênica intracelular uma vez que é estimulado. Assim como outros membros dessa família, os VDR formam um dímero com o receptor para o ácido retinóico. O resultado final é o estímulo ou inibição da síntese de diversas proteínas ou substâncias que estão, pelo menos em parte, reguladas pela ação do calcitriol.

Dentre as diversas ações moleculares da vitamina D observa-se que a mesma é responsável pela regulação de proliferação de diversos tipos celulares, diferenciação, apoptose e angiogênese (90), reduzindo a proliferação de células normais e de células tumorais, além de induzir sua diferenciação final (89, 90).

Adicionalmente, em modelos experimentais e em seres humanos, a vitamina D inibiu a síntese de renina (91), determinou aumento na secreção pancreática de insulina (92) e melhora na contratilidade de cardiomiócitos (88).

A forma hormonal da vitamina D (1,25 Dihidroxitamina D - calcitriol) também age como um potente imunomodulador (89, 93). Monócitos e macrófagos expostos a um lipopolissacarídeo de parede bacteriana ou ao próprio *Mycobacterium tuberculosis* promovem maior expressão dos genes que controlam a síntese do receptor para vitamina D e da atividade de 1 $\alpha$ -hidroxilase, que converte 25 hidroxivitamina D em sua forma hormonal. Como resultado, ocorre aumento na produção de 1,25 dihidroxivitamina D e aumento na síntese de catelicidina, um peptídeo que apresenta intensa ação contra *M. tuberculosis* e contra outros agentes infecciosos (94).

Fica claro, desta maneira, que a hipovitaminose D parece não estar apenas associada a um maior risco no desenvolvimento de osteoporose e, subsequentemente, de fraturas, mas também parece associar-se a uma maior prevalência de doenças cardiovasculares, de alguns tipos de tumores, de doenças auto-imunes e de doenças infecciosas crônicas (94, 95). Direta ou indiretamente a vitamina D regula a atividade de aproximadamente 200 genes, podendo atuar como regulador endócrino negativo para o sistema renina-angiotensina-aldosterona (40), inibir a liberação de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-4, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) a partir de macrófagos e células T ativadas, e modular a expressão de metaloproteinases teciduais por macrófagos ativados (37), sendo que estas funções estão intimamente relacionadas aos processos de remodelamento cardiovascular.

A dosagem da forma 25-hidroxivitamina D (calcidiol) se constitui na ferramenta mais adequada para a aferição do real nível de vitamina D no organismo (87, 94, 96) e avaliação de seus estoques, pois é a principal forma circulante da mesma. Sua meia vida na circulação é de aproximadamente duas semanas, enquanto a forma ativada da vitamina D (1,25 Dihidroxitamina D<sub>3</sub>)

exibe meia vida de apenas 4 horas. Além disso, 25 hidroxivitamina D apresenta uma concentração plasmática 1000 vezes maior que sua forma ativada (87).

Embora diversos métodos bioquímicos estejam disponíveis para sua quantificação (97, 98), um dos métodos mais freqüentemente utilizados é o de DiaSorin LIAISON, que opera um método analítico quimioluminescente onde a vitamina D é dosada a partir da sua ligação com anticorpos anti-25(OH)D<sub>3</sub> (quantificando tanto ergocalciferol quanto colecalciferol) e que apresenta elevadas taxas de concordância aos outros métodos existentes na literatura. Além disso, o método DiaSorin LIAISON não subestima a concentração de Ergocalciferol, situação que foi verificada com outros métodos (99). Este método apresenta, em média, baixos coeficientes de variabilidade intra e interensaio (98), o que em linhas gerais resulta em grande confiabilidade dos resultados. Ainda assim é importante ressaltar que uma modesta variabilidade pode ocorrer entre diferentes laboratórios, especialmente se métodos diferentes forem utilizados, e que a utilização de um calibrador para os métodos disponíveis poderia reduzir essas variabilidades (100), de acordo com dados observados em um estudo clínico.

Mesmo ainda não existindo um consenso sobre quais seriam os níveis séricos ideais de vitamina D no organismo, muitos estudiosos no assunto definem deficiência de vitamina D como a presença de níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> menores do que 20 ng/ml e caracterizam como insuficiência de vitamina D níveis séricos de 21-29 ng/ml. Assim, os níveis séricos ideais seriam de pelo menos 30 ng/ml (101) e consideram-se como hipovitaminose D as situações em que o nível sérico de 25(OH)D<sub>3</sub> estiver abaixo de 30 ng/ml. Esta definição está pautada principalmente em estudos clínicos que tem como foco a saúde óssea, sendo que níveis de pelo menos 30 ng/ml são responsáveis por adequadamente suprimir a atividade paratireoidiana em pacientes sem perda crônica de função renal, determinar suficiente absorção intestinal de cálcio e garantir uma satisfatória densidade mineral óssea (102). Entretanto, os mesmos valores acima citados também parecem ser os mínimos necessários para que a incidência de doenças não relacionadas ao tecido ósseo como neoplasias e hipertensão arterial sejam atenuadas (101).

### ***Hipovitaminose D e Doença Renal Crônica***

A literatura médica recente vem confirmando que não só o defeito na transformação da vitamina D em sua forma ativa (calcitriol), mas também a prevalência de hipovitaminose D (calcidiol) na população em geral (94, 96, 103) e na população de pacientes com doença renal crônica em estágio avançado (104, 105) ou inicial (106, 107) é bastante elevada e que esse distúrbio do metabolismo mineral pode estar associado a doenças cardiovasculares mesmo na presença de leve prejuízo da função renal (108). As relações existentes entre o quadro de deficiência e insuficiência de vitamina D e as variáveis do metabolismo mineral são conflitantes e parecem estar na dependência do estágio de DRC em que os pacientes se encontram.

Del Valle e colaboradores (104), estudando 84 pacientes em hemodiálise que não estavam recebendo suplementação com vitamina D, observaram uma prevalência de hipovitaminose D da ordem de 76,1% e não foram observadas relações entre os níveis de vitamina D e níveis séricos de PTH, cálcio e fósforo. Os níveis de vitamina D encontrados foram, em média, maiores entre os homens do que entre as mulheres, e foi observada uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> e os níveis séricos de albumina.

Mucsi e colaboradores (105), analisando 69 pacientes em hemodiálise crônica, observaram uma elevada prevalência de deficiência de vitamina D (59% de pacientes com níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> < 20 ng/ml) e uma correlação inversa e significativa dos níveis de vitamina D com níveis de PTH, bem como uma correlação positiva dos valores de 25(OH)D<sub>3</sub> com a densidade mineral óssea.

LaClair e colaboradores (106) estudando pacientes portadores de DRC em diferentes estágios de evolução, mas ainda não em tratamento dialítico crônico, determinaram uma prevalência de hipovitaminose D de 71% entre aqueles com moderada perda de função renal e de até 87% entre portadores de estágios avançados de DRC. Níveis mais baixos foram observados, em média, entre as mulheres, assim como níveis mais elevados foram observados entre caucasianos. Correlação inversa com PTH e positiva com cálcio sérico também foi observada.

Gonzalez e colaboradores (107), também estudando pacientes portadores de DRC em diferentes estágios (43 casos) e 103 pacientes em hemodiálise verificaram, entre esses últimos, que a prevalência de déficit de 25(OH)D<sub>3</sub> foi de 97%. Não foi observada correlação entre esses níveis e os níveis séricos de PTH, bem como com os níveis séricos de albumina.

Recente revisão de literatura confirma esses dados (109) e outro trabalho explora a prevalência de hipovitaminose D na população portadora de DRC em estágios II – V, mesmo em regiões do planeta submetidas a maiores períodos de exposição ao sol, como o nosso país (110). Pacientes em hemodiálise e em diálise peritoneal (111) exibem semelhante risco de desenvolver déficit de 25 hidroxivitamina D (hipovitaminose D), em função de restrições na dieta, anorexia, baixa exposição ao sol e, entre pacientes em diálise peritoneal, a perda de metabólitos da vitamina D pelo efluente dialisato parece ser significativa (112) e se constitui em fonte adicional de perda vitamínica. Outros processos como má-absorção intestinal, síndrome nefrótica, obesidade e doença hepática crônica aparecem como fatores de risco associados ao quadro (109).

Como já anteriormente apresentado, a hipovitaminose D não está ligada somente a distúrbios do metabolismo mineral, mas também exhibe associação com maior risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares tanto na população geral (87, 95), quanto na população de pacientes em tratamento dialítico (113) e uma redução no processo de ativação do receptor da vitamina D (VDR) foi acrescentada na lista de distúrbios associados à fisiopatologia da DCV no paciente com DRC, por mecanismos que ainda não estão muito bem estabelecidos (39).

### ***Utilização de Vitamina D (formas ativada e nutricional) na população em terapia renal substitutiva***

Estudos retrospectivos e de coorte (114-119) apontam para um prognóstico mais favorável e menores taxas de mortalidade em pacientes renais crônicos em terapia hemodialítica que fizeram uso de vitamina D ativada ou de análogos desta

vitamina, em comparação com aqueles que não o fizeram. Os mecanismos que norteiam esses resultados parecem ser independentes dos potenciais benefícios esperados no metabolismo mineral, provavelmente ocorrendo por ativação sistêmica de receptores para vitamina D, particularmente no miocárdio e no endotélio vascular (39). Em pacientes portadores de DRC em estágios iniciais ou fase pré-dialítica a utilização de vitamina D ativada quando comparada a nenhum tratamento também esteve associada à redução de mortalidade por todas as causas e uma tendência a menores taxas de progressão para doença renal em estágio final de evolução (120).

Apesar dos achados benéficos para esta classe de pacientes com a utilização da vitamina D, os mecanismos fisiopatológicos exatos mediando esses resultados não estão elucidados, assim como a relação existente entre hipovitaminose D, inflamação sistêmica e função cardiovascular de pacientes em tratamento hemodialítico que não apresentam elevados níveis de paratormônio.

Habitualmente os níveis séricos de vitamina D não são monitorados na população em tratamento dialítico e a utilização de vitamina D neste contexto está baseada em diretrizes clínicas que estudam o impacto de sua administração em marcadores bioquímicos do metabolismo mineral. Até recentemente, as diretrizes abordando os distúrbios do metabolismo mineral e ósseo na DRC orientavam a verificação dos níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> apenas se estivessem presentes elevações nos níveis de paratormônio, especialmente em pacientes com DRC em estágios III e IV de evolução. Não se recomendava, até recentemente, a avaliação da hipovitaminose D na população em diálise (121).

Atualmente, novas diretrizes nessa área foram estabelecidas (122) e a avaliação dos níveis séricos de vitamina D passou a ser recomendada não só para pacientes portadores de DRC estágios III-V, mas também para aqueles em diálise. Sugere-se, também, que os pacientes nos quais a hipovitaminose D seja identificada, recebam tratamento de forma semelhante à população geral. Dessa maneira, ainda existe pouca informação disponível na literatura a respeito da prevalência de hipovitaminose D neste cenário clínico-laboratorial (pacientes com

níveis baixos de PTHi em estágio 5 de DRC), bem como do impacto da correção da hipovitaminose D em biomarcadores inflamatórios e na miocardiopatia de pacientes em hemodiálise com níveis baixos de PTHi, pois esta é uma população que habitualmente não é rastreada para a deficiência vitamínica em questão.

Uma estratégia emergente de tratamento da hipovitaminose D na DRC é a administração de altas doses de Ergocalciferol ou Colecalciferol (123), motivada por baixos custos, bom perfil de tolerabilidade e administração de vitamina D em sua forma mais fisiológica. Esta terapia objetiva oferecer quantidade suficiente de 25(OH)D<sub>3</sub> para produção extra-renal da forma ativa da vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) nos múltiplos tecidos e tipos celulares que expressam a enzima 1- $\alpha$  hidroxilase (109), incluindo miocárdio e células do sistema imune. Ainda existem poucos estudos analisando a eficiência, perfil de segurança e efeitos da administração de vitamina D nutricional para pacientes portando DRC em hemodiálise (109). Embora as populações estudadas tenham sido pequenas, a maior parte dos pacientes envolvidos em projetos de suplementação de vitamina D se beneficia da mesma, corrigindo adequadamente seus níveis séricos para valores > 30 ng/ml, estimados como adequados estoques de vitamina D tanto na população geral como na população em terapia dialítica (94, 110).

Alguns estudos publicados até o momento discutem sobre a administração de Colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) em pacientes de hemodiálise e seu impacto nos níveis séricos de vitamina D e nas variáveis do metabolismo mineral (123), em marcadores inflamatórios (15) e na miocardiopatia (15, 124). Tokmak F et al (123) num estudo realizado na Europa com 64 pacientes em hemodiálise observou que a administração prolongada (por 24 meses) de Colecalciferol determinou um aumento significativo nos níveis séricos médios de calcidiol e elevação significativa na calcemia média do grupo. Não observou, também, alterações significativas nos valores médios de fósforo, produto cálcio-fósforo e nos níveis de paratormônio.

Em outro estudo incluindo pacientes de hemodiálise Coratelli P. et al (124) observaram que a administração de Colecalciferol determinou um impacto

favorável na função sistólica miocárdica, muito embora os efeitos benéficos para a função cardíaca possam ser explicados também pela redução nos valores médios de PTHi que ocorreram de maneira significativa.

Matias P.J. et al (15) observaram que em pacientes de hemodiálise, com muitos apresentando hiperparatireoidismo secundário e doenças cardiovasculares prévias, a administração de Colecalciferol a 158 pacientes por período de 1 ano esteve associada a diversos benefícios, como redução na massa de VE, redução nos níveis séricos médios de proteína C reativa, elevação dos valores médios de albumina sérica e, também, a menores necessidades de utilização de drogas para o controle do hiperparatireoidismo secundário (vitamina D ativada) e drogas estimuladoras de eritropoiese (Darbepoetina). Naquele estudo, os valores médios de cálcio e fósforo sofreram redução significativa, fato explicado pelos autores pelo menor uso de vitamina D ativada e possivelmente pelo efeito nos valores de cálcio total que são determinados pela elevação de albumina sérica.

Saab G et al (125) também estudaram a prevalência de hipovitaminose D numa população de pacientes estáveis em tratamento hemodialítico crônico e a segurança e eficácia da administração mensal de Ergocalciferol. Numa coorte de 119 pacientes em terapia hemodialítica, 91% da população se apresentou com níveis séricos < 30 ng/ml e a repleção com Ergocalciferol, na dose de 50.000 UI mensais, foi eficaz em corrigir a hipovitaminose D em 95% dos pacientes. Adicionalmente, não foram verificados episódios de hipercalcemia e as necessidades de drogas estimuladoras da eritropoiese foram reduzidas em aproximadamente 65% dos pacientes.

Em outro estudo, realizado em pacientes portadores de DRC em estágios III e IV de evolução, a administração de Ergocalciferol em doses ajustadas pelo nível sérico de 25 (OH)D<sub>3</sub> determinou redução média significativa nos níveis de paratormônio em pacientes de estágio III, mas o mesmo efeito não se verificou em pacientes portando DRC em estágio IV (126), a despeito da normalização nos níveis séricos de vitamina D.

Adicionalmente, Al-Aly Z et al (127) observaram resultados semelhantes, ao avaliar o impacto do tratamento com Ergocalciferol, na dose de 50.000 UI semanais por 12 semanas e 50.000 UI mensais por mais três meses, em pacientes portadores de DRC III e DRC IV. Neste último estudo, realizado em 66 pacientes que apresentavam hipovitaminose D, apenas entre aqueles com DRC em estágio III se observou redução significativa nos níveis de PTHi. Episódios de hipercalcemia associados à administração de vitamina D não foram observados. Uma possível explicação para esse fato (redução de PTHi apenas no grupo com DRC III) parece residir numa provável resistência à incorporação de 25 hidroxivitamina D pelas células no ambiente urêmico (128), resistência essa parcialmente corrigida pela administração de calcitriol. Assim, o efeito biológico da forma nutricional da vitamina D nas glândulas paratireóides de pacientes com DRC mais avançada seria menos pronunciado.

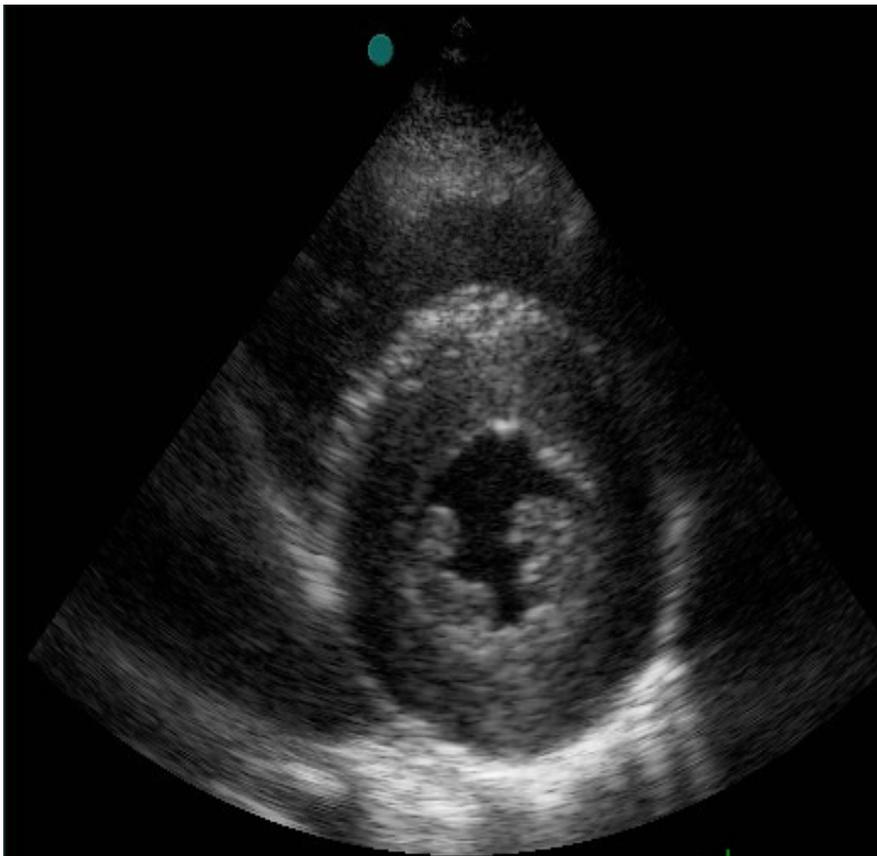
Ainda não se tem bem estabelecida qual a melhor estratégia (droga) para a correção da hipovitaminose D (Ergocalciferol ou Colecalciferol) e nem qual a melhor dosagem ou qual a duração de tratamento que deve ser estabelecida. Diversos estudos que focaram em dose semanal e tempo de administração, que não são uniformes por estudarem populações tanto em estágios de DRC III e IV quanto outras populações em HD e diálise peritoneal, apresentam tratamentos que incluem doses semanais variando de 800 UI até 100.000 UI, e tempo de tratamento de quatro até vinte e quatro semanas ou mais (127, 129-131). Muito embora tanto Ergocalciferol quanto Colecalciferol pareçam ser clinicamente eficientes em corrigir os baixos níveis séricos de vitamina D, acredita-se que Colecalciferol possa ser mais eficiente (132), exibindo maior potência e maior duração de ação em estudo com voluntários sadios.

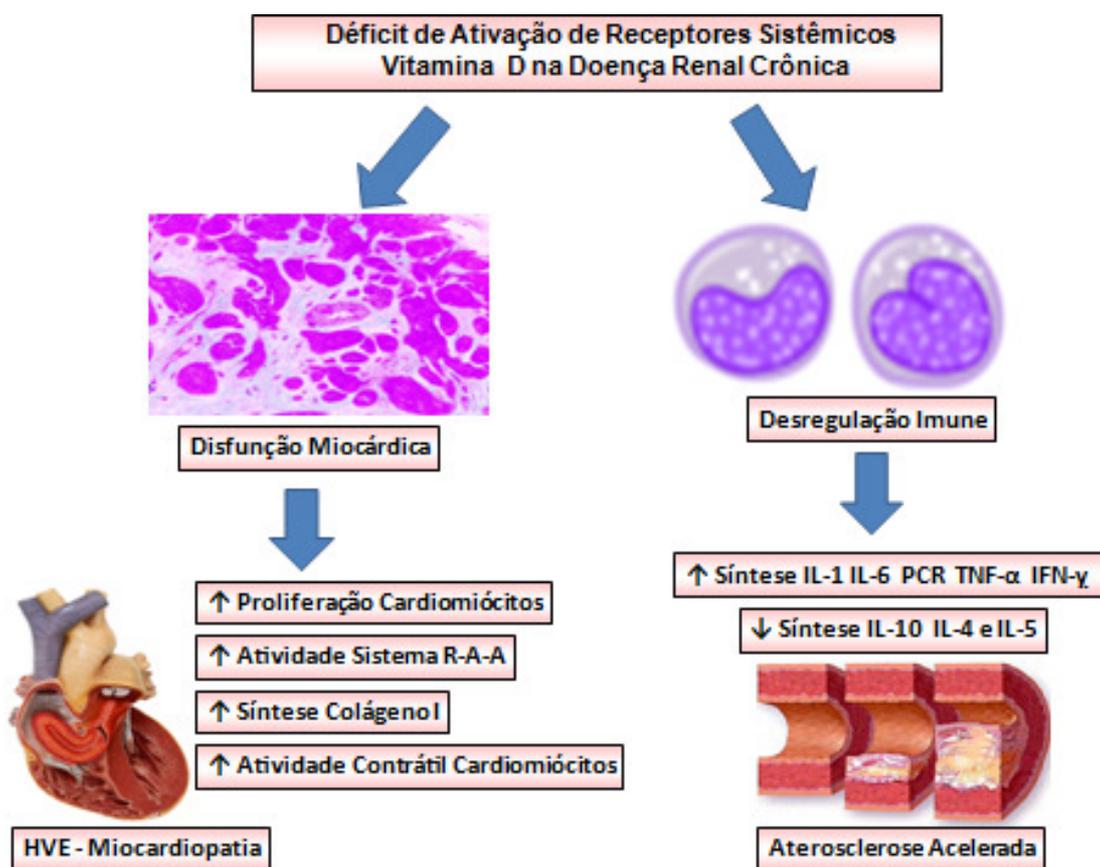
Existem poucos estudos observando os efeitos do tratamento da hipovitaminose D em marcadores do metabolismo mineral (125, 130) entre pacientes de diálise, e particularmente nenhum ainda que observe o impacto em marcadores inflamatórios e em variáveis ecocardiográficas, numa população que não apresenta doença cardiovascular sintomática e sem alterações importantes no metabolismo mineral (ausência de hiperparatireoidismo). Alguns poucos

estudos em literatura médica observaram o impacto da administração de vitamina D não ativada (Ergocalciferol ou Colecalciferol) em pacientes de hemodiálise com doença cardiovascular prévia, bem como suas potenciais repercussões miocárdicas (15, 124).

Assim, a prevalência de hipovitaminose D, a conseqüente inadequada ativação sistêmica de seus receptores e seu impacto cardiovascular (figura 2) não está ainda muito bem caracterizada na população em hemodiálise, especialmente entre aqueles pacientes que se apresentam com níveis de PTH abaixo de 300 pg/ml. Desta maneira, nossa hipótese inicial é de que exista uma maior prevalência de alterações na função miocárdica, bem como uma resposta inflamatória mais intensa em pacientes de hemodiálise que apresentem hipovitaminose D, documentada pela forma 25 (OH)D<sub>3</sub>, e que não apresentem elevados níveis de PTH para este estágio de evolução da DRC (em HD). Na seqüência, estudaremos o comportamento desses biomarcadores inflamatórios, das variáveis ecocardiográficas e dos marcadores do metabolismo mineral frente à administração de Colecalciferol, após uma provável correção da hipovitaminose D.

**Figura 1 – Imagem ecocardiográfica de paciente renal crônico em programa hemodialítico e portador de importante hipertrofia de ventrículo esquerdo (gentilmente cedida pelo Dr. Silvio Barberato, MD, PhD).**





**Figura 2:** Potenciais conseqüências da hipovitaminose D no sistema imune e aparelho cardiovascular. Deficiência de ativação destes receptores a nível monocitário está implicada diretamente na gênese de um perfil inflamatório de produção de citocinas, favorecendo processo aterosclerótico. Da mesma forma, ocorrem diversas alterações fisiopatológicas relacionadas a modificações deletérias para o miocárdio, em especial acentuação de fibrose miocárdica.

**Legenda da Figura 2:**

Sistema R-A-A = Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

IL-1 = Interleucina -1;

IL-6 = Interleucina 6;

PCR = Proteína C reativa;

TNF-α = Fator de Necrose Tumoral –alfa

INF-γ = Interferon gama

IL-10 = Interleucina 10

IL-4 = Interleucina 4

IL-5 = Interleucina 5

HVE = Hipertrofia de Ventrículo Esquerdo

## 2) OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

- *Avaliar a associação da hipovitaminose D com marcadores do metabolismo mineral e ósseo, biomarcadores de inflamação sistêmica e em variáveis ecocardiográficas de pacientes em hemodiálise que apresentam hipovitaminose D associada a níveis baixos de PTH, e que não apresentem doença cardiovascular sintomática.*

### **Objetivos específicos**

- *Avaliar as associações da hipovitaminose D com variáveis tradicionais do metabolismo mineral e ósseo (Cálcio, Fósforo, Fosfatase Alcalina e Paratormônio);*
- *Avaliar as associações da hipovitaminose D com biomarcadores de inflamação sistêmica (Albumina sérica, Proteína C Reativa e Interleucina - 6);*
- *Avaliar as associações da hipovitaminose D com parâmetros ecocardiográficos selecionados (índice de massa de ventrículo esquerdo, diâmetro diastólico de VE, diâmetro sistólico de VE, parâmetros de função sistólica e diastólica);*
- *Avaliar o efeito que a administração de Colecalciferol pode determinar nas variáveis do metabolismo mineral, biomarcadores inflamatórios e parâmetros ecocardiográficos de pacientes em hemodiálise portando hipovitaminose D, níveis baixos de PTHi e sem doença cardiovascular prévia;*

### **3) MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Recrutamento dos pacientes e aspectos gerais**

A população escolhida para realização do estudo era constituída de trezentos e oitenta e quatro pacientes renais crônicos em tratamento hemodialítico regular em quatro unidades de terapia renal substitutiva. As unidades participantes foram o Instituto do Rim do Paraná em sua sede principal, a unidade de hemodiálise da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, a unidade de diálise UNIRIM – Unidade renal do Portão e a Clínica de Doenças Renais de São José dos Pinhais. Os pacientes eram submetidos a um regime semelhante de manejo clínico e sob mesmos protocolos de tratamento.

Objetivando-se a potencial participação no estudo, o prontuário de todos os pacientes era submetido à revisão. A sua condição clínica no momento da possível inclusão no estudo era avaliada, realizava-se questionamento direto a respeito dos medicamentos em uso e o médico assistente responsável pelo paciente era entrevistado, para se confirmar os critérios iniciais de elegibilidade para o estudo. A partir dessa população inicialmente avaliada, aplicamos os critérios para inclusão no estudo que foram:

#### ***Critérios de Inclusão:***

- Pacientes estáveis em tratamento hemodialítico há pelo menos noventa dias;
- Idade de pelo menos dezoito anos;
- Ausência de sinais laboratoriais de hiperparatireoidismo (PTHi < 300 pg/ml);
- Não utilização de vitamina D ou análogos há pelo menos um ano;

Uma vez aplicados estes critérios de inclusão, nossa população para estudo (portando níveis baixos de PTHi e na estarem utilizando vitamina D) passou a ser constituída de cem pacientes. Desse total, trinta e nove pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem algum dos critérios abaixo listados:

***Crêterios de Exclusão:***

- Presena de eventos cardiovasculares maiores prévios (acidente vascular encefálico, cirurgias de revascularizao miocárdica, procedimentos de angioplastia transluminal percutânea de coronárias), amputaes de membros inferiores ou angina pectoris de início recente;
- Presena de processos infecciosos ou inflamatorios agudos, nos últimos trinta dias antes da inclusão no estudo ou ser portador de condies inflamatorias cr nicas como Lúpus Eritematoso Sist mico e doenas neoplásicas, bem como uso recente de drogas antiinflamatórias não hormonais ou corticóides;
- Recusa em assinar o termo de consentimento;

Essa populao recrutada para o estudo era submetida a três sesses de hemodiálise semanais, com durao de quatro horas cada sessão, utilizando-se membranas dialisadoras de polisulfona e dialisato a base de bicarbonato. Todos os pacientes se submetiam ao tratamento através de fístula arterio-venosa nativa como acesso vascular definitivo para hemodiálise e os níveis de hemoglobina eram monitorados mensalmente para se atingir os parâmetros recomendados pelas diretrizes internacionais com a utilizao de Alfaepoetina. Todos os pacientes, com exceo de um deles, utilizavam drogas anti-hipertensivas, sendo que as drogas mais comumente utilizadas eram inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores de receptor de angiotensina (55%), bloqueadores de canais de cálcio (50%) e betabloqueadores (33%).

Os pacientes utilizavam como medicamentos quelantes de fósforo Cloridrato de Sevelamer (34% da populao estudada) e Carbonato de Cálcio (66% da populao analisada). A pressão arterial dos pacientes era aferida imediatamente antes da entrada em diálise, após pelo menos 10 minutos sentados em repouso e protocolarmente, a cada hora transcorrida da sessão regular sendo executada. Com a finalidade de se estabelecer a pressão arterial sistólica e diastólica m dias de cada paciente, utilizamos os valores médios de pressão arterial obtidos imediatamente antes das sesses de diálise de meio de semana durante o mês em que os pacientes passavam pelas análises bioquímicas e ecocardiográficas.

Durante o mês em que os pacientes eram avaliados através de ecocardiograma transtorácico, os mesmos eram submetidos à coleta de amostras de sangue, imediatamente antes da segunda sessão de hemodiálise da semana, para dosagem dos marcadores de metabolismo mineral e ósseo e dos biomarcadores inflamatórios. O intervalo médio de tempo entre a realização do ecocardiograma e a obtenção das amostras de sangue era de quinze dias. O material (sangue) inicialmente obtido era submetido à centrifugação por 5 minutos a 5.000 RPM para isolamento do soro após coagular.

### **3.2 Variáveis do Metabolismo Mineral**

Após a coleta de amostra de sangue conforme protocolo acima descrito, uma parte do mesmo era centrifugada, o soro era separado e este era congelado e enviado a laboratório de apoio para dosagem de duas formas da vitamina D, 25 hidroxivitamina D (calcidiol) e 1,25 dihidroxivitamina D (calcitriol). Este soro ficou em parte estocado nas dependências do Laboratório de Pós-Graduação da PUCPR, a  $-70^{\circ}$  C, para dosagem de Interleucina-6, e uma parte foi enviada a laboratório de apoio externo à universidade, para dosagem dos dois metabólitos da vitamina D citados e dosagem de Proteína C Reativa.

Os níveis séricos de 25 hidroxivitamina D foram quantificados por método quimioluminescente (Diasorin LIAISON) automatizado, com coeficientes de variabilidade intra-método e inter-métodos de 4 e 6% respectivamente (98). Hipovitaminose D foi definida quando os níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$  encontravam-se abaixo de 30 ng/ml. Valores considerados como deficientes eram aqueles abaixo de 20 ng/ml e insuficiência foi caracterizada quando havia valores entre 21 e 29 ng/ml. Níveis séricos normais foram considerados quando se apresentavam entre 30-60 ng/ml (94). Os níveis séricos de 1,25 dihidroxivitamina D foram quantificados por Radioimunoensaio (1,25 – Dihydroxyvitamin D RIA KIT DiaSorin) e os valores normais foram considerados quando maiores ou iguais a 15,8 pg/ml. Níveis séricos abaixo desses valores eram considerados como de deficiência de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , baseado na bula do KIT utilizado para dosagem dessa variável. Os

níveis séricos de paratormônio (PTHrP 1-84) foram mensurados por Radioimunoensaio, cujos valores normais encontravam-se na faixa de 12-65 pg/ml). Os valores de cálcio total (método colorimétrico), fósforo (molibdato de amônio) e fosfatase alcalina (método cinético com emprego de p-nitrofenilfosfato de sódio) foram mensurados por métodos tradicionais.

### **3.3 Biomarcadores Inflamatórios**

Os biomarcadores inflamatórios utilizados para aplicação no estudo foram Albumina sérica, Proteína C reativa ultra-sensível e Interleucina-6. As mesmas amostras de sangue utilizadas para obtenção das dosagens dos marcadores do metabolismo mineral foram utilizadas para a dosagem dos biomarcadores inflamatórios. Albumina sérica e Proteína C reativa foram analisadas em laboratório externo de apoio à universidade (DASA – Diagnósticos da América / Laboratórios Frischmann Aisengart). Albumina sérica foi quantificada por método tradicional (método colorimétrico – verde de bromocresol). Proteína C reativa ultra-sensível foi quantificada por método de Nefelometria (mede a aglutinação de partículas de látex recobertas com anticorpos anti-proteína C reativa pela intensidade de luz refletida, com limite de detecção 0,0175mg/dl). Pacientes apresentando níveis de PCR acima de três mg/L foram considerados como portando inflamação sistêmica. Interleucina - 6 foi quantificada por método imunoenzimático tradicional (ELISA) nas dependências do laboratório de pós-graduação da PUCPR.

### **3.4 Ecocardiograma**

Todos os exames foram realizados por examinador único em dia interdialítico (somente quartas ou quintas-feiras) com horário marcado entre 12 e 18 horas, como previamente recomendado (8). Utilizamos ecocardiógrafo Agilent Sonos HP 5500 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EUA) equipado com transdutor de 2,5 –4 MHz, capaz de operar com imagem fundamental e segunda harmônica, para realizar estudo aos modos M, bidimensional e Doppler (pulsátil, contínuo, colorido

e tecidual). De acordo com a convenção de Penn (133), as seguintes medidas lineares foram obtidas ao modo M: espessura do septo interventricular, espessura da parede posterior, diâmetro diastólico final e diâmetro sistólico final do VE.

A massa do VE foi obtida por meio da equação de Devereux (134) e indexada pela altura em metros elevada à potência de 2,7, diagnosticando hipertrofia quando o índice de massa do VE (IMVE) foi maior que  $51 \text{ g/m}^{2,7}$  (135). Para a definição do padrão geométrico do VE, calculamos a espessura relativa de parede pela fórmula:  $(2 \times \text{espessura média da parede}) / \text{diâmetro diastólico final do VE}$ ; onde espessura média =  $(\text{espessura do septo interventricular} + \text{espessura da parede posterior na diástole}) / 2$ . O valor de referência foi 0,45, separando hipertrofia excêntrica (abaixo de 0,45) da concêntrica (acima de 0,45) (136). Quando IMVE estava normal e espessura relativa aumentada, classificamos como remodelamento concêntrico (136).

A função sistólica do VE foi analisada pelo cálculo da fração de ejeção pelo método de Simpson modificado cujo limite inferior foi definido em 55% (137). As velocidades do fluxo transvalvar mitral foram registradas no corte apical de quatro câmaras com a amostra do Doppler pulsátil posicionada entre as extremidades das cúspides da válvula mitral, solicitando-se ao paciente respiração calma e controlada. De acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (138), medimos as velocidades de enchimento rápido precoce (E), velocidade de contração atrial (A), relação E/A e o intervalo de tempo de desaceleração da onda E (TD). O  $\text{TD} < 140 \text{ ms}$ , associado com padrão de enchimento restritivo, foi classificado como anormal (139).

As velocidades do anel mitral ao Doppler tecidual foram registradas no corte apical de quatro câmaras com uma amostra de volume de um a dois mm na junção das paredes septal (140) e lateral (141) do VE com o anel mitral. A partir da média dos dois locais, determinamos as velocidades diastólicas precoce (E') e tardia (A') do anel, além das relações E'/A' e E/E'. Disfunção diastólica foi definida como: (1)  $E/A < 1$  (alteração do relaxamento); (2)  $E/A > 2$  (fluxo restritivo); (3) E/A entre 1 e 2 em associação à  $E/E' > 10$  (pseudonormalização) (142). O tamanho do

AE foi avaliado pela dimensão anteroposterior ao bidimensional (anormal quando  $> 40$  mm para homens e  $> 38$  mm para mulheres)(137); e pelo cálculo do volume usando a planimetria bidimensional por técnica de Simpson biplanar (143), no quadro precedente à abertura da valva mitral. O índice do volume de AE (IVAE) foi obtido pela razão entre o volume de AE e a superfície corpórea (144), sendo que valores acima de  $32 \text{ ml/m}^2$  têm sido indicativos de maior risco cardiovascular (145-148). Todas as medidas Doppler ecocardiográficas apresentadas no estudo correspondem à média de três ciclos cardíacos.

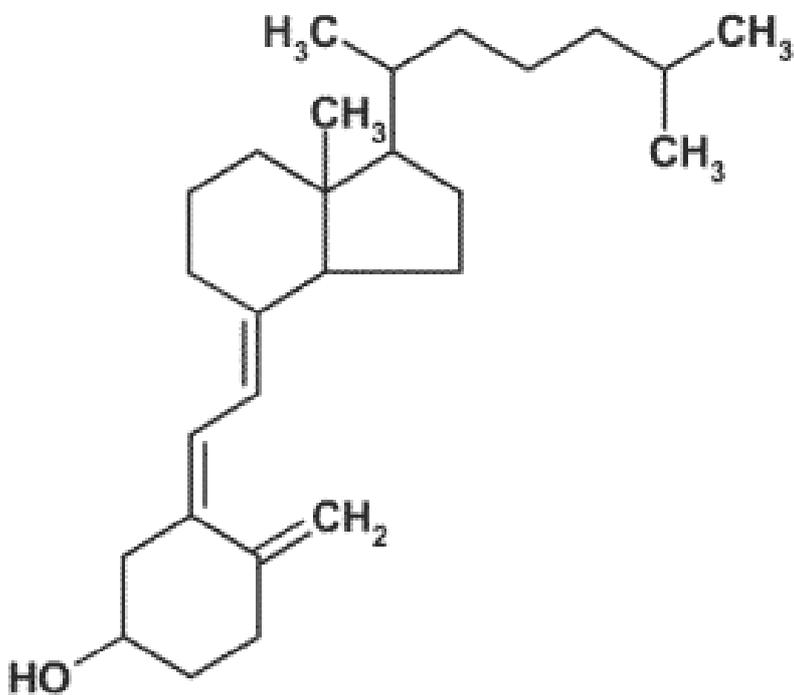
### **3.5 Análise Estatística**

Os pacientes apresentando deficiência e insuficiência de vitamina D, baseado nos níveis séricos de  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , foram agrupados (hipovitaminose D) e comparados com os pacientes que apresentavam níveis normais da vitamina em questão. Todas as análises foram realizadas com programa estatístico JMP Windows 8.0 (SAS Institute Inc USA). No estudo transversal os dados obtidos eram apresentados como médias e seus respectivos desvios-padrão ou mediana dependendo de sua distribuição. Para comparações de médias entre dois grupos distintos foram utilizados testes t de Student ou Mann-Whitney teste. Coeficientes de correlação de Pearson foram utilizados para se verificar as relações entre parâmetros bioquímicos (como variáveis contínuas). Proporções foram comparadas por teste de Qui-quadrado. Coeficiente de correlação de Kappa foi utilizado para se estudar a concordância entre duas variáveis (25 hidroxivitamina D e 1,25 dihidroxivitamina D) apresentadas como variáveis categóricas. Análise multivariada foi realizada com o objetivo de se avaliar os efeitos da hipovitaminose D nas variáveis ecocardiográficas. Na fase prospectiva foi utilizado teste t pareado ou ANOVA para se estudar diferenças entre as médias das variáveis contínuas antes e após a suplementação com Colecalciferol.

### **3.6 Colecalciferol – Farmacocinética da medicação empregada no estudo.**

A suplementação com as formas de vitamina D denominadas nutricionais pode ocorrer tanto com Ergocalciferol quanto Colecalciferol. Após a absorção pela mucosa intestinal, esse princípio vitamínico é transportado pelo sangue ligado à sua proteína carreadora e é transportado até o fígado. Neste órgão, o colecalciferol é hidroxilado no carbono 25 pela enzima 25-hidroxilase, dando origem ao 25-hidróxi-D3 [25-(OH)D3], enquanto que o ergosterol (Ergocalciferol) evolui para 25-hidróxi-ergocalciferol (25-(OH)D2). Essa primeira hidroxilação enzimática NADP-citocromo dependente (P450-redutase) se desenvolve no sistema microssomal hepático, tal como acontece com os esteróides e com diversas drogas, sendo considerada inversamente proporcional à quantidade de pigmento da pele e diretamente proporcional à quantidade de exposição à luz solar<sup>5</sup>. A regulação da hidroxilação é dependente do conteúdo hepático de 25-(OH)D3, daí ser considerada como uma forma de vitamina D de significativa importância, uma vez que sua presença no fígado reflete a respectiva reserva.

Estes compostos, mesmo em concentrações fisiológicas, têm pouca atividade biológica, necessitando de uma segunda etapa metabólica para tornarem-se ativos, daí porque, uma vez concluída a primeira hidroxilação hepática, o produto 25-(OH)D3 unido à proteína transportadora que tem alta afinidade e especificidade por esse metabólito, a transcalfiferina - uma alfa globulina também sintetizada pelo fígado. Apenas uma ínfima quantidade de 25-(OH)D3 é encontrada livremente, uma vez que o maior percentual se combina à fração protéica para ser transportada até os rins, onde no túbulo contornado proximal sofre a segunda hidroxilação em nível do carbono 1, mediante a ação catalítica da 1-á-hidroxilase [1á(OH)ase] resultando no 1,25- diidroxicolecalciferol [1,25-(OH)2D3].



**Estrutura Bioquímica de Colecalciferol**

**Figura e adaptação do texto provenientes da publicação:**

**Vitamina D, uma abordagem molecular. Danilo BARRAL, Adna Conceição BARROS e Roberto Paulo Correia de ARAÚJO, Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa, 7(3):309-315, set./dez. 2007.**

#### **4) RESULTADOS**

***1º Artigo – Apresentado durante a execução e defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde da PUCPR, em Abril de 2010 e aceito para publicação em Dezembro de 2010 no periódico Nephron Clinical Practice***

***2º Artigo – Artigo submetido ao periódico Journal of Renal Nutrition e encontra-se em processo editorial no momento (Fevereiro de 2011).***

# **Hypovitaminosis D is Associated with Systemic Inflammation and Concentric Myocardial Geometric Pattern in Hemodialysis Patients with low iPTH levels**

*Sérgio Bucharles, MD<sup>1,2</sup>, Silvio H. Barberato, MD, PhD<sup>1,3</sup>, Andrea E. Stingen, PhD<sup>1</sup>, Betina Gruber<sup>1</sup>, Henrique Meister MD,<sup>1</sup> Andrieli Mehl, MD<sup>1</sup>, Luciana Piekala, MD<sup>2</sup>, Ana C. Dambiski, MD<sup>2</sup>, Admar Souza, MD<sup>3</sup>, Márcia Olandoski, PhD<sup>1</sup> and Roberto Pecoits-Filho, MD, PhD<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> Center for Health and Biological Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná Curitiba – Brazil, <sup>2</sup> Instituto do Rim do Paraná – Curitiba – Brazil, <sup>3</sup> Hospital Cardiológico Costantini – Curitiba - Brazil

## **Corresponding Address:**

Roberto Pecoits-Filho, PhD  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Center for Health and Biological Sciences  
Rua Imaculada Conceição, 1155.  
Curitiba, PR 80215-901  
Telefone/Fax: + 55 (41) 3271-1657  
E-mail: r.pecoits@pucpr.br

**Keywords:** cardiovascular disease, hemodialysis, inflammation, vitamin D.

## **ABSTRACT**

**Background:** Vitamin D (25(OH)D) deficiency is a cardiovascular risk factor in the hemodialysis (HD) population. The aim of this study was to identify hypovitaminosis D in HD patients without signs of hyperparathyroidism and to analyze its association to inflammation and echocardiographic alterations.

**Methods:** Patients on HD with iPTH lower than 300pg/ml not receiving vitamin D therapy were recruited. Hypovitaminosis D was defined when (25(OH)D) levels were <30ng/ml. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), Interleukin-6 (IL-6) and seric albumin were used as inflammation markers. Echocardiograms were performed in an interdialytic mid week day.

**Results:** Sixty-one patients (mean age of  $56 \pm 15$  years-old, 52% males, 93% caucasians, 31% diabetic) were included, and 75% presented hypovitaminosis D. Inflammation was more prevalent among those with hypovitaminosis D, and these patients presented higher relative wall thickness ( $0.48 \pm 0.11$ mm vs.  $0.42 \pm 0.10$ mm;  $p = 0.05$ ) and lower left ventricular (LV) diastolic ( $49.8 \pm 6.2$ mm vs.  $54.7 \pm 5.8$ mm;  $p = 0.013$ ) and systolic ( $31.9 \pm 5.7$ mm vs.  $36.8 \pm 7.2$ mm;  $p = 0.012$ ) diameters.

**Conclusions:** Hypovitaminosis D is associated with inflammation and concentric geometric pattern of the left ventricle, even in the absence of high PTH levels. Vitamin D repletion (aiming to reduce cardiovascular complications) should also be considered in hemodialysis patients with normal or low PTH levels.

## Introduction

Cardiovascular disease is the leading cause of death in chronic kidney disease (CKD) patients (1) and although traditional cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes, dyslipidemia) are frequent in the dialysis population, the pathogenesis of cardiovascular disease in CKD involves the interplay of traditional risk factors and uremia-related factors, such as mineral metabolism disorders (2) and systemic inflammation (3).

Vitamin D receptors (VDR) are found ubiquitously throughout the body and most tissues and many cells possess the enzymatic mechanism to convert the primary circulating form of vitamin D, 25 hydroxyvitamin D<sub>2</sub> (calcidiol) into the active form 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (calcitriol) which acts through a nuclear receptor to carry out its many functions, related to mineral metabolism and several noncalcemic actions (4). Local calcitriol production depends on level of circulating 25(OH) D, which is the barometer for vitamin D status. Patients with CKD in all stages have a high prevalence of hypovitaminosis D (5, 6), and there is preliminary evidence from observational studies suggesting beneficial cardiovascular effects of vitamin D therapy in uremia (7, 8). The reasons for these associations are largely unknown and may be related to the impact of the lack of VDR activation in the cardiovascular system.

From the cardiovascular viewpoint, hypovitaminosis D appears to predispose hypertension, left ventricular hypertrophy, congestive heart failure, and chronic vascular inflammation (9). First, a state of systemic inflammation, commonly assessed by serum C-reactive protein levels is observed in approximately 40-50% of patients in ESRD and associations between inflammation and cardiovascular mortality are well documented in medical renal literature (10). Biomarkers of inflammation are considered today important tools to monitor cardiovascular risk. The interplay between vitamin D and systemic inflammation is observed in experimental models, in which cytokine production may be related to vitamin D action upon monocytes and macrophages, modulating the immunological system, and thus determining a more anti-inflammatory profile of cytokine network (11, 12).

Second, left ventricular hypertrophy (LVH) is the most frequent cardiac alteration in chronic kidney disease patients (13) and this pathological condition in uremia has been described as a complex myocardial pathology with peculiar causes and consequences in the myocardial structure, that include fibrosis, apoptosis and capillary degeneration. The pathogenesis of LVH has been extensively studied in uremia and although traditional risk factors such as fluid overload, hypertension and anemia are among the most important, alone these factors cannot fully explain the changes observed in the uremic myocardium. Hypovitaminosis D is an important candidate, since it acts as a negative endocrine regulator of rennin-angiotensin synthesis, which induces not only hypertrophy, but also inflammatory changes in the myocardium, that may lead to cardiac fibrosis (14, 15).

Until recently, traditional guidelines recommend measuring 25(OH)D levels in CKD stages 3 and 4 only if iPTH levels were elevated, and no guidelines were given for measuring hypovitaminosis D in dialysis CKD patients, particularly in patients presenting low iPTH levels (16). Although there has been a recent recommendation to monitor and treat hypovitaminosis D in CKD despite of signs of hyperparathyroidism, this recommendation does not find support in clinical studies until the present (17). We hypothesize that HD patients may present a more pronounced inflammatory response and uremic cardiomyopathy, even in the presence of low iPTH levels. Thus, the aim of this study was to identify hypovitaminosis D in hemodialysis patients with low iPTH levels and to analyze its association with systemic inflammation and echocardiographic parameters.

## **Material and Methods**

The study population consisted of 384 patients followed in four dialysis units under the same management and clinical protocols. All adult patients with iPTH <300 pg/ml, no previous history of cardiovascular disease (to avoid the myocardial consequences of coronary artery disease, vascular peripheral disease and chronic heart failure) were eligible for inclusion. Patients presenting systemic inflammatory diseases (systemic lupus erythematosus), acute (urinary tract infections,

pneumonia, vascular access infections) or chronic infectious conditions (tuberculosis) and malignancy were excluded from the study, based on their clinical conditions and medical history.

The study was carried during the months of April, May and June, 2009 (late fall and winter) in Curitiba, Brazil. All patients were submitted to four hour, three times weekly hemodialysis sessions, with polysulfone membranes and bicarbonate dialysate. Dialysis dose was delivered to achieve a Kt/V above 1.2. Hemoglobin levels were monitored to achieve K/DOQI recommended parameters. None of the patients were receiving vitamin D therapy for at least one year or were naïve to vitamin D supplementation. All patients except one received anti-hypertensive therapy (55% angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker, 50% calcium channel blockers). Sevelamer (34%) or calcium carbonate (66%) was used as phosphate binders.

Blood pressure was evaluated immediately before all midweek hemodialysis sessions (average of 4 measurements) on the month of biochemical and echocardiographic analysis. Pulse pressure (PP) was calculated using the formula  $PP = SBP - DBP$ , on the basis of blood pressure evaluated shortly before the HD sessions simultaneously to the collection of samples and the echocardiographic evaluation. All patients were submitted to a standardized study protocol previously approved by the ethics committee of our institution. All patients signed an informed consent before entering the study.

#### *Blood Chemistries*

All blood samples in our study were obtained immediately before the middle week dialysis session, on average fifteen days before the echocardiographic analysis, and included determination of serum albumin, hemoglobin, alkaline phosphatase, serum high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP), serum phosphate and calcium. Interleukin-6 (IL-6) was measured by the ELISA technique and hs-CRP by nephelometry (3). Inflammation was defined when hs-C-reactive protein was  $> 3\text{mg/l}$  (following the American Heart Association to define patients at high risk of

CVD). Serum parathormone (iPTH 1-84) was measured by RIA (normal levels range 12-65 pg/ml).

Since the major circulating metabolite of vitamin D is 25(OH) D, levels of this substance were used to determine adequacy of vitamin D stores. Serum 25(OH)D was determined by chemiluminescence method DiaSorin LIAISON 25OH Vitamin D assay (18), with an intraassay and interassay coefficients of variability of, on average, 4% and 6% respectively (19). 1,25 Dihydroxyvitamin D levels were determined by radioimmunoassay (1,25 –Dihydroxyvitamin D RIA KIT; DiaSorin). Hypovitaminosis D was defined when 25(OH) D levels were < 30 ng/ml (deficiency < 20 ng/ml and insufficiency when 21-29 ng/ml). Levels  $\geq$  30 – 60 ng/ml was defined as normal (4). Levels of 1, 25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) was considered normal when  $\geq$  15, 8 pg/ml and deficient when < 15, 8 pg/ml (as indicated by the manufacturer).

#### *Echocardiographic Analysis*

Echocardiograms were performed on the interdialytic day, midweek, between 8 a.m. and 1 p.m., as previously recommended (20). The same experienced cardiologist (S.H.B.) performed all examinations using a commercially available ultrasound system (Envisor CD Phillips Ultrasound) equipped with a 2.5 MHz transducer. According to the Penn convention (21) linear measurements were obtained from M-mode calculations. The LV mass was calculated (22) and indexed by height in meters at the power of 2.7 ( $\text{height}^{2.7}$ ), diagnosing LVH when  $> 51 \text{ g/height}^{2.7}$  (22). The combination of LV mass index and relative wall thickness ( $2^*$  mean wall thickness/ LV diastolic diameter) defined four LV geometric *patterns*: normal *geometry*, *concentric* remodeling, eccentric and concentric LV hypertrophy. Relative wall thickness reference cutoff value 0.45 (23, 24) separated eccentric (below) from concentric (above) LV hypertrophy. Concentric remodeling was defined by normal LV mass plus an increased relative wall thickness. Ejection fraction was calculated by Simpson's method and Doppler mitral flow velocities were recorded from the apical four-chamber view as recommended by the American Society of Echocardiography (23).

Peak early (E) and atrial (A) transmitral velocities, E/A ratio, and deceleration time of early diastolic filling (DT) were measured. TDI of annular mitral velocities were obtained with a small (2 mm) sample volume placed sequentially at the septal and lateral junction of the LV wall with the mitral annulus (25). Early (E') and late (A') diastolic mitral annulus velocities, E'/A' ratio, and E/E' ratio displayed in our study represent the mean value between the two sites. All velocities and intervals were averaged over three cardiac cycles. Diastolic dysfunction was defined by: (1) E/A < 1; (2) E/A > 2; or (3) E/A between 1 and 2 with concomitant E/E' > 10. Left atrial volume was determined through two-dimensional biplane Simpson's method (24). Measurements were done in end systole, and indexed both to BSA (LAVi-BSA) and height<sup>2.7</sup> (LAVi- height<sup>2.7</sup>) (26). Normal LAVi-BSA has been determined to be 22 ± 6ml/m<sup>2</sup>, however a cutoff value of 32 ml/m<sup>2</sup> was indicative of major cardiovascular risk (27).

### **Statistical Analyses**

Patients with vitamin D deficiency and insufficiency, based on 25 hydroxyvitamin D levels, were studied in the same group and compared with patients with vitamin D normal levels. All tests were performed using JMP Windows 8.0 (SAS Institute Inc USA). Data are expressed as means ± SD or median, depending on the distribution. Univariate Pearson correlation coefficients were used to assess the relationship among biochemical parameters. Proportions were compared by Chi Square test. To compare means in two different groups we used the Student's t-test or the Mann-Whitney test. The Kappa coefficient test was used to assess agreement between 2 continuous variables. Multivariate analysis was performed with the objective of evaluating the impact of hypovitaminosis D on echocardiographic variables. We considered a p value ≤ 0.05 as statistically significant.

## Results

### *Patients Characteristics*

The baseline clinical and biochemical characteristics of our patients are reported on Table 1. Out of the original population, sixty-one patients fulfilled the inclusion criteria. These patients were on hemodialysis for at least 3 months (median 23; range 3-50 months) had as primary kidney disease hypertension (36%), diabetes mellitus (31%), chronic glomerulonephritis (19%), polycystic kidney disease (6%) and other causes (4%). There were forty six patients with hypovitaminosis D and fifteen (15) patients with vitamin D normal levels.

When we compared patients with and without hypovitaminosis D (Table 1), there were no differences in mean age, time on dialysis, prevalence of hypertension (95% in each group) and hemoglobin levels ( $11.8 \pm 1.5$  vs.  $12.1 \pm 2.0$  g/dl). Additionally, there were no differences in serum levels of calcium ( $9.1 \pm 0.7$  vs.  $9.4 \pm 0.7$  mg/dl), phosphorus ( $4.6 \pm 1.1$  vs.  $4.7 \pm 1.8$ ), alkaline phosphatase ( $81.4 \pm 32.3$  vs.  $67.8 \pm 24.4$  UI/L), intact PTH ( $134 \pm 76$  vs.  $141 \pm 84$  pg/ml) and  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  levels ( $21.8 \pm 10.7$  vs.  $23.0 \pm 16.6$  pg/ml;  $p = \text{NS}$ ); however, there was a significant difference in  $25(\text{OH})\text{D}$  mean levels ( $17.8 \pm 6.2$  vs.  $40.7 \pm 6.2$  ng/ml;  $p < 0.001$ ) and in the prevalence of diabetes (41% vs. 13%;  $p < 0.05$ ). In addition, there were no statistical differences on systolic blood pressure mean levels, prevalence of angiotensin receptor blocker and angiotensin converting enzyme prescription and number of anti-hypertensive drugs in use in each group analyzed. Diastolic blood pressure mean levels were, additionally, higher in the normal vitamin D group ( $p = 0.03$ ; Table 1). Pulse pressure was not significantly different between the two groups of patients (Table 1).

Serum  $25(\text{OH})\text{D}$  and  $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  did not correlate (overall agreement cases 41%, Kappa coefficient  $< 0.4$ ) and serum  $25(\text{OH})\text{D}$  was below the recommended sufficiency values in 75% of our hemodialysis patients which was more frequently observed in diabetics and females. Fourteen patients were classified as insufficient for vitamin D "status" and thirty-two patients had vitamin D deficiency (levels below 20 ng/ml). No correlation was found between  $25(\text{OH})\text{D}$  levels and PTH, calcium

and phosphate levels. In addition, no correlation was observed between 25(OH) D levels and body mass index.

#### *Inflammation Biomarkers and Vitamin D “Status”*

Systemic inflammation based on high-sensitivity CRP > 3 mg/l was observed in 67% of our population (41 patients, 20 men and 21 women). The proportion of inflamed (hs-CRP > 3mg/L) patients among those with 25(OH)D deficit was higher (73%) when compared to 25(OH)D repleted patients (43%, Chi Square 3,9;  $p < 0.05$ ; figure 1). Accordingly, there was a positive correlation between seric albumin and 25(OH) D in plasma ( $r = 0.34$ ;  $p = 0.007$ ). Although there was a strong correlation between hs-CRP and IL- 6 ( $r = 0.71$ ;  $p < 0.001$ ), when these variables were studied as continuous, IL- 6 levels did not correlate to 25(OH) D levels. When we compared patients with normal 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> levels to patients with 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> deficit, we did not observe any statistically significant difference in hs-CRP (median 0,39 vs 0,97 mg/L;  $p = 0.06$ ) and interleukin-6: (median 6,11 vs 8,22 pg/ml;  $p = 0,40$ ), but there was a significant difference on albumin levels ( $4.3 \pm 0.3$  vs  $3.9 \pm 0.4$ g/dl;  $p < 0.01$ )

#### *Echocardiographic parameters and vitamin D “Status”*

LVH was observed in 84% of the study sample, systolic dysfunction in 16%, diastolic dysfunction in 68% and valvular calcification in 20% (Table 2). Patients with hypovitaminosis D presented lower left ventricular (LV) diastolic ( $49.8 \pm 6.2$  mm vs.  $54.7 \pm 5.8$  mm;  $p=0.013$ ) and systolic ( $31.9 \pm 5.7$  mm vs.  $36.8 \pm 7.2$  mm;  $p=0.012$ ) diameters as well as higher relative wall thickness ( $0.48 \pm 0.11$  vs.  $0.42 \pm 0.10$ ;  $p =0.05$ ) compared to patients with normal levels of 25(OH) D (figures 2 and 3). There were no differences regarding 25(OH) D deficit in patients with or without systolic dysfunction, diastolic dysfunction and valvular calcification. Finally, there was no association between left ventricular mass index and 25(OH) D status (table 2).

After adjustment for age, female gender and diabetes, the presence of hypovitaminosis D was still associated with lower LV systolic diameter ( $p = 0.003$ )

and a trend toward relative wall thickness ( $p=0.06$ ). The same echocardiographic parameters studied did not correlate to  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  levels, when we compared patients with  $1,25\text{ (OH)}_2\text{D}_3$  deficit to those with normal levels.

## **Discussion**

Vitamin D deficiency has recently emerged as a cardiovascular risk factor in chronic kidney disease by mechanisms that are not fully understood, but that may involve inadequate VDR activation on cardiovascular tissue (28, 29) and in the immune system. The main results of our study indicate that hypovitaminosis D may be related to more pronounced systemic inflammation and to left ventricular concentric geometric pattern in a selected group of hemodialysis patients with low iPTH levels and no previous history of cardiovascular disease.

According to several studies performed in CKD patients, both those on dialysis (including the present study) and non-dialysis patients, there is a very high prevalence of hypovitaminosis D (5, 6, 30) and our findings corroborate with those. This high prevalence can be explained in part by the presence of risk factors for vitamin D deficiency among dialysis patients such as decreased appetite, dietary restrictions, and decreased sunlight exposure. We observed a high prevalence of hypovitaminosis D among female gender when compared to males, which was observed by others (5). There is no definitive explanation for this finding, although hormonal differences may be implicated.

No study until the present have addressed this issue focusing in the population low iPTH levels, a population that is not routinely screened for hypovitaminosis D according to traditional guidelines (16). Only recent guidelines (17) recommend the measurement of  $25\text{(OH) D}$  levels in CKD stage 3-5 and dialysis patients, independently of iPTH levels, and replacement with ergocalciferol or cholecalciferol in those who present hypovitaminosis D. It is important to point out that there are no consistent background information supporting the need for screening of hypovitaminosis D in the dialysis population with low iPTH and its association with asymptomatic cardiovascular disease and inflammation. Our

results support the active screening of hypovitaminosis D in all patients with CKD, due to the high prevalence and potential cardiovascular consequences (discussed below) of hypovitaminosis D in the absence of mineral metabolism disorders.

We observed not only a high prevalence of hypovitaminosis D, but also an association between inflammation and vitamin D deficiency in hemodialysis patients. In our study we found a positive correlation between 25(OH)D levels and seric albumin, which was in accordance to previous findings (5, 31). Additionally, we observed a significant association between hypovitaminosis D and hs-CRP levels > 3 mg/L, reinforcing the association of vitamin D deficit with systemic inflammation in hemodialysis patients. Similarly, a recent study (31) performed in hemodialysis patients reported that 25(OH)D<sub>3</sub> levels were negatively correlated to C-reactive protein levels and positively correlated to albumin levels, findings that are in accordance with our results. However, it's important to point out that while in the present study patients were not receiving any form of vitamin D therapy for at least one year, theirs had 47% of the population using activated vitamin D. Moreover, in that study, there were 29% of patients with definitive coronary artery disease, including patients with past acute myocardial infarction, a clinical condition that could determine left ventricular geometric abnormalities, different from our population who had no past documented history of coronary artery disease.

Systemic inflammation is frequently observed in dialysis patients and this abnormality is a significant predictor of death in this population (10). Although many factors are responsible for this state of inflammation in the dialysis population, hypovitaminosis D represents an unrecognized (and potentially reversible) factor playing a role in the generation of this inflammatory state. Indeed, some intriguing connections between systemic inflammation and vitamin D deficiency emerged from experimental studies, in which vitamin D could potentially generate a better profile of cytokine network, reducing the expression of such biomarkers as IL-6, IL-1 and IFN-gamma and promote up-regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (11, 12, 32). The association between hypovitaminosis D and inflammation observed in the present study may indicate that the correction

of this disturbance may be an anti-inflammatory therapy, with potential benefits in the immune and cardiovascular system. This hypothesis needs to be tested in intervention studies.

Left ventricular hypertrophy is the most frequent abnormality observed in CKD patients and is associated with high mortality (13). Although LVH has been traditionally linked to myocardial hypertrophy (i.e. due to hypertension), in uremia it has been described as a complex cardiomyopathy with peculiar causes and consequences in the myocardial structure that include fibrosis, apoptosis and capillary degeneration leading to remodeling. Some studies evaluated the long-term evolution of cardiomyopathy in peritoneal dialysis patients (33) and in hemodialysis patients (34) and found that left ventricular mass increased during long-term follow up, but mass-to-volume ratios increased more significantly, suggesting that progressive wall thickening was the primary evolutionary pattern. The common association between concentric hypertrophy and myocardial fibrosis as a consequence of pressure load has been proposed in the uremic population (35).

Myocardial disease in uremia may be related to vitamin D deficiency, as observed in some animal models, by increasing myocardial collagen content and indirectly through calcium, altering myosin protein expression, inducing impaired cardiac contractility (15). Vitamin D plays a role in cardiac cell contraction, proliferation, differentiation, and furthermore it may play a role in the maintenance of vascular tone and cardiac output (36). Decreased VDR activity increased renin levels and blood pressure and has caused left ventricular hypertrophy in experimental models, which will undergo inflammatory changes mediated by angiotensin that will induce fibrosis as a result of the inflammatory process (14, 36).

Left ventricular remodeling describes the process by which the heart changes its size, geometry and function over time (24). In HD patients with no symptomatic cardiac disease, the development of a progressive concentric left ventricular geometric pattern was common and not consistently related to traditional risk

factors including arterial hypertension and anemia (37). This observation points to the fact that nontraditional cardiovascular risk factors, such as hypovitaminosis D, could play a role in the development of concentric left ventricle hypertrophy. The characteristics of our study design, that excluded patients with past history of CVD reinforces that the structural changes in the myocardium of the patients are potentially related to decrease in VDR activation, and not consequences of the baseline disease.

In our study we observed reduced LV dimensions and increased relative wall thickness in patients with hypovitaminosis D, findings that are related to an altered concentric geometric pattern of the left ventricle (which includes concentric remodeling and concentric hypertrophy). The fact that patients with hypovitaminosis D present a distinct geometric echocardiographic pattern points to the fact that these differences may be due to the lack of activation of cardiac VDR. Interestingly, patients with and without hypovitaminosis D presented similar prevalence of co-morbidities (including hypertension), hemoglobin and concomitant treatment. Moreover, the echocardiographic abnormalities observed were still present after the adjustment for gender, age and diabetes, although differences in relative wall thickness among our two groups did not reached statistically significance. Based on these findings and the strict selection criteria (low iPTH and no history of CVD), we suggest that the echocardiographic findings of a distinct geometric pattern in patients with hypovitaminosis D may be related to an early stage of uremic cardiomyopathy, for which hypovitaminosis D potentially may play a pivotal role.

Intervention studies corroborate our hypothesis that hypovitaminosis D is involved with myocardial consequences. In CKD patients with high iPTH levels, treatment with a vitamin D analogue resulted in regression of myocardial hypertrophy and improvement in cardiac systolic and diastolic function (38). More recently, in a study of hemodialysis patients (including those receiving activated vitamin D and with previous cardiomyopathy) cholecalciferol supplementation in vitamin D deficient hemodialysis patients resulted in attenuation of inflammation

and reduced left ventricular mass, suggesting improvements on specific markers of cardiovascular risk in CKD (39).

In summary, patients with hypovitaminosis D present more pronounced inflammation and signs of left ventricular concentric remodeling, even in hemodialysis patients with low iPTH levels and with no symptomatic cardiovascular disease. We hypothesize that, due to its pathogenic potential and based on our preliminary results, hypovitaminosis D (independent of PTH) may play a role in the progression of the structural changes of the heart in CKD patients. Hypovitaminosis D screening and repletion should also be considered in hemodialysis patients with normal and low iPTH levels, aiming to reduce cardiovascular complications.

**Table 1.** Baseline clinical and biochemical characteristics of the study population.

<b>Variables</b>	<b>Total population N = 61</b>	<b>VIT D Deficit N = 46</b>	<b>VIT D Normal N = 15</b>	<b>p value*</b>
Age (years)	56 ± 15	56.6 ± 15.6	54.2 ± 13.6	0.59
Male Sex (%)	52	39	73	0.03
Caucasian (%)	93	91	100	0.56
Mean time in Hemodialysis (months)	19	17	24	0.29
Diabetic (%)	31	41%	13%	< 0.05
Systolic blood pressure (mmHg)	136 ± 16	140 ± 12	135 ± 17	0.33
Diastolic blood pressure (mmHg)	83 ± 7	81 ± 7	86 ± 5	0.03
Pulse pressure (mmHg)	53 ± 13	52 ± 14	55 ± 9	0.35
Body Mass Index (Kg/m <sup>2</sup> )	23.5 ± 4.0	23.6 ± 4.0	23.3 ± 4.3	0.82
Hemoglobin (g/dl)	12.2 ± 3.4	11.8 ± 1.5	12.1 ± 2.0	0.50
Angiotensin receptor blocker	17%	15%	27%	0.43
Angiotensin conversion enzyme inhibitor	37%	43%	20%	0.13
Number of anti-hypertensive drugs	1.50 ± 0.94	1.50 ± 0.8	1.53 ± 1.1	0.81
<b>Mineral Metabolism Parameters</b>				
Serum Calcium (mg/dl)	9.2 ± 0.7	9.1 ± 0.7	9.4 ± 0.7	0.15
Serum Phosphate (mg/dl)	4.9 ± 1.4	4.6 ± 1.1	4.7 ± 1.8	0.76
iPTH (pg/ml)	139 ± 82	134 ± 76	141 ± 84	0.78
Alkaline Phosphatase (UI/L)	78 ± 30	81.4 ± 32.3	67.8 ± 24.4	0.11
25 hydroxyvitamin D <sub>3</sub> (ng/ml)	23.4 ± 11.7	17.8 ± 6.2	40.7 ± 6.2	< 0.001
1,25 dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> (pg/ml)	22.1 ± 12.3	21.8 ± 10.7	23.0 ± 16.6	0.74
<b>Inflammatory Markers</b>				
Serum Albumin (g/dl)	4.23 ± 0.47	4.1 ± 0.5	4.3 ± 0.3	0.14
High-sensitivity CRP (mg/l)	0.53 (0.05 – 29.6)	0.61(0.05 - 29.6)	0.29 (0.06 – 15.5)	0.13
Interleukin-6 (pg/ml)	6.78 (0.99-19.5)	6.46(1.36-19.58)	8.77(0.99-19.5)	0.53

Data expressed as means and ± DP or median (range)

\* p values between VIT D Deficit (hypovitaminosis D) and VIT D Normal groups

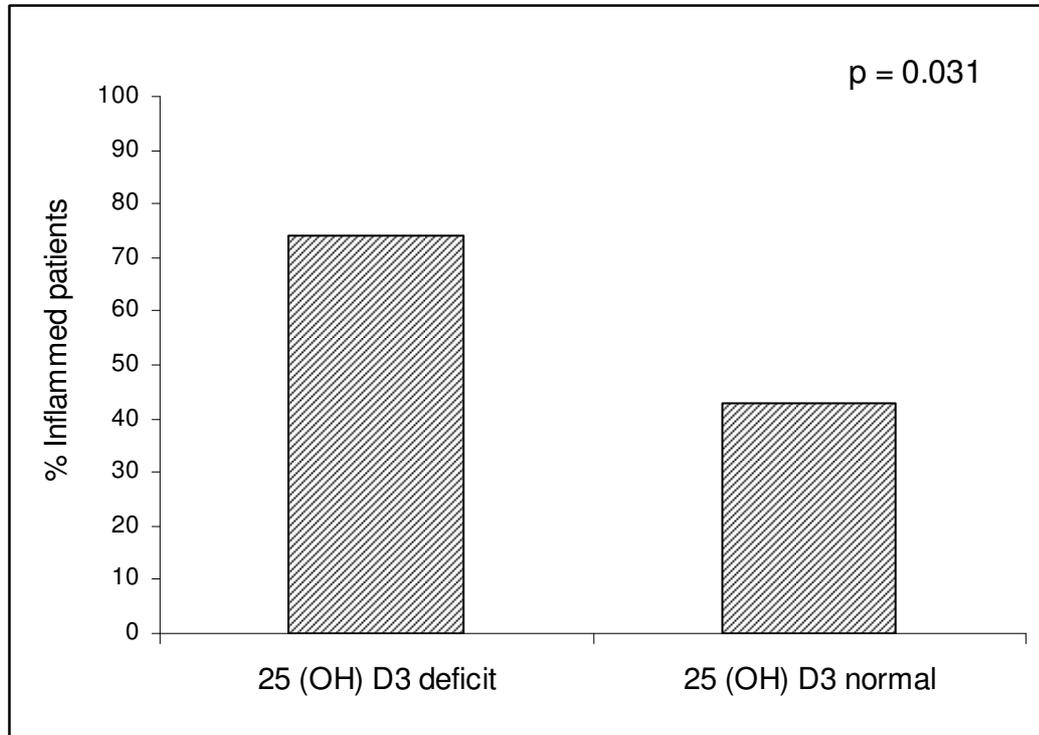
**Table 2.** Echocardiographic parameters evaluated in the study population.

<b>Variables</b>	<b>Entire Population N = 61</b>	<b>VIT D Deficit N = 46</b>	<b>VIT D Normal N = 15</b>	<b>P value*</b>
Systolic Dysfunction (%)	16	11	29	0.195
Diastolic Dysfunction (%)	68	74	64	0.505
Relative wall thickness	0.46 ± 0.10	0.48 ± 0.11	0.42 ± 0.10	<b>0.050</b>
Systolic left diameter (mm)	33.2 ± 6.3	31.9 ± 5.7	36.8 ± 5.8	<b>0.013</b>
Diastolic left diameter (mm)	50.9 ± 6.3	49.8 ± 6.2	54.7 ± 7.2	<b>0.012</b>
Left ventricular hypertrophy (%)	84	84	86	1.0
Valvular calcification (%)	20	20	14	1.0
Left ventricular mass (g/m <sup>2</sup> )	172 ± 74	167 ± 61	177 ± 57	0.590

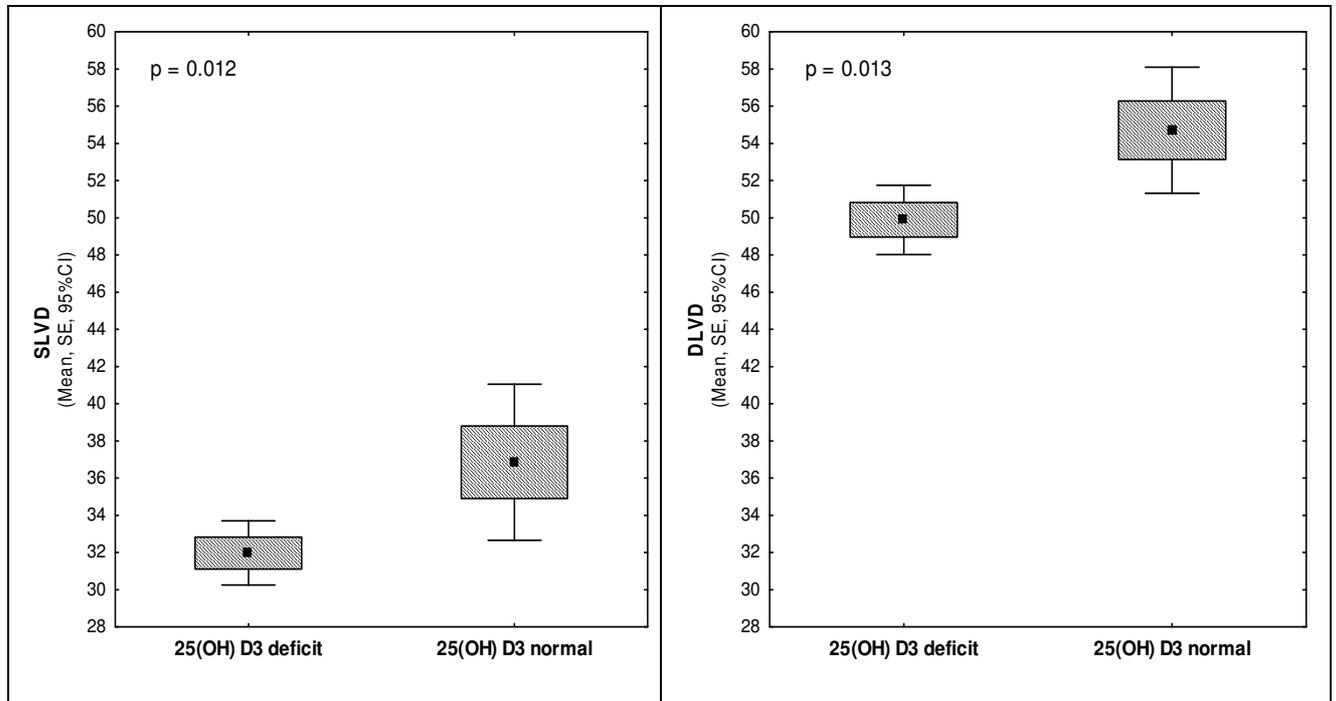
Data expressed as means and ± DP;

\* p values between VIT D Deficit and VIT D Normal groups.

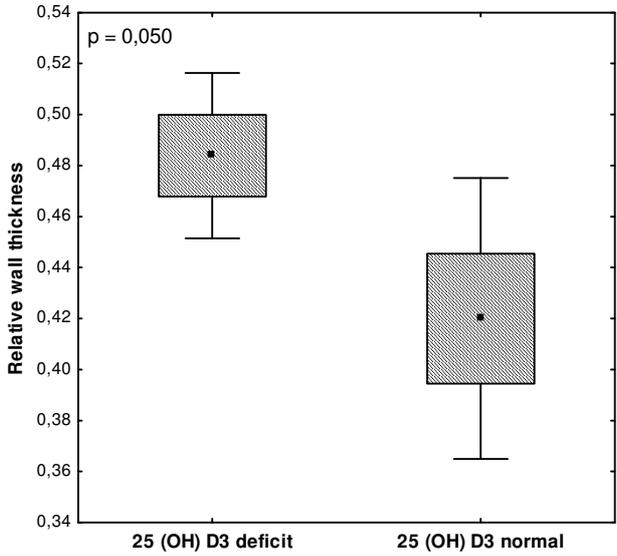
**Figure1.** Proportion of inflamed patients (hs-CRP > 3 mg / L) among patients with and without 25(OH) D3 deficit .



**Figure 2.** Systolic (SLVD) and Diastolic (DLVD) left ventricular diameters (mm) in patients with and without 25(OH) D<sub>3</sub> deficit.



**Figure 3.** Relative wall thickness in patients with and without vitamin D deficit.



## References:

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S112-9.
2. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Aug;15(8):2208-18.
3. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006 Jan;47(1):139-48.
4. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
5. Del Valle E, Negri AL, Aguirre C, Fradinger E, Zanchetta JR. Prevalence of 25(OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis. *Hemodial Int.* 2007 Jul;11(3):315-21.
6. Mucsi I, Almasi C, Deak G, Marton A, Ambrus C, Berta K, et al. Serum 25(OH)-vitamin D levels and bone metabolism in patients on maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol.* 2005 Oct;64(4):288-94.
7. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA, Jr., et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Apr;16(4):1115-25.
8. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, Rohrscheib MR, Bedrick EJ, Meyer KB, et al. Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney Int.* 2006 Nov;70(10):1858-65.
9. Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):39-48.
10. Pecoits-Filho R, Barany P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Sep;17(9):1684-8.
11. Cohen-Lahav M, Douvdevani A, Chaimovitz C, Shany S. The anti-inflammatory activity of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in macrophages. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3-5):558-62.
12. Panichi V, De Pietro S, Andreini B, Bianchi AM, Migliori M, Taccola D, et al. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. *Kidney Int.* 1998 Nov;54(5):1463-9.

13. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int.* 1995 Jan;47(1):186-92.
14. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(2):229-38.
15. Achinger SG, Ayus JC. The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function. *Kidney Int Suppl.* 2005 Jun(95):S37-42.
16. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2003 Oct;42(4 Suppl 3):S1-201.
17. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009 Aug(113):S1-130.
18. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3149-51.
19. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008 Apr;87(4):1087S-91S.
20. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE. Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uremia. *Kidney Int.* 1996 May;49(5):1428-34.
21. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation.* 1977 Apr;55(4):613-8.
22. de Simone G, Daniels SR, Devereux RB, Meyer RA, Roman MJ, de Divitiis O, et al. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. *J Am Coll Cardiol.* 1992 Nov 1;20(5):1251-60.
23. Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002 Feb;15(2):167-84.
24. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the

European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005 Dec;18(12):1440-63.

25. Sohn DW, Song JM, Zo JH, Chai IH, Kim HS, Chun HG, et al. Mitral annulus velocity in the evaluation of left ventricular diastolic function in atrial fibrillation. *J Am Soc Echocardiogr*. 1999 Nov;12(11):927-31.

26. Pritchett AM, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Rodeheffer RJ, Bailey KR, Redfield MM. Left atrial volume as an index of left atrial size: a population-based study. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Mar 19;41(6):1036-43.

27. Barberato SH, Pecoits Filho R. Prognostic value of left atrial volume index in hemodialysis patients. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Jun;88(6):643-50.

28. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol*. 2008 Dec 9;52(24):1949-56.

29. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(1):33-43.

30. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2005 Jun;45(6):1026-33.

31. Matias PJ, Ferreira C, Jorge C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Feb;24(2):611-8.

32. Takahashi K, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, Kamimura T. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses interleukin-1beta-induced interleukin-8 production in human whole blood: an involvement of erythrocytes in the inhibition. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002 Feb;24(1):1-15.

33. Huting J, Alpert MA. Course of left ventricular diastolic dysfunction in end-stage renal disease on long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol*. 1993 Feb;39(2):81-7.

34. Covic A, Goldsmith DJ, Georgescu G, Venning MC, Ackrill P. Echocardiographic findings in long-term, long-hour hemodialysis patients. *Clin Nephrol*. 1996 Feb;45(2):104-10.

35. London GM. Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 1:29-36.

36. Valdivielso JM, Ayus JC. Role of vitamin D receptor activators on cardiovascular risk. *Kidney Int Suppl*. 2008 Dec(111):S44-9.

37. Foley RN, Curtis BM, Randell EW, Parfrey PS. Left Ventricular Hypertrophy in New Hemodialysis Patients without Symptomatic Cardiac Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* Apr 8.
38. Lemmila S, Saha H, Virtanen V, Ala-Houhala I, Pasternack A. Effect of intravenous calcitriol on cardiac systolic and diastolic function in patients on hemodialysis. *Am J Nephrol.* 1998;18(5):404-10.
39. Matias PJ, Jorge C, Ferreira C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters. *Clin J Am Soc Nephrol.* May;5(5):905-11.

# **Impact of cholecalciferol treatment on biomarkers of inflammation and myocardial structure in hemodialysis patients without hyperparathyroidism**

Sérgio Bucharles, MD PhD<sup>1,2</sup>, Silvio Henrique Barberato, MD PhD<sup>1,3</sup>, Andréa E.M. Stingham, PhD<sup>1</sup>, Betina Gruber<sup>1</sup>, Luciana Piekala, MD<sup>2</sup>, Ana Cláudia Dambiski, MD<sup>2</sup>  
Melani R. Custodio, MD PhD<sup>4</sup>, Roberto Pecoits-Filho, MD PhD<sup>1</sup>

*Center for Health and Biological Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná<sup>1</sup>,  
Instituto do Rim do Paraná<sup>2</sup>, Hospital Cardiológico Costantini, Curitiba, Brazil<sup>3</sup>, Renal  
Division, Universidade Federal de Uberlândia, Brazil<sup>4</sup>*

## **Corresponding Address:**

Roberto Pecoits-Filho, PhD  
Center for Health and Biological Sciences  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Rua Imaculada Conceição, 1155.  
Curitiba, PR 80215-901  
Telefone/Fax: + 55 (41) 3271-1657  
E-mail: r.pecoits@pucpr.br

**Keywords:** cardiovascular disease, hemodialysis, left ventricle hypertrophy, inflammation, vitamin D.

## ABSTRACT

**Introduction:** Vitamin D (25(OH) D) deficiency (hypovitaminosis D) is highly prevalent in chronic kidney disease (CKD) patients and is potentially involved with complications in the hemodialysis (HD) population. The aim of this study was to evaluate the impact of cholecalciferol supplementation on biomarkers of mineral metabolism, inflammation and cardiac function in a group of hemodialysis patients presenting hypovitaminosis D and low parathyroid hormone (iPTH) levels.

**Material and Methods:** HD patients with iPTH lower than 300pg/ml, not receiving vitamin D therapy and presenting 25(OH)D levels <30ng/ml were enrolled in this prospective study. High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), Interleukin-6 (IL-6) and serum albumin were used as inflammatory markers. Echocardiograms were performed in an interdialytic midweek day at the baseline and after 6 months of cholecalciferol supplementation.

**Results:** 30 patients were included in the analysis. We observed a significantly increase in serum 25(OH)D levels after 3 months ( $18.1 \pm 6.6$  vs  $46.2 \pm 14.4$  ng/ml;  $p < 0.001$ ) and after 6 months of cholecalciferol supplementation ( $18.1 \pm 6.6$  vs  $40.4 \pm 10.4$  ng/ml;  $p < 0.001$ ). There was not significantly change on alkaline phosphatase, iPTH, phosphorus and seric albumin levels, but there was a slightly but significantly increasing on calcium levels after six months of cholecalciferol supplementation ( $9.0 \pm 0.6$  vs  $9.4 \pm 0.6$  mg/dl;  $p = 0.02$ ). Additionally, we observed a significantly reduction on hs-CRP levels after 3 months (median  $0.62$  [0.05 – 29.6] vs  $0.32$  [0.02 – 3.13] mg/L;  $p = 0.02$ ) and after 6 months of cholecalciferol supplementation (median  $0.62$  [0.05 - 29.6] vs  $0.50$  [0.02 – 5.66] mg/L;  $p = 0.04$ ), as well a significant reduction on IL-6 levels (median  $6.44$  vs  $3.83$  pg/ml;  $p = 0.018$ ) after 6 months of supplementation. Left ventricular mass index (LVMI) was significantly reduced at the end of supplementation ( $175 \pm 63$  vs  $159 \pm 55$  g/m<sup>2</sup>;  $p = 0.03$ ).

**Conclusions:** Cholecalciferol supplementation in HD patients is safe and efficient to correct hypovitaminosis D and establishes little impact on mineral metabolism markers. Additionally, we observed a reduction in important surrogate markers of cardiovascular risk, namely systemic inflammation and left ventricular hypertrophy (LVH), suggesting an anti-inflammatory action and possibly improvement of cardiac dysfunction.

## **Introduction**

Cardiovascular disease (CVD) is a major cause of morbidity and mortality in CKD (1) and although traditional cardiovascular risk factors (hypertension, diabetes, dyslipidemia) are frequent in these patients, the pathogenesis of CVD involves the interplay of traditional risk factors and uremia-related factors, such as mineral metabolism disorders (2) and systemic inflammation (3).

Hypovitaminosis D is frequently observed among CKD patients, particularly those on HD treatment (4-6). Vitamin D receptors (VDR) are found ubiquitously throughout the body and most tissues and many cells possess the enzymatic mechanisms to convert vitamin D into the active form 1.25 dihydroxyvitamin D (calcitriol). Indeed, activation of VDR exhibits classic actions related to bone and mineral metabolism and other called non calcemic actions, specially on cardiovascular system and many different cells of immune system (7, 8), potentially acting as a cell-differentiating factor and antiproliferative agent (9). Indeed, hypovitaminosis D has been recently associated with higher risk of CVD in CKD and in the general population (10-12).

Recently, mineral metabolism guidelines recommend the measurement of 25(OH) vitamin D levels in CKD stage 3-5 and dialysis patients, independently of parathormone (iPTH) levels, and replacement with ergocalciferol or cholecalciferol in those who present hypovitaminosis D (13). However, there is no consistent background information supporting the need for screening of hypovitaminosis D in the dialysis population with low iPTH and its association with asymptomatic cardiovascular disease and inflammation. Moreover, the impact of hypovitaminosis D correction on HVE and inflammation, both surrogate markers of CVD, has not been demonstrated in the literature, particularly in patients with low levels of iPTH.

Thus, the aims of this study were to evaluate the effects of oral cholecalciferol supplementation on mineral metabolism parameters, inflammation biomarkers and echocardiographic variables in CKD hemodialysis patients with hypovitaminosis D and low iPTH levels.

## **Material and Methods**

### *Study Design*

This was a prospective study of stable hemodialysis patients from a single renal replacement therapy center, during fall and winter in Brazil.

### *Population*

A total population of 384 HD patients was screened for the study. Previous history of CVD, iPTH levels > 300pg/ml and utilization of vitamin D or analogs supplementation were used as exclusion criteria. Additionally, we excluded patients with inflammatory conditions, including malignances, chronic infections and autoimmune diseases. Out of the original population, forty-five patients fulfilled the inclusion and exclusion criteria.

All patients underwent dialysis sessions with polysulfone low-flux membranes and the dialysate calcium concentrate was 3.5 meq/L during the study. Dialysis dose was delivered to achieve a Kt/V above 1.2. Hemoglobin levels were monitored to achieve K/DOQI recommended parameters and all patients were on alphaepoetin. The target for ferritin was between 200 and 800 ng/ml and intravenous iron saccharate was used when needed. Patients who were lost during follow-up were also excluded from final analysis (eight patients underwent renal transplantation, two patients died from cardiovascular causes, four patients changed to peritoneal dialysis and one patient was transferred to other dialysis facility).

Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured in midweek HD sessions before the study beginning and in the last month of cholecalciferol supplementation. Pulse pressure (PP) was calculated using the formula  $PP = SBP - DBP$ , on the basis of blood pressure evaluation shortly before the HD sessions. Antihypertensive therapy, especially use of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin II receptor blockers (ARBs) were evaluated before and after cholecalciferol supplementation, as well was therapy with statins.

Oral cholecalciferol was prescribed once a week (50.000 UI) in the first 12 weeks of the study and 20.000 UI, once a week, in the last 12 weeks. To monitor compliance, dialysis nurses administered cholecalciferol immediately after HD sessions.

### *Biochemical Analysis*

All the biochemical variables were measured before the beginning of supplementation and at the end of the study (six-month period observation). Blood samples to measure serum calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, hemoglobin, seric albumin and to determine KT/V were obtained immediately before the first middle week dialysis session in the beginning and at the last middle week dialysis session in the last month of the study.

Serum 25(OH) vitamin D was determined by chemiluminiscence method (DiaSorin LIAISON 25OH Vitamin D assay) (14) , with an intraassay and interassay coefficients of variability of, on average, 4% and 6% respectively. The normal range for 25(OH) D utilized was 30-60 ng/ml and toxic levels > 150 ng/ml. Total iPTH (1-84) was evaluated by a radio-immune assay (RIA), with normal range values of 12-65 pg/ml. Serum albumin was measured using a colorimetric assay. Interleukin-6 (IL-6) was measured by the ELISA technique and high sensitive C - reactive protein (hs-CRP) by nephelometry (3).

### *Echocardiographic Analysis*

Echocardiograms were performed on the interdialytic day, midweek, between 8 a.m. and 1 p.m., as previously recommended (15). The same experienced cardiologist (S.H.B.) performed all examinations using a commercially available ultrasound system (Envisor CD Phillips Ultrasound) equipped with a 2.5 MHz transducer. The echocardiographer was blinded to patient's clinical and laboratory condition (pre and post – cholecalciferol administration). According to the Penn convention (16) linear measurements were obtained from M-mode calculations. The LVMI was calculated using the Devereux formula (17) and indexed to body surface area. The combination of LVMI and relative wall thickness ( $2 \times \text{mean wall thickness} / \text{LV diastolic diameter}$ ) defined four LV geometric *patterns*: normal *geometry*, *concentric* remodeling, eccentric and concentric LVH. Relative wall thickness reference cutoff value 0.45 (18, 19) separated eccentric (below) from concentric (above) LVH. Concentric remodeling was defined by normal LV mass plus an increased relative wall thickness. Ejection fraction was calculated by Simpson's method and Doppler mitral flow velocities were recorded from the apical four-chamber view as recommended by the American Society of Echocardiography (18).

Peak early (E) and atrial (A) transmitral velocities, E/A ratio, and deceleration time of early diastolic filling (DT) were measured. TDI of annular mitral velocities were obtained with a small (2 mm) sample volume placed sequentially at the septal and lateral junction of

the LV wall with the mitral annulus (20). Early (E') and late (A') diastolic mitral annulus velocities, E'/A' ratio, and E/E' ratio displayed in our study represent the mean value between the two sites. All velocities and intervals were averaged over three cardiac cycles. Diastolic dysfunction was defined by: (1) E/A < 1; (2) E/A > 2; or (3) E/A between 1 and 2 with concomitant E/E' > 10. Left atrial volume was determined through two-dimensional biplane Simpson's method (19). Measurements were done in end systole, and indexed both to BSA (LAVi-BSA) and height<sup>2.7</sup> (LAVi- height<sup>2.7</sup>) (21). Normal LAVi-BSA has been determined to be 22 ± 6ml/m<sup>2</sup>, however a cutoff value of 32 ml/m<sup>2</sup> was indicative of major cardiovascular risk (22).

### *Statistical Analysis*

All tests were performed using JMP Windows 8.0 (SAS Institute Inc USA). Variables were expressed as frequencies for categorical variables, mean values with SD for those normally distributed and median values with interquartile ranges for those non-normally distributed variables. Comparison among variables at baseline, 3 and 6 months of cholecalciferol supplementation was performed with ANOVA or Friedman repeated measure analysis. Comparison between variables at baseline and after 6 months of supplementation was performed using paired t Student test or Wilcoxon Signed Rank Test. We considered p < 0.05 as statistically significant.

### **Results**

The final analysis of the study included 30 patients with mean age of 59 ± 15 years, 53% females, on hemodialysis for a median of 23 (range 4-60) months. Ten patients (33%) were diabetic and all but one patient were on antihypertensive therapy. The baseline clinical and biochemical characteristics of our study population are reported on table 1.

After six months of cholecalciferol supplementation there were no changes on hemoglobin levels, use of antihypertensive therapy, statins and alphaepoetin use, as well as systolic, diastolic, and pulse pressures (table 1).

Moreover, we observed a significant increase in serum 25(OH) vitamin D levels after 3 months (18.1 ± 6.6 vs 46.2 ± 14.4 ng/ml; p < 0.001;) and after six months of cholecalciferol supplementation (18.1 ± 6.6 vs 40.4 ± 10.4 ng/ml; p < 0.001; table 2 and figure 1), with most patients presenting normal 25(OH) vitamin D. There was not a significantly change on alkaline phosphatase, iPTH and phosphorus, but there was a significant increase in calcium levels after six months of cholecalciferol supplementation,

compared to baseline values ( $9.0 \pm 0.6$  vs  $9.4 \pm 0.6$  mg/dl;  $p = 0.02$ ; table 2). Only two patients presented calcium levels  $\geq 10.5$  mg/dl after 3 months of supplementation and one presented calcium levels = 10.5 mg/dl after 6 months.

Additionally, we observed a significant reduction on hs-CRP levels after 3 months (median 0.62 [0.05 – 29.6] vs 0.32 [0.02 – 3.13] mg/L;  $p = 0.02$ ) and after 6 months of cholecalciferol supplementation (median 0.62 [0.05 - 29.6] vs 0.50 [0.02 – 5.66] mg/L;  $p = 0.04$ ), as well as a significant reduction on IL-6 levels (median 6.44 [1.36 – 19.58] vs 3.83 [0.78 – 19.45] pg/ml;  $p = 0.018$ ) after 6 months of cholecalciferol supplementation (table 3 and figure 2). There was not change on serum albumin levels before and after supplementation (table 3).

At echocardiographic evaluation, we observed that LVMI was significantly reduced at the end of supplementation ( $175.1 \pm 63.1$  vs  $159.0 \pm 55.2$  g/m<sup>2</sup>;  $p = 0.03$ ; figure 3 and table 4). There were no significant changes in mean systolic and diastolic left ventricular diameters, as well on relative wall thickness. We also observed no significant changes in the prevalence of systolic and diastolic dysfunction, as well on valvular calcification when we compared the baseline with 6 months of cholecalciferol supplementation.

## Discussion

Cardiovascular disease is the main cause of death in CKD patients (23), and many traditional and non-traditional risk factors, including disturbances of mineral metabolism, are involved in the pathogenesis of CVD in uremia (24). In the present study we observed that HD patients with hypovitaminosis D and low iPTH levels presented a reduction in biomarkers of inflammation and in LVMI after 6 months of supplementation with cholecalciferol.

Hypovitaminosis D is a very common finding in CKD hemodialysis patients (6), in patients not on dialysis therapy (25) as well as in the general population (26). The interest in studying the mineral effects of supplementation with calciferols in CKD patients with low vitamin D levels has increased after two recent finds: first, although kidneys are the primary site for 1- $\alpha$  hydroxylation of vitamin D, this enzyme was localized in a wide variety of tissues that present the enzymatic machinery to produce 1.25(OH)<sub>2</sub>D, pointing to the importance of vitamin D status specially on cardiovascular and immune system. Second, several studies demonstrated an association between hypovitaminosis D and cardiovascular risk in CKD patients and in the general population (11, 12) by mechanisms that are not fully understood. Indeed, these mechanisms may involve inadequate VDR

activation in the cardiovascular tissue (8, 26) and the immune system. Because immune deregulation and are extremely common CVD in CKD population, (24) the potential benefits of vitamin D supplementation may be greater than in the other group of patients.

The replacement of 25(OH) vitamin D in CKD hemodialysis patients has been previously studied (27-29), focusing on safety, effectiveness and effects on mineral metabolism parameters. Similar to previous reports (29), we observed that cholecalciferol was efficient in normalizing serum 25(OH) D levels and showed no major side effects on mineral metabolism, although we observed that two patients showed hypercalcemia after 3 months, and only one after 6 months of cholecalciferol supplementation.

There are descriptions of associations between systemic inflammation and vitamin D deficiency in experimental studies. Vitamin D could potentially induce a better profile of cytokine network, decreasing the expression of IL-6, IL-1 and IFN-gamma and promoting up-regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (30-32). In humans, systemic inflammation is frequently observed in dialysis patients is a significant predictor of mortality in this population (33). Although multiple causes are most likely involved, hypovitaminosis D represents an unrecognized (and potentially reversible) factor playing a role in the generation of this inflammatory state. Our results showed a significant reduction in hs-CRP and in IL-6 levels after cholecalciferol supplementation, which is in agreement with a previous report (34) (35). This could reflect an anti-inflammatory effect of vitamin D and a potentially represents a new therapeutic opportunity to reduce systemic inflammation and mortality in CKD hemodialysis patients (36).

Left ventricular hypertrophy (LVH) is the most frequent cardiovascular abnormality in hemodialysis patients and is a strong predictor of mortality in this population (37, 38). The pathogenesis of LVH has been extensively studied in uremia and although traditional risk factors such as fluid overload, hypertension and anemia are involved, they cannot fully explain the changes observed in the uremic myocardium. Hypovitaminosis D potentially plays a significant role, since 1.25(OH) vitamin D acts as a negative regulator of renin-angiotensin synthesis, which induces inflammatory changes in the myocardium, leading to hypertrophy and fibrosis (39, 40). In our study we observed a significantly reduction in LVH after six-months on cholecalciferol treatment. There are indeed, previous studies observing the impact of 1.25(OH) vitamin D (41, 42) and cholecalciferol on myocardial mass and function (34, 43), but these studies included patients with several degrees of myocardial dysfunction, including patients with coronary artery disease, and patients with

secondary hyperparathyroidism, which were receiving concomitant 1.25(OH) vitamin D therapy.

In CKD patients, excessive iPTH influences cardiovascular structure and function (44), inducing an increase LVH through cardiomyocytes hypertrophy and interstitial fibrosis. 25(OH) vitamin D (cholecalciferol) therapy induced a reduction in LVH in parallel to a decrease in iPTH levels (34, 43). The present study sheds light in this area, isolating the deleterious action of iPTH to the myocardium, since the studied patients presented at the baseline already low iPTH levels, which were further decreased after vitamin D supplementation. Indeed, this is the first report of a reduction in LVH in a selected group of patients without previous history of CVD, low levels of iPTH (supposedly without hyperparathyroidism) and not receiving any form of vitamin D, suggesting a direct effect of 25(OH) vitamin D on myocardial cells, where it can act as an antiproliferative and cell-differentiating factor (8, 45).

Our study has some limitations, since it did not include a control group, had a relatively low number of patients and presented a short time of follow up to capture echocardiographic changes. However, maintaining patients with hypovitaminosis D in placebo treatment would present ethical issues. Also, selecting a population with low iPTH levels and without vitamin D therapy definitely limits the recruitment of eligible patients. We believe that this highly selected population indeed represents an opportunity to analyze the effects of vitamin D supplementation that are not related to mineral metabolism actions. Further studies will need to address the long term effects of vitamin D supplementation on the myocardial function and structure.

In conclusion, cholecalciferol supplementation in HD patients is safe and efficient to correct hypovitaminosis D with little impact on mineral metabolism. Additionally, there was a reduction in important surrogate markers of cardiovascular risk, namely systemic inflammation and LVH. This study suggests that vitamin D plays a pivotal role in uremic CVD and its supplementation should be considered even in the absence of mineral metabolism disorders, once hypovitaminosis is detected.

**Table 1.** Clinical and biochemical parameters before and after 6 months of cholecalciferol supplementation.

	<b>Baseline</b>	<b>6 months</b>	<b>P</b>
Hemoglobin (g/dl; mean $\pm$ SD)	11.7 $\pm$ 1.4	12.4 $\pm$ 1.4	N/S
KT/V	1.4 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3	N/S
Alphaepoetin (UI/kg/week; median- range)	122 (31-247)	120 (44-250)	N/S
Antihypertensive therapy (%)	96	96	N/S
ACEIs (%)	56	60	N/S
ARBs(%)	3	3	N/S
Statins (%)	56	56	N/S
SBP (mmHg; mean $\pm$ SD)	139 $\pm$ 16	138 $\pm$ 20	N/S
DBP (mmHg; mean $\pm$ SD)	82 $\pm$ 8	83 $\pm$ 9	N/S
Pulse Pressure (mmHg; mean $\pm$ SD)	57 $\pm$ 12	54 $\pm$ 14	N/S
Dry weight (kg; median- range)	69 (48-88)	69 (48-90)	N/S

**Table 2** - Mineral metabolism parameters before and after 6 months of cholecalciferol supplementation.

	<b>Baseline</b>	<b>6 months</b>	<b>p</b>
25(OH)D (ng/ml; mean $\pm$ SD)	18.1 $\pm$ 6.6	40.4 $\pm$ 10.4	< 0.001
Calcium (mg/dl; mean $\pm$ SD)	9.0 $\pm$ 0.6	9.4 $\pm$ 0.6	0.02
Phosphorus (mg/dl; mean $\pm$ SD)	4.8 $\pm$ 1.1	5.1 $\pm$ 1.7	N/S
Alkaline Phosphatase (U/L; mean $\pm$ SD)	78.1 $\pm$ 29.6	80.5 $\pm$ 36.6	N/S
Intact Parathormone(pg/ml; mean $\pm$ SD)	165 $\pm$ 80	184 $\pm$ 139	N/S

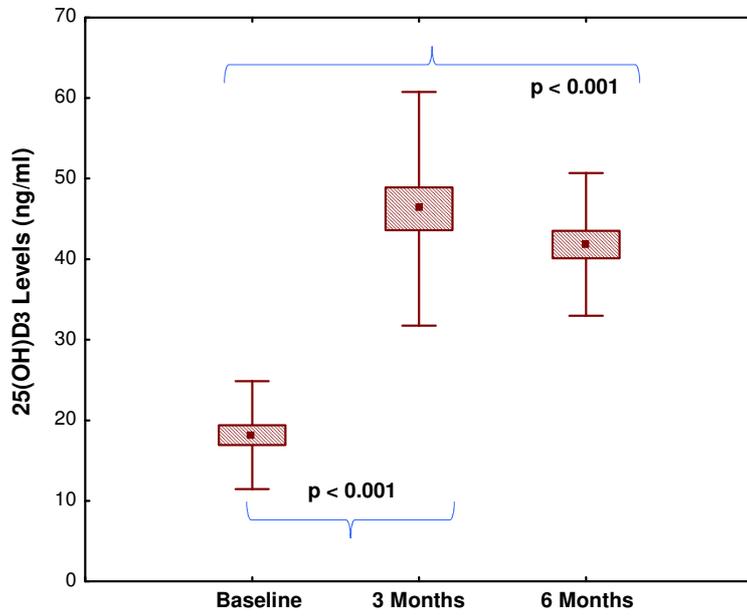
**Table 3** - Inflammation biomarkers before and after 6 months of cholecalciferol supplementation.

	<b>Baseline</b>	<b>6 months</b>	<b>p</b>
Serum Albumin (mean $\pm$ SD)	4.2 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.3	N/S
hs-CRP(mg/L; median-range)	0.62 (0.05 – 29.6)	0.5 (0.02 – 5.66)	0.04
IL-6 (pg/ml; median-range)	6.44 (1.36 – 19.58)	3.83(0.78 – 19.45)	0.018

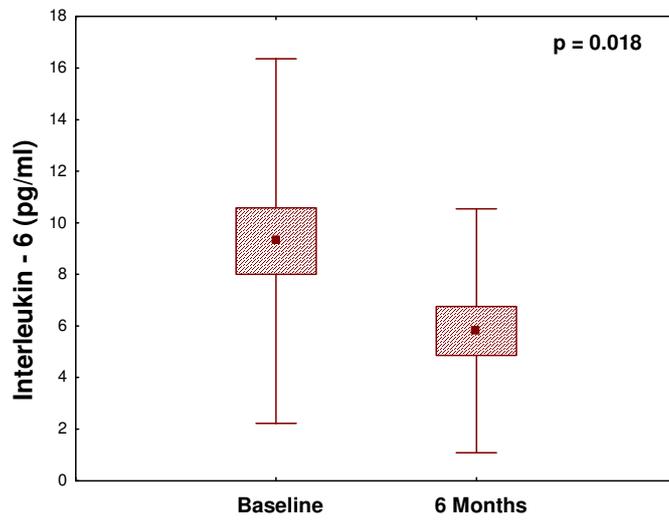
**Table 4.** Echocardiographic parameters at the baseline and after 6 months of cholecalciferol supplementation.

	<b>Baseline</b>	<b>6 months</b>	<b>p</b>
LVM index (g/m <sup>2</sup> ; mean ± SD)	175.1 ± 63.1	159.0 ± 55.2	0.03
Systolic Dysfunction (%)	10%	13%	N/S
Diastolic Dysfunction (%)	80%	76%	N/S
Valvular Calcification (%)	26%	30%	N/S
Relative wall thickness	0.48 ± 0.1	0.48 ± 0.08	N/S
Systolic left ventricular diameter (mm)	32 ± 5	35 ± 4	N/S
Diastolic left ventricular diameter (mm)	51 ± 5	50 ± 4	N/S

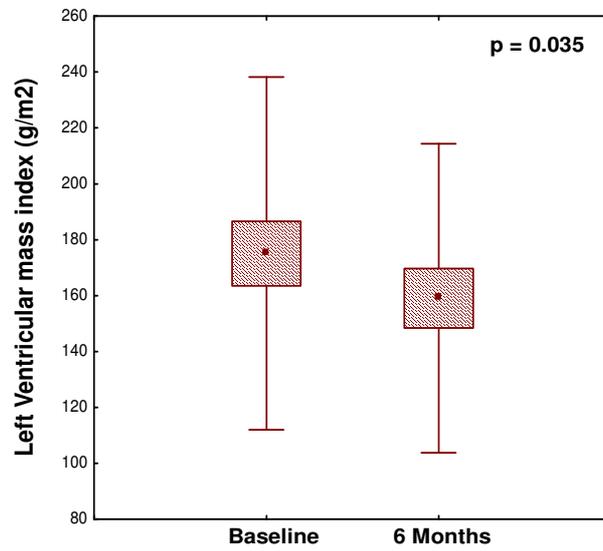
**Figure 1.** 25(OH) D levels at the baseline and after 3 and 6 months of cholecalciferol supplementation.



**Figure 2.** Interleukin-6 levels at the baseline and after 6 months of cholecalciferol supplementation.



**Figure 3.** Left ventricular mass index ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) at the baseline and after 6 months of cholecalciferol supplementation.



## **References**

1. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol.* 1998 Sep-Oct;11(5):239-45.
2. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Aug;15(8):2208-18.
3. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006 Jan;47(1):139-48.
4. Del Valle E, Negri AL, Aguirre C, Fradinger E, Zanchetta JR. Prevalence of 25(OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis. *Hemodial Int.* 2007 Jul;11(3):315-21.
5. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. *Am J Nephrol.* 2004 Sep-Oct;24(5):503-10.
6. Mucsi I, Almasi C, Deak G, Marton A, Ambrus C, Berta K, et al. Serum 25(OH)-vitamin D levels and bone metabolism in patients on maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol.* 2005 Oct;64(4):288-94.
7. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28.
8. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(1):33-43.
9. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 2):H1751-8.
10. Al-Aly Z. Vitamin D as a novel nontraditional risk factor for mortality in hemodialysis patients: the need for randomized trials. *Kidney Int.* 2007 Oct;72(8):909-11.
11. London GM, Guerin AP, Verbeke FH, Pannier B, Boutouyrie P, Marchais SJ, et al. Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Feb;18(2):613-20.
12. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2008 Jan 29;117(4):503-11.
13. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009 Aug(113):S1-130.

14. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008 Apr;87(4):1087S-91S.
15. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE. Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uremia. *Kidney Int.* 1996 May;49(5):1428-34.
16. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation.* 1977 Apr;55(4):613-8.
17. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol.* 1986 Feb 15;57(6):450-8.
18. Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002 Feb;15(2):167-84.
19. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 Dec;18(12):1440-63.
20. Sohn DW, Song JM, Zo JH, Chai IH, Kim HS, Chun HG, et al. Mitral annulus velocity in the evaluation of left ventricular diastolic function in atrial fibrillation. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999 Nov;12(11):927-31.
21. Pritchett AM, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Rodeheffer RJ, Bailey KR, Redfield MM. Left atrial volume as an index of left atrial size: a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Mar 19;41(6):1036-43.
22. Barberato SH, Pecoits Filho R. Prognostic value of left atrial volume index in hemodialysis patients. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Jun;88(6):643-50.
23. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S112-9.
24. Stinghen AE, Bucharles S, Riella MC, Pecoits-Filho R. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Blood Purif.* 2002;29(2):114-20.
25. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2005 Jun;45(6):1026-33.
26. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol.* 2008 Dec 9;52(24):1949-56.

27. Tokmak F, Quack I, Schieren G, Sellin L, Rattensperger D, Holland-Letz T, et al. High-dose cholecalciferol to correct vitamin D deficiency in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Dec;23(12):4016-20.
28. Saab G, Young DO, Gincherman Y, Giles K, Norwood K, Coyne DW. Prevalence of vitamin D deficiency and the safety and effectiveness of monthly ergocalciferol in hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract*. 2007;105(3):c132-8.
29. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, et al. Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in haemodialysis patients: effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Nov;23(11):3670-6.
30. Panichi V, De Pietro S, Andreini B, Bianchi AM, Migliori M, Taccola D, et al. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. *Kidney Int*. 1998 Nov;54(5):1463-9.
31. Cohen-Lahav M, Douvdevani A, Chaimovitz C, Shany S. The anti-inflammatory activity of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in macrophages. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(3-5):558-62.
32. Takahashi K, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, Kamimura T. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> suppresses interleukin-1beta-induced interleukin-8 production in human whole blood: an involvement of erythrocytes in the inhibition. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2002 Feb;24(1):1-15.
33. Pecoits-Filho R, Barany P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Sep;17(9):1684-8.
34. Matias PJ, Jorge C, Ferreira C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters. *Clin J Am Soc Nephrol*. May;5(5):905-11.
35. 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*. Feb;21(2):353-61.
36. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Nov;65(5):593-7.
37. London GM. Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 1:29-36.
38. Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 1989 Aug;36(2):286-90.
39. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 2002 Jul;110(2):229-38.

40. Achinger SG, Ayus JC. The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function. *Kidney Int Suppl.* 2005 Jun(95):S37-42.
41. Lemmila S, Saha H, Virtanen V, Ala-Houhala I, Pasternack A. Effect of intravenous calcitriol on cardiac systolic and diastolic function in patients on hemodialysis. *Am J Nephrol.* 1998;18(5):404-10.
42. Park CW, Oh YS, Shin YS, Kim CM, Kim YS, Kim SY, et al. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis.* 1999 Jan;33(1):73-81.
43. Coratelli P, Petrarulo F, Buongiorno E, Giannattasio M, Antonelli G, Amerio A. Improvement in left ventricular function during treatment of hemodialysis patients with 25-OHD3. *Contrib Nephrol.* 1984;41:433-7.
44. Rostand SG, Drueke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 Aug;56(2):383-92.
45. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 2004 Mar;79(3):362-71.

## 5) CONCLUSÕES

- A prevalência de hipovitaminose D em pacientes de hemodiálise que apresentam níveis baixos de paratormônio é bastante significativa e este padrão foi mais freqüentemente observado entre mulheres e diabéticos, em acordo com outros dados de literatura já previamente publicados;
- Não observamos correlações entre os níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> e os demais marcadores do metabolismo mineral (cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e paratormônio); 25(OH)D<sub>3</sub> e 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> também não apresentaram uma significativa correlação entre si;
- Essa população de pacientes em hemodiálise, mesmo livre de eventos cardiovasculares prévios, se apresenta com numerosas modificações ecocardiográficas e elevada prevalência de inflamação sistêmica;
- Entre os pacientes portadores de hipovitaminose D a prevalência de inflamação sistêmica avaliada por biomarcadores tradicionais é muito mais significativa que a prevalência de inflamação sistêmica entre pacientes que apresentam níveis normais de vitamina D;
- Os valores de PCR estiveram fortemente relacionados aos de 25(OH)D<sub>3</sub>, assim como os níveis de Albumina sérica; apesar de termos observado uma forte correlação entre PCR e IL-6, os níveis desse último biomarcador e os níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> não se correlacionaram;
- Os pacientes portadores de hipovitaminose D apresentaram, em média, menores dimensões cavitárias de ventrículo esquerdo e maior espessura relativa desta cavidade quando comparados aos pacientes com níveis normais de vitamina D. Esses achados permaneceram significativos (clínica ou estatisticamente) mesmo após avaliação por modelo multivariado;
- Esses resultados sugerem um papel potencial para a hipovitaminose D na fisiopatologia da doença cardiovascular relacionada à doença renal crônica por mecanismos que parecem ser independentes dos desarranjos do metabolismo mineral;

- O tratamento da hipovitaminose D com Colecalciferol administrado por um período de seis meses foi seguro e eficiente, tendo sido bem tolerado por todos os pacientes;
- A administração de Colecalciferol e a conseqüente correção da hipovitaminose D determinou impacto adverso em marcadores do metabolismo mineral, provocando alguns casos (10%) de hipercalcemia 90 dias após o início da administração da droga e um caso (3%) após 180 dias de uso da droga;
- Observamos, adicionalmente, que a administração de Colecalciferol não determinou alterações significativas em importantes variáveis do metabolismo mineral relacionadas ao remodelamento ósseo (Paratormônio e Fosfatase Alcalina);
- A utilização de vitamina D não ativada determinou abrandamento no processo inflamatório sistêmico, com reduções em média nos valores de Proteína C Reativa; não observamos, porém, mudança significativa nos valores médios de Albumina sérica;
- Os efeitos cardiovasculares, especificamente a nível miocárdico, da administração de Ergocalciferol foram significativos, com redução nos valores médios do Índice de Massa de Ventrículo esquerdo, avaliado por Ecocardiograma;
- Esses achados clínicos verificados em marcadores do metabolismo mineral, em parâmetros inflamatórios e em variáveis ecocardiográficas após 180 dias de administração de Ergocalciferol, sugerem que entre os pacientes de hemodiálise portadores de hipovitaminose D em com níveis baixos de PTH a administração de vitamina D foi segura, eficaz, determinou mínimo impacto adverso no metabolismo mineral e promoveu abrandamento de inflamação sistêmica e melhora em variáveis ecocardiográficas, potencialmente colaborando para regressão da miocardiopatia associada à doença renal crônica;

## 6) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados desses dois estudos realizados confirmam algumas informações já previamente observadas na literatura médica, especialmente uma elevada prevalência de hipovitaminose D (104-107) em pacientes portadores de DRC em diferentes estágios e entre aqueles em terapia hemodialítica crônica. Deficiência e insuficiência de vitamina D nessa população de pacientes são anormalidades bioquímicas bastante freqüentes, e que foram vistas em 75% de nossos casos. A maior parte dos estudos feitos até o momento sugere que a prevalência de hipovitaminose D na população portadora de DRC é ainda maior do que aquela observada na população geral e mesmo em países ensolarados como o Brasil este achado é bastante freqüente (110).

De maneira semelhante a outros estudos (104, 107), não foram observadas correlações entre níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> e os níveis séricos das demais variáveis do metabolismo mineral: cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e paratormônio. Também não foram observadas correlações entre os níveis séricos de 1,25(OH)D<sub>3</sub> e os níveis das mesmas variáveis.

Nenhum estudo até o momento, baseado nas informações até então disponíveis, estabeleceu como foco de interesse a verificação do déficit de vitamina D e suas possíveis associações com inflamação sistêmica e função miocárdica em uma população de pacientes portadora de baixos níveis de PTH, já que até recentemente, não existiam recomendações formais de diretrizes internacionais justificando ou sugerindo essa avaliação.

Embora muitos dos fatores de risco tradicionais para doença cardiovascular sejam habitualmente vistos na população em diálise crônica, diversos fatores de risco não tradicionais aparecem com real importância no estabelecimento de maior risco cardiovascular nesse segmento populacional, especialmente inflamação sistêmica (56, 58, 60). Dentre os biomarcadores cardiovasculares disponíveis para prática diária e pesquisas clínicas, Interleucina-6 (IL-6) e Proteína C Reativa (PCR) tem se mostrado muito úteis na caracterização e estratificação de risco cardiovascular em pacientes de hemodiálise.

No estudo aqui apresentado, a presença de hipovitaminose D esteve intimamente relacionada à presença de inflamação sistêmica, que foi avaliada pelos biomarcadores proteína C reativa, Interleucina-6 e por níveis séricos de albumina. A proporção de pacientes apresentando níveis de PCR > 3 mg/L foi significativamente mais alta (73%) no grupo de pacientes portando déficit de 25(OH)D<sub>3</sub> quando comparado com o grupo de pacientes que apresentava níveis normais da vitamina em questão (43%; p < 0.05). Adicionalmente, observamos uma correlação positiva e significativa entre níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> e níveis séricos de Albumina (r = 0.34; p = 0.007). Embora os níveis séricos de Interleucina-6 tenham se correlacionado fortemente com os de proteína C reativa (r = 0.71; p < 0.001), os níveis séricos de 25 (OH)D<sub>3</sub> não se correlacionaram com os de IL-6.

Diversos ensaios clínicos, modelos animais e estudos experimentais, além de revisões de literatura apresentam os possíveis mecanismos através dos quais a vitamina D e o sistema imune podem interagir. As células T “helper” desempenham papel central em todas as respostas imunológicas dependentes de antígenos específicos e tanto as células Th1 quanto Th2 são alvos das ações sistêmicas da 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Células T quiescentes CD4<sup>+</sup> expressam VDR em baixas concentrações, que aumentam em até cinco vezes após sua ativação (165).

Cohen-Lahav M e colaboradores (72) demonstraram em análises “in vitro” que 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reduz a expressão de TNF-α em macrófagos, por inibir a atividade de NFKappa B, um importante fator de transcrição para TNF-α e para outros mediadores inflamatórios. Estes achados sugerem, segundo os autores, que a vitamina D poderia, pelas propriedades observadas, funcionar como um agente antiinflamatório.

Takahashi K e colaboradores (73) também observaram um potencial efeito antiinflamatório de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, verificando um efeito inibitório desta vitamina na produção de Interleucina-8 (IL-8) em cultura de células de sangue humano. Panichi V e colaboradores (74) estudaram os efeitos do calcitriol em um modelo

“in vitro”, por incubação de células mononucleares com lipopolisacarídeos em pacientes portadores de DRC em HD, e observaram que calcitriol inibiu a síntese de TNF- $\alpha$  e de IL-2 beta num padrão dose-dependente, sugerindo um possível papel imunomodulatório da vitamina D.

Zehnder D e colaboradores (83) observaram, em um estudo com 174 pacientes em diferentes estágios de DRC, que os níveis séricos de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  estiveram inversamente e significativamente correlacionados com a produção de MCP-1 urinário e com infiltração de macrófagos no tecido renal.

Tan X e colaboradores (77) avaliaram um modelo animal de uropatia obstrutiva e os potenciais efeitos da administração de Paricalcitol (um análogo sintético da vitamina D) nas lesões túbulo-intersticiais renais. Comparado aos controles, a utilização de Paricalcitol significativamente atenuou o processo de fibrose intersticial, reduzindo o volume intersticial e a deposição tecidual de colágeno.

Agarwal R e colaboradores analisaram 220 pacientes portadores de DRC em estágios III e IV de evolução em três estudos clínicos randomizados e controlados por placebo, objetivando analisar a segurança e a eficácia de Paricalcitol na forma oral em reduzir proteinúria, um conhecido marcador de risco cardiovascular. Todos os pacientes apresentavam, também, hiperparatireoidismo secundário. Após um período de tratamento de até 24 semanas, os grupos de pacientes que receberam Paricalcitol apresentaram, em média, significativas reduções de proteinúria, quando comparados a placebo. O abrandamento nos níveis de proteinúria ocorreu de forma independente da utilização concomitante de drogas bloqueadoras de receptores de angiotensina e inibidores da ECA.

Recentemente, Fishbane S (166) estudando 61 pacientes portadores de variados estágios de DRC e com proteinúria  $> 400$  mg/dia observaram, também, que a utilização de Paricalcitol oral reduziu a excreção urinária de proteínas de forma significativa, quando comparado a placebo.

As conclusões finais desses trabalhos citados, realizados tanto em modelos experimentais quanto em seres humanos portadores de DRC em variados

estágios de evolução, confirmam a influência em potencial da vitamina D nos tipos celulares envolvidos no processo de inflamação sistêmica (sistema imune) e sugerem potenciais benefícios (efeitos pleiotrópicos) da utilização de vitamina D ou de seus análogos para atenuação do processo inflamatório intra-renal ou sistêmico.

Após avaliação ecocardiográfica dos pacientes deste estudo, pudemos observar uma elevada prevalência de hipertrofia de ventrículo esquerdo, tanto na população portadora de hipovitaminose D quanto entre aqueles que se apresentavam com níveis normais dessa vitamina. A alteração ecocardiográfica mais freqüentemente observada foi hipertrofia concêntrica de VE, vista em 59 % dos pacientes, enquanto hipertrofia excêntrica foi observada em 25% dos casos. Os demais casos foram de ecocardiogramas normais (11% dos casos) e observamos três casos de remodelamento de VE sem aumento de massa ventricular (5%). Disfunção diastólica também foi uma anormalidade ecocardiográfica muito observada entre estes pacientes (68% dos casos), de forma semelhante a outros estudos publicados (151, 167).

Hipertrofia de ventrículo esquerdo na população em terapia dialítica crônica é a anormalidade cardiovascular mais freqüentemente vista (18) e exibe um potencial prognóstico de adversidade muito significativo. Embora diversos fatores de risco para o desenvolvimento da miocardiopatia relacionada à doença renal crônica já tenham sido muito bem estudados, incluindo os conhecidos fenômenos de pré-carga e pós-carga (16), o impacto cardiovascular dos distúrbios do metabolismo mineral, em especial o papel do déficit de ativação dos receptores de vitamina D no leito cardiocirculatório, vem merecendo especial interesse nos últimos anos (35, 38, 39).

Embora os reais mecanismos responsáveis pela associação entre hipovitaminose D e doenças cardiovasculares não estejam ainda claramente elucidados, existem evidências de que a ativação sistêmica de receptores para vitamina D pode ser importante para inibir mecanismos fisiopatológicos decorrentes da falta dessa vitamina (39). A vitamina D parece exercer diversos efeitos no crescimento e desenvolvimento do tecido miocárdico (36). Walters M. R.

e colaboradores (168) demonstraram que a incorporação de cálcio pelas células dos cardiomiócitos é em parte regulada pela vitamina D, num efeito mediado pelo receptor nuclear dessa vitamina, o que exigiu transcrição e síntese de proteínas. O déficit de vitamina D pode determinar uma mudança no padrão de distribuição das cadeias de miosina no músculo cardíaco, favorecendo a formação de isotipos V1, o que já foi demonstrado ser um fator que determina alteração na contratilidade dos miócitos, em animais de experimentação (169, 170).

O'Connell T. D. e colaboradores (171), estudando cardiomiócitos ventriculares de ratos, observaram que calcitriol deve participar da maturação de células miocárdicas, através de um mecanismo que envolve ativação de proteína quinase, bloqueando a maturação das células musculares, mantendo-as em estado imaturo.

No presente estudo observamos que a presença de hipovitaminose D esteve associada a alterações ecocardiográficas compatíveis com um padrão geométrico de remodelamento concêntrico de ventrículo esquerdo, pelo achado de aumento de espessura relativa de parede de VE, acompanhada de menores dimensões sistólica e diastólica dessa cavidade. Adicionalmente, não observamos relação entre o padrão de hipovitaminose D e índice de massa ventricular esquerda, que apresentou resultado semelhante nos dois grupos estudados.

É relevante lembrar que a esta população em análise foi constituída de pacientes que não haviam sofrido eventos cardiovasculares maiores no passado, e que apresentavam, em média, níveis adequados de hemoglobina ( $12,2 \pm 3,4$  g/dl), pressão arterial em níveis próximos dos ideais para a população em diálise (pressão arterial sistólica média de  $136 \pm 16$  mmHg e pressão arterial diastólica média de  $83 \pm 7$  mmHg) e uso, em média, de um número pequeno de drogas anti-hipertensivas. De fato, não observamos diferenças entre os grupos quando comparamos nível sérico médio de hemoglobina, valores médios de pressão arterial sistólica, bem como número e tipo de drogas anti-hipertensivas em uso (inibidores da ECA e BRA), variáveis que, classicamente, podem determinar alterações ou modificações no padrão geométrico de VE.

Adicionalmente, os níveis médios de pressão arterial diastólica foram ainda mais baixos entre os pacientes que apresentavam hipovitaminose D. Dessa maneira, esses achados ecocardiográficos poderiam sugerir a presença de um padrão de remodelamento concêntrico associado ao déficit de vitamina D por estarmos, eventualmente, diante de um quadro ecocardiográfico que anteceda o de verdadeira hipertrofia concêntrica, ou antes, poderíamos estar observando um quadro mais precoce da miocardiopatia urêmica, no qual o déficit de vitamina D poderia ocupar um papel central. Devido ao caráter transversal do estudo, não é possível a certificação dessa hipótese e estudos prospectivos focando padrões ecocardiográficos de hipertrofia ventricular na população portadora de DRC associada à hipovitaminose D devem ser estimulados, objetivando caracterizar melhor o padrão ecocardiográfico aqui observado.

Por fim, dentre os nossos resultados, destacamos a presença de uma elevada prevalência de déficit de vitamina D entre os pacientes diabéticos de nossa população. A literatura médica apresenta diversos estudos que apontam para uma relação significativa entre o déficit de vitamina D e o risco no desenvolvimento de Diabetes Mellitus e da Síndrome Metabólica (92, 172-174).

Chiu KC e colaboradores (92) observaram, em estudo clínico com 126 pacientes não diabéticos, que os níveis séricos de 25(OH)D<sub>3</sub> estiveram fortemente e positivamente associados com um índice de sensibilidade à insulina e negativamente relacionados com os níveis plasmáticos glicêmicos, após teste oral de tolerância à glicose, sugerindo ação benéfica da vitamina D na sensibilidade à insulina e que o déficit da mesma vitamina pode afetar as funções das células beta pancreáticas. Em outro estudo, avaliando pacientes com déficit de vitamina D e o potencial impacto da correção do mesmo na homeostase glicêmica (175), não se observou qualquer efeito na glicemia, nas concentrações de insulina e na sensibilidade à insulina.

Diversas relações em potencial entre a presença de déficit de vitamina D e o desenvolvimento de Diabetes Mellitus de tipos I e II já foram observadas e discutidas na literatura (176). A repleção com vitamina D em pacientes diabéticos

de tipo II e portadores de hipovitaminose D determinou melhora no controle glicêmico e na secreção de insulina, sugerindo um papel em potencial da vitamina D no desenvolvimento de Diabetes tipo II (172). Estudo observacional em mulheres menopausadas (177) revelou que, em média, os níveis de 25 hidroxivitamina D eram consistentemente mais baixos entre as pacientes diabéticas, assim como a prevalência de deficiência severa (<5 ng/ml) desta vitamina e os valores da ingestão diária de cálcio, não se podendo, contudo, estabelecer relações de causa e efeito nos achados daquele estudo.

Recente meta-análise publicada, relacionando déficit de vitamina D com o desenvolvimento de síndrome metabólica, (173) concluiu que níveis elevados de vitamina D em populações de meia idade e idosos funcionaram como protetores contra o desenvolvimento de doença cardiovascular, Diabetes Mellitus de tipo II e Síndrome Metabólica. Muito embora não se pudesse estabelecer realnexo causal entre ambas, os autores acreditam que intervenções objetivando o tratamento do déficit de vitamina D na população adulta poderiam resultar em benefícios metabólicos e cardiovasculares.

Os achados desse estudo sugerem que uma parcela significativa da população em terapia hemodialítica crônica pode estar exposta à hipovitaminose D e aos seus potenciais efeitos deletérios sobre o leito cardiovascular e sistema imune, pela inadequada ativação dos receptores sistêmicos para vitamina D. Até recentemente, o déficit de vitamina D na população em terapia hemodialítica crônica não era formalmente estudado, já que as diretrizes até então vigentes não traziam informações que objetivamente orientassem a sua procura (121). Em 2009 novas diretrizes para o tratamento dos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo na doença renal crônica (122) passaram a sugerir que o nível sérico de vitamina D fosse ativamente verificado em pacientes renais crônicos em estágios 3-5 (e em diálise) da doença renal crônica, independentemente dos níveis de paratormônio, e que este déficit observado deve ser tratado, utilizando-se das mesmas estratégias aceitas para a população geral.

Concluí-se que pacientes em hemodiálise portadores de déficit de 25 hidroxivitamina e sem níveis elevados de paratormônio apresentaram mais sinais de inflamação sistêmica e menores dimensões de VE, além de maior espessura relativa de parede dessa cavidade, o que sugere que o déficit de 25 hidroxivitamina D pode estar associado à inflamação sistêmica e com padrão geométrico ecocardiográfico de remodelamento concêntrico de VE. Esses resultados sugerem que déficit de vitamina D (hipovitaminose D) pode estar envolvido na doença cardiovascular relacionada à DRC por mecanismos não relacionados ao metabolismo mineral.

Acreditamos, assim como as diretrizes atuais sugerem, que os níveis séricos de vitamina D devam ser ativamente verificados na população em terapia por hemodiálise crônica, mesmo quando os níveis de paratormônio estiverem dentro dos limites recomendados para esta fase de evolução da DRC, objetivando-se redução nas complicações cardiovasculares desse segmento populacional através de adequada suplementação de vitamina D nos casos em que se confirme tal déficit.

Na segunda etapa do estudo (fase prospectiva), os pacientes portadores de hipovitaminose D inicialmente identificados foram suplementados com Colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) por um período de seis meses e os efeitos desse tratamento foram analisados levando-se em consideração os mesmos marcadores e variáveis anteriormente estudados. Nas primeiras doze semanas de tratamento os pacientes receberam doses de 50.000 UI semanais de Colecalciferol e nas doze semanas subseqüentes doses de 20.000 UI semanais, sempre após as sessões de hemodiálise de meio de semana, administradas diretamente pela equipe de enfermagem, garantindo aderência total por parte dos pacientes. As razões que hoje suportam a necessidade de suplementação da forma nutricional da vitamina D na DRC compreendem a necessidade de garantir adequado substrato para a produção de vitamina D na forma 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nos estágios II e IV da DRC e para prover quantidade suficiente de 25(OH)D<sub>3</sub> para os tecidos extra-renais, incluindo o leito cardiovascular e diversos tipos celulares do sistema imune.

Existem poucos estudos analisando a eficiência, perfil de segurança e impacto da administração de vitamina D nutricional para pacientes portando DRC em hemodiálise (109). Embora as populações estudadas sejam pequenas, a maior parte dos pacientes envolvidos em projetos de suplementação de vitamina D se beneficia da mesma, corrigindo adequadamente seus níveis séricos para valores > 30 ng/ml, estimados como adequados estoques de vitamina D tanto na população geral como na população em terapia dialítica (94, 110).

No presente estudo, os valores médios de 25(OH)D<sub>3</sub> sofreram um incremento significativo após 90 e 180 dias de suplementação com Colecalciferol quando comparados aos valores observados no início do estudo. Muito embora os níveis médios em 180 dias tenham permanecido dentro da faixa alvo recomendada, ou seja, valores séricos > 30 ng/ml, os valores médios após 90 dias de suplementação foram significativamente maiores do que os valores observados após 180 dias de tratamento ( $46.2 \pm 14.4$  x  $40.4 \pm 10.4$  ng/ml;  $p = 0.02$ ). Esses achados provavelmente estão relacionados à mudança de estratégia de suplementação com Colecalciferol que foi adotada após 90 dias de tratamento, quando a dose semanal foi reduzida para 20.000 UI. Assim como em outros estudos, nenhum episódio de intoxicação pela vitamina D foi observado (valores  $\geq 150$  ng/ml acompanhados de hipercalcemia) (94).

Especificamente, analisando-se os resultados dos valores de cálcio e de paratormônio, observamos alguns poucos episódios de hipercalcemia (valores de cálcio sérico  $\geq 10,5$  mg/dl). Detectamos dois casos de pacientes com valores de cálcio  $\geq 10,5$  mg/dl após três meses de administração de Ergocalciferol e um caso entre três e seis meses (ao final do estudo). Adicionalmente, os valores médios de PTHi, bem como os valores médios de fosfatase alcalina, não sofreram alterações significativas comparando-se os valores antes e após intervenção com vitamina D. Estas observações estão de acordo com as vistas em outro estudo realizado em pacientes de hemodiálise que receberam altas doses de Colecalciferol por período de até nove meses (123). Estes resultados podem sugerir que a droga apresenta um razoável perfil de segurança e que apenas em estágios mais precoces da

DRC as glândulas paratireóides responderiam á administração de vitamina D na forma não ativada (nutricional).

A miocardiopatia associada à doença renal crônica exibe uma fisiopatologia complexa, num cenário onde os fenômenos de pré-carga, fenômenos de pós-carga e alterações hormonais e sistêmicas não relacionadas a esses fenômenos parecem exercer papel crucial no seu desenvolvimento (16, 17) e a geração de novas estratégias de mais fácil e segura aplicabilidade precisam ser exploradas com o intuito de se determinar impacto em redução de morbi-mortalidade cardiovascular na uremia. Dentre essas possíveis estratégias encontra-se a ativação sistêmica de receptores para vitamina D no leito cardiovascular, especificamente a nível miocárdico, objetivando-se atenuação do processo de fibrose intersticial e da hipertrofia de cardiomiócitos. No presente estudo, assim como observado em estudo semelhante (15), a administração de vitamina D na forma nutricional determinou uma redução média na massa ventricular esquerda, sem, contudo, alterar o modelo geométrico inicialmente observado de remodelamento concêntrico, presente na etapa inicial do estudo. Essa redução no índice de massa de VE ocorreu de forma independente dos valores de pressão de pulso, nível médio de hemoglobina e uso de drogas anti-hipertensivas com potencial para determinar impacto no remodelamento ventricular esquerdo com inibidores da ECA e bloqueadores de receptores de angiotensina (BRAs). Os efeitos verificados podem ter ocorrido por atenuação do processo de fibrose intersticial, motivados ou não por bloqueio do sistema renina-angiotensina determinado pela administração de Colecalciferol

Inflamação sistêmica no contexto de DRC é fenômeno freqüentemente observado, apresenta múltiplas etiologias e está associada à morbi-mortalidade cardiovascular. A atenuação desse processo inflamatório é, assim, desejável, porém as estratégias terapêuticas nessa área ainda são muito restritas. Uma dessas estratégias com potencial terapêutico atraente é a correção da hipovitaminose D. Em decorrência de múltiplas interações entre o sistema imune e a vitamina D, a geração de um perfil de citocinas com menor potencial de geração de aterosclerose emerge como alvo terapêutico a ser mais bem

explorado. Nossos resultados mostram que a administração de Colecalciferol determinou abrandamento do processo inflamatório sistêmico, de forma semelhante aos resultados de outro autor (15), com redução em média nos valores de PCR após 90 e 180 dias de administração de vitamina D e redução, em média, dos valores de Interleucina-6, este último, resultado novo e ainda não observado nas publicações em literatura médica até o presente momento.

Em conclusão, a administração de Colecalciferol a pacientes de hemodiálise com níveis baixos de PTHi foi segura, eficiente e determinou um pequeno impacto em variáveis do metabolismo mineral (alguns episódios de hipercalcemia). Além disso, por seus potenciais efeitos pleiotrópicos relacionados ao sistema imune e aparelho cardiovascular, a correção da hipovitaminose D causou um abrandamento do processo inflamatório sistêmico, com redução em média dos níveis de PCR e de Interleucina-6 e impacto favorável na função miocárdica, com redução em média no índice de massa de VE após a suplementação com Colecalciferol. Esses achados sugerem que o nível de 25 hidroxivitamina D deve ser ativamente verificado na população em tratamento por hemodiálise e que os pacientes portando hipovitaminose D devem ser tratados, objetivando-se reduzir o risco cardiovascular relacionado à DRC.

## **7. ANEXOS**

*7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

*7.2 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR*

*7.3 Produção Científica Concomitante aos Projetos de Mestrado e Doutorado*

## 7.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu \_\_\_\_\_,  
RG nº \_\_\_\_\_, estou sendo convidado a participar de um estudo denominado: “Relação entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D3, achados ecocardiográficos e marcadores inflamatórios em pacientes de hemodiálise sem hiperparatireoidismo secundário”.

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso aceite participar desta pesquisa eu serei submetido à coleta de sangue para análise dos meus níveis de vitamina D, marcadores bioquímicos de inflamação sistêmica e exame de ecocardiograma transtorácico para adequada avaliação cardiovascular que o trabalho planeja realizar. A coleta da amostra de sangue será feita imediatamente antes de uma de minhas sessões regulares de hemodiálise e sendo assim sei que nenhum dano ocorrerá ao meu organismo com a realização desses exames. O exame de ecocardiograma tem por finalidade avaliar as condições do meu coração e sei que esse exame também não produz nenhum dano ao meu corpo. Eu e minha família receberemos todas as informações necessárias a respeito do andamento do trabalho e de seus resultados. Eu serei monitorado durante todo o período do estudo por exames regulares de rotina, que todos os pacientes renais crônicos realizam, com relação a variáveis clínicas do tratamento hemodialítico, como KT/V (qualidade da diálise oferecida, níveis de pressão arterial, níveis de hematócrito e hemoglobina) e outros parâmetros usados regularmente em meu tratamento habitual. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, nem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são, Dr. Sérgio Gardano Elias Bucharles, CRM 14292- PR, médico Nefrologista da Santa Casa de Curitiba e do Instituto do Rim do Paraná e o Dr. Roberto Pecoits-Filho, médico Nefrologista da PUC-PR com quem poderei manter contacto pelos telefones: 99658708 – 33119400 e 33226967. Estão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

O objetivo dos pesquisadores é estabelecer uma correlação direta entre deficiência de vitamina D e alterações cardíacas e de inflamação no meu corpo e poderei me beneficiar da inclusão neste projeto uma vez que se detectem essas alterações e as mesmas sejam adequadamente identificadas e tratadas. Caso meus níveis de vitamina D se encontrem abaixo dos valores normais, eu serei tratado e novos exames serão feitos após esse tratamento, com o objetivo de se estabelecer melhoras clínicas em meu organismo.

Li, portanto, este termo, fui orientado quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

---

Assinatura do sujeito de pesquisa

---

Assinatura dos pesquisadores

Curitiba \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008.

## 7.2 Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa PUCPR



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética em Pesquisa

### PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0001428/08**

Protocolo CEP Nº **2049**

Título do projeto **Relação entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D3, achados ecocardiográficos, marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial em pacientes de hemodiálise.**

Grupo **III**  
Versão **3**

Protocolo CONEP **0319.0.084.000-07**

Pesquisador responsável **Roberto Pecoits Filho**

Instituição

#### Objetivos

Objetivo geral

• Caracterizar os níveis séricos de vitamina D3 e suas correlações com a função cardiovascular, a inflamação sistêmica e disfunção endotelial em um grupo de pacientes estáveis em hemodiálise.

Objetivos específicos:

- Identificar a prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D em pacientes de hemodiálise;
- Avaliar a função miocárdica destes pacientes através de exame de ecocardiograma transtorácico;
- Mensurar a concentração plasmática de marcadores de inflamação sistêmica e vascular (disfunção endotelial);
- Estabelecer correlações entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D3, disfunção ventricular esquerda e marcadores de disfunção endotelial e inflamatórios em pacientes renais crônicos em terapia hemodialítica.

#### Comentários

A pesquisa insere-se em estudo transversal, baseado em uma população de aproximadamente cem pacientes em terapia hemodialítica crônica, de quatro centros de terapia renal substitutiva

#### Considerações

A metodologia foi adequada pelo pesquisador no atendimento de todas as pendências indicadas.

#### Termo de consentimento livre e esclarecido

Está de acordo com o proposto.

#### Recomendações

Recomendamos atualizar o cronograma no mês para a realização dos eventos.

Anexar ao protocolo um Termo de Compromisso do orientador, de aceite dos pagamentos de todos os exames através do Adicional de Bancada de Bolsa de produtividade em Pesquisa do CNPQ, em seu poder, para dirimir qualquer dúvida a respeito da pendência anterior apontada no orçamento.



Parecer Nº **0001428/08**

Protocolo CEP Nº **2049**

Título do projeto **Relação entre níveis séricos de 25-hidroxivitamina D3, achados ecocardiográficos, marcadores inflamatórios e de disfunção endotelial em pacientes de hemodiálise.**

Grupo **III**  
Versão **3**

Protocolo CONEP **0319.0.084.000-07**

Pesquisador responsável **Roberto Pecoits Filho**

Instituição

---

### Conclusões

Protocolo Aprovado com recomendações

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **09/04/2008**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado com recomendações**.

---

### Situação Aprovado com recomendações

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 09 de Abril de 2008.

  
**Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
PUCPR



## 7.3 Produção Científica Concomitante ao Doutorado

### 7.3.1) *Artigos completos publicados em periódicos e capítulo de livro*

a) **Characteristics and Causes of Immune Dysfunction related to Uremia and Dialysis.** Aline Borsato Hauser, Andréa E.M. Stinghen, Sawako Kato, Sérgio Bucharles, Carlos Aita, Yukio Yuzawa e Roberto Pecoits-Filho. Artigo publicado pelo periódico *Peritoneal Dialysis International*, 2008; 28(S3):S183–S187.

b) **Immune Mechanisms Involved in Cardiovascular Complications of Chronic Kidney Disease.** Andréa E. M. Stinghen, Sérgio Bucharles, Miguel Riella e Roberto Pecoits-Filho. Artigo publicado pelo periódico *Blood Purification*, 2010; 29:114–120.

c) **Efeitos Pleiotrópicos da Vitamina D na Doença Renal Crônica.** Sérgio Bucharles, Simone Gonçalves e Roberto Pecoits-Filho. Texto publicado como capítulo do livro **Atualidades em Nefrologia, Prof. Jenner Cruz, 10ª Edição, 2008, e gentilmente revisado pela Profª Dra. Melani Custódio.**

d) **Doença Renal Crônica: Mecanismos de Progressão e Abordagem Terapêutica.** Sérgio Bucharles e Roberto Pecoits-Filho. Artigo de revisão publicado pelo periódico *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2009 (31) Supl 1: 6-12.

e) **Avaliação e Manejo da Doença Cardiovascular em Pacientes com Doença Renal Crônica.** Sérgio Bucharles, Alexandre M. Varela, Silvio Henrique Barberato e Roberto Pecoits-Filho. Artigo de revisão publicado pelo periódico *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2010; 32(1):120-127.

f) **Prevalência e Impacto Prognóstico da Disfunção Diastólica Avançada na Doença Renal Crônica em Hemodiálise.** Silvio Henrique Barberato, Sérgio Bucharles, Admar Sousa, Costantino O. Costantini, Costantino R.F. Costantini e Roberto Pecoits-Filho. Artigo publicado pelo periódico *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 2010.

g) **Sevelamer decreases systemic inflammation in Parallel to a Reduction in Endotoxemia.** Andréa E.M. Stinghen, Simone Gonçalves, Sérgio Bucharles, Fábio Branco, Betina Grber, Aline Hauser e Roberto Pecoits-Filho. Artigo publicado pelo periódico *Blood Purification*, 2010.

h) **Solução de Cálcio a 2,5 meq/L em pacientes de diálise peritoneal com níveis de PTH inferiores a 150 é eficaz no restabelecimento dos valores de PTH preconizados pelas diretrizes atuais.** Thyago Moraes, Sérgio Bucharles, Sílvia Carreira Ribeiro, Ricardo Frumento, Miguel Riella e Roberto Pecoits-Filho. Artigo publicado pelo periódico *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 2010.

i) **A Gut Feeling on Endotoxemia: Causes and Consequences in Chronic Kidney Disease.** Aline Hauser, Andréa E.M. Stinghen, Simone Gonçalves, Sérgio Bucharles e Roberto Pecoits-Filho. Artigo de revisão (mini-review) publicado pelo periódico *Nephron Clinical Practice*, 2010.

**7.3.2) Artigos completos aguardando publicação:**

a) **Associação entre Inflamação Sistêmica e Dilatação do Átrio Esquerdo em Pacientes sob Hemodiálise (HD) Crônica sem Antecedentes de Doença Cardiovascular (DCV).** Silvio Henrique Barberato, Sérgio Bucharles, Admar Sousa, Costantino O. Costantini, Costantino R.F.Costantini e Roberto Pecoits-Filho. Artigo enviado ao periódico **Arquivos Brasileiros de Cardiologia, em 2010, aguardando revisão.**

b) **Hypertension and Chronic Kidney Disease Stage V: Pathophysiology and Treatment.** Sérgio Bucharles, Krissia K.S. Wallbach, Emilton Lima Júnior e Roberto Pecoits-Filho. Artigo de revisão enviado ao periódico **International Journal of Hypertension, 2010** e aguardando revisão.

**7.3.3) Apresentações dos Resultados dos Projetos de Mestrado e Doutorado em Congressos Nacionais e Internacionais:**

a) **25 Hydroxyvitamin D Deficit is Associated with Systemic Inflammation and Concentric Myocardial Geometric Pattern in Hemodialysis Patients without Secondary Hyperparathyroidism.** Apresentado na forma de pôster durante Congresso Mundial de Nefrologia, Milão, Itália, 2009.

b) **Deficiência de Vitamina D se associa a Alterações Ecocardiográficas em pacientes de Hemodiálise: Estudo inicial.** Apresentado como Tema Livre Oral durante Congresso Sul Brasileiro de Cardiologia, 2009 em Curitiba e premiado como melhor tema livre em apresentação oral – Prêmio Prof. Arnaldo Moura.

c) **Deficiência de 25 hidroxivitamina D se associa a inflamação sistêmica e a remodelamento concêntrico de ventrículo esquerdo em pacientes de hemodiálise sem hiperparatireoidismo secundário.** Apresentado como Tema Livre Oral no Congresso da Sociedade Latino-americana de Nefrologia, Cidade do México, Abril de 2009.

d) **Colecalciferol corrige hipovitaminose D e atenua inflamação sistêmica em pacientes de hemodiálise com níveis baixos de PTHi.** Apresentado como tema livre oral durante o III Congresso Sul Brasileiro de Nefrologia em Blumenau – Novembro de 2009 e premiado como melhor tema livre na categoria trabalhos de medicina.

e) **Hipovitaminose D e Doença Renal Crônica: Impacto na Inflamação Sistêmica e na Miocardiopatia de Pacientes em Hemodiálise com níveis baixos de PTHi.** Apresentado como tema livre oral no XXV Congresso Brasileiro de Nefrologia em Vitória-ES, no mês de Setembro de 2010.

## 8) REFERÊNCIAS

1. Burden R, Tomson C. Identification, management and referral of adults with chronic kidney disease: concise guidelines. *Clin Med*. 2005 Nov-Dec;5(6):635-42.
2. Clase CM, Garg AX, Kiberd BA. Prevalence of low glomerular filtration rate in nondiabetic Americans: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Am Soc Nephrol*. 2002 May;13(5):1338-49.
3. Foley RN, Collins AJ. End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Oct;18(10):2644-8.
4. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004 Sep 23;351(13):1296-305.
5. Stinghen AE, Bucharles S, Riella MC, Pecoits-Filho R. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2003;29(2):114-20.
6. Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, del Vecchio L. Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Aug;18 Suppl 7:vii2-9.
7. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 1996 Jul;11(7):1277-85.
8. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray D, Barre PE. Outcome and risk factors of ischemic heart disease in chronic uremia. *Kidney Int*. 1996 May;49(5):1428-34.
9. Harnett JD, Foley RN, Kent GM, Barre PE, Murray D, Parfrey PS. Congestive heart failure in dialysis patients: prevalence, incidence, prognosis and risk factors. *Kidney Int*. 1995 Mar;47(3):884-90.
10. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2000 Jul;58(1):353-62.

11. Foley RN, Herzog CA, Collins AJ. Smoking and cardiovascular outcomes in dialysis patients: the United States Renal Data System Wave 2 study. *Kidney Int.* 2003 Apr;63(4):1462-7.
12. Harnett JD, Kent GM, Barre PE, Taylor R, Parfrey PS. Risk factors for the development of left ventricular hypertrophy in a prospectively followed cohort of dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1994 Jan;4(7):1486-90.
13. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Giaccone G, Stancanelli B, et al. Left ventricular mass monitoring in the follow-up of dialysis patients: prognostic value of left ventricular hypertrophy progression. *Kidney Int.* 2004 Apr;65(4):1492-8.
14. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis.* 1996 Mar;27(3):347-54.
15. Matias PJ, Jorge C, Ferreira C, Borges M, Aires I, Amaral T, et al. Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters. *Clin J Am Soc Nephrol.* May;5(5):905-11.
16. Glassock RJ, Pecoits-Filho R, Barberato SH. Left ventricular mass in chronic kidney disease and ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Dec;4 Suppl 1:S79-91.
17. Ritz E. Left ventricular hypertrophy in renal disease: beyond preload and afterload. *Kidney Int.* 2009 Apr;75(8):771-3.
18. London GM. Left ventricular alterations and end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 1:29-36.
19. Gross ML, Ritz E. Hypertrophy and fibrosis in the cardiomyopathy of uremia--beyond coronary heart disease. *Semin Dial.* 2008 Jul-Aug;21(4):308-18.
20. Ozkahya M, Ok E, Cirit M, Aydin S, Akcicek F, Basci A, et al. Regression of left ventricular hypertrophy in haemodialysis patients by ultrafiltration and reduced salt intake without antihypertensive drugs. *Nephrol Dial Transplant.* 1998 Jun;13(6):1489-93.
21. London GM. Cardiovascular disease in chronic renal failure: pathophysiologic aspects. *Semin Dial.* 2003 Mar-Apr;16(2):85-94.

22. London GM, Parfrey PS. Cardiac disease in chronic uremia: pathogenesis. *Adv Ren Replace Ther.* 1997 Jul;4(3):194-211.
23. Malik J, Tuka V, Mokrejsova M, Holaj R, Tesar V. Mechanisms of chronic heart failure development in end-stage renal disease patients on chronic hemodialysis. *Physiol Res.* 2009;58(5):613-21.
24. Vlahakos DV, Hahalis G, Vassilakos P, Marathias KP, Geroulanos S. Relationship between left ventricular hypertrophy and plasma renin activity in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Nov;8(11):1764-70.
25. Bader M. Molecular interactions of vasoactive systems in cardiovascular damage. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001 Nov;38 Suppl 2:S7-9.
26. Cannella G, Paoletti E, Delfino R, Peloso G, Rolla D, Molinari S. Prolonged therapy with ACE inhibitors induces a regression of left ventricular hypertrophy of dialyzed uremic patients independently from hypotensive effects. *Am J Kidney Dis.* 1997 Nov;30(5):659-64.
27. London GM, Drueke TB. Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1997 Jun;51(6):1678-95.
28. Speiser B, Riess CF, Schaper J. The extracellular matrix in human myocardium: Part I: Collagens I, III, IV, and VI. *Cardioscience.* 1991 Dec;2(4):225-32.
29. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 1989 Jun;13(7):1637-52.
30. Rostand SG, Gretes JC, Kirk KA, Rutsky EA, Andreoli TE. Ischemic heart disease in patients with uremia undergoing maintenance hemodialysis. *Kidney Int.* 1979 Nov;16(5):600-11.
31. Tyralla K, Amann K. Cardiovascular changes in renal failure. *Blood Purif.* 2002;20(5):462-5.
32. Tyralla K, Amann K. Morphology of the heart and arteries in renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2003 May(84):S80-3.
33. Curtis BM, Parfrey PS. Congestive heart failure in chronic kidney disease: disease-specific mechanisms of systolic and diastolic heart failure and management. *Cardiol Clin.* 2005 Aug;23(3):275-84.

34. Siedlecki AM, Jin X, Muslin AJ. Uremic cardiac hypertrophy is reversed by rapamycin but not by lowering of blood pressure. *Kidney Int.* 2009 Apr;75(8):800-8.
35. Valdivielso JM, Ayus JC. Role of vitamin D receptor activators on cardiovascular risk. *Kidney Int Suppl.* 2008 Dec(111):S44-9.
36. Achinger SG, Ayus JC. The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function. *Kidney Int Suppl.* 2005 Jun(95):S37-42.
37. Levin A. Kidneys, hearts, hormones and immunomodulators: integrated understandings. *Blood Purif.* 2006;24(1):46-50.
38. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(1):33-43.
39. Kovesdy CP, Kalantar-Zadeh K. Vitamin D receptor activation and survival in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008 Jun;73(12):1355-63.
40. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002 Jul;110(2):229-38.
41. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Jan;288(1):E125-32.
42. Bodyak N, Ayus JC, Achinger S, Shivalingappa V, Ke Q, Chen YS, et al. Activated vitamin D attenuates left ventricular abnormalities induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitive animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Oct 23;104(43):16810-5.
43. Mancuso P, Rahman A, Hershey SD, Dandu L, Nibbelink KA, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin-D3 treatment reduces cardiac hypertrophy and left ventricular diameter in spontaneously hypertensive heart failure-prone (cp/+) rats independent of changes in serum leptin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008 Jun;51(6):559-64.
44. Lemmila S, Saha H, Virtanen V, Ala-Houhala I, Pasternack A. Effect of intravenous calcitriol on cardiac systolic and diastolic function in patients on hemodialysis. *Am J Nephrol.* 1998;18(5):404-10.

45. Kim HW, Park CW, Shin YS, Kim YS, Shin SJ, Choi EJ, et al. Calcitriol regresses cardiac hypertrophy and QT dispersion in secondary hyperparathyroidism on hemodialysis. *Nephron Clin Pract.* 2006;102(1):c21-9.
46. Park CW, Oh YS, Shin YS, Kim CM, Kim YS, Kim SY, et al. Intravenous calcitriol regresses myocardial hypertrophy in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis.* 1999 Jan;33(1):73-81.
47. O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, Somerman MJ, Simpson RU. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 2):H1751-8.
48. Diez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2007 Jul;9(7):546-50.
49. Diez J, Laviades C. [Hypertensive heart disease in the patient with chronic kidney disease]. *Nefrologia.* 2008;28(2):135-42.
50. Barberato SH, Pecoits-Filho R. [Echocardiographic alterations in patients with chronic kidney failure undergoing hemodialysis]. *Arq Bras Cardiol.* Jan;94(1):140-6.
51. Kalantar-Zadeh K, Ikizler TA, Block G, Avram MM, Kopple JD. Malnutrition-inflammation complex syndrome in dialysis patients: causes and consequences. *Am J Kidney Dis.* 2003 Nov;42(5):864-81.
52. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Bianchi AM, Giovannini L, et al. C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. *Nephron.* 2002 Aug;91(4):594-600.
53. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 2003 Jun;41(6):1212-8.
54. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):648-58.
55. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2000 Mar;35(3):469-76.

56. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, Barany P, Wang K, Pecoits-Filho R, et al. Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006 Jan;47(1):139-48.
57. Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, Diczfalussy U, Wang T, Berglund L, et al. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 May;55(5):1899-911.
58. Rao M, Guo D, Perianayagam MC, Tighiouart H, Jaber BL, Pereira BJ, et al. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005 Feb;45(2):324-33.
59. Arici M, Walls J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int.* 2001 Feb;59(2):407-14.
60. Iseki K, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1999 Aug;14(8):1956-60.
61. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 8:33-8; discussion 40.
62. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005 Apr;67(4):1216-33.
63. Korevaar JC, van Manen JG, Dekker FW, de Waart DR, Boeschoten EW, Krediet RT. Effect of an increase in C-reactive protein level during a hemodialysis session on mortality. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Nov;15(11):2916-22.
64. Varaganam M, Finney H, Trevitt R, Sharples E, McCloskey DJ, Sinnott PJ, et al. Pretransplantation levels of C-reactive protein predict all-cause and cardiovascular mortality, but not graft outcome, in kidney transplant recipients. *Am J Kidney Dis.* 2004 Mar;43(3):502-7.
65. Rattazzi M, Puato M, Faggini E, Bertipaglia B, Zamboni A, Pualetto P. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens.* 2003 Oct;21(10):1787-803.
66. Axelsson J, Rashid Qureshi A, Suliman ME, Honda H, Pecoits-Filho R, Heimbürger O, et al. Truncal fat mass as a contributor to inflammation in end-stage renal disease. *Am J Clin Nutr.* 2004 Nov;80(5):1222-9.

67. Kato A, Odamaki M, Takita T, Maruyama Y, Kumagai H, Hishida A. Association between interleukin-6 and carotid atherosclerosis in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2002 Mar;61(3):1143-52.
68. Panichi V, Maggiore U, Taccola D, Migliori M, Rizza GM, Consani C, et al. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 May;19(5):1154-60.
69. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983 Dec;57(6):1308-10.
70. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. *Science.* 1983 Sep 16;221(4616):1181-3.
71. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2003 Mar;49(2):277-300.
72. Cohen-Lahav M, Douvdevani A, Chaimovitz C, Shany S. The anti-inflammatory activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in macrophages. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007 Mar;103(3-5):558-62.
73. Takahashi K, Horiuchi H, Ohta T, Komoriya K, Ohmori H, Kamimura T. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-1beta-induced interleukin-8 production in human whole blood: an involvement of erythrocytes in the inhibition. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002 Feb;24(1):1-15.
74. Panichi V, De Pietro S, Andreini B, Bianchi AM, Migliori M, Taccola D, et al. Calcitriol modulates in vivo and in vitro cytokine production: a role for intracellular calcium. *Kidney Int.* 1998 Nov;54(5):1463-9.
75. Staeva-Vieira TP, Freedman LP. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J Immunol.* 2002 Feb 1;168(3):1181-9.
76. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002 Mar 4;195(5):603-16.

77. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Dec;17(12):3382-93.
78. O'Herrin JK, Hullett DA, Heisey DM, Sollinger HW, Becker BN. A retrospective evaluation of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and its potential effects on renal allograft function. *Am J Nephrol*. 2002 Sep-Dec;22(5-6):515-20.
79. Agarwal R, Acharya M, Tian J, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005 Dec;68(6):2823-8.
80. Xing N, ML LM, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R, Griffin MD. Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Sep 27;297(3):645-52.
81. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med*. 2002 Apr;8(4):174-9.
82. Weinreich T, Muller A, Wuthrich RP, Booy C, Binswanger U. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the synthetic vitamin D analogue, KH 1060, modulate the growth of mouse proximal tubular cells. *Kidney Blood Press Res*. 1996;19(6):325-31.
83. Zehnder D, Quinkler M, Eardley KS, Bland R, Lепенies J, Hughes SV, et al. Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation. *Kidney Int*. 2008 Nov;74(10):1343-53.
84. Nolan CR. Strategies for improving long-term survival in patients with ESRD. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Nov;16 Suppl 2:S120-7.
85. Moe S, Drueke 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 Jun;69(11):1945-53.
86. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Aug;15(8):2208-18.
87. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S.

88. Zittermann A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006 Sep;92(1):39-48.
89. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S.
90. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005 Aug;26(5):662-87.
91. Li YC. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem.* 2003 Feb 1;88(2):327-31.
92. Chiu KC, Chu A, Go VL, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):820-5.
93. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8-28.
94. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007 Jul 19;357(3):266-81.
95. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr.* 2004 Mar;79(3):362-71.
96. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med.* 1998 Mar 19;338(12):777-83.
97. Terry AH, Sandrock T, Meikle AW. Measurement of 25-hydroxyvitamin D by the Nichols ADVANTAGE, DiaSorin LIAISON, DiaSorin RIA, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2005 Aug;51(8):1565-6.
98. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008 Apr;87(4):1087S-91S.
99. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3149-51.
100. Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK. Correlation among 25-hydroxyvitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 May;93(5):1804-8.
101. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jul;84(1):18-28.

102. Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr.* 2005 Feb;135(2):317-22.
103. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol.* 2008 Dec 9;52(24):1949-56.
104. Del Valle E, Negri AL, Aguirre C, Fradinger E, Zanchetta JR. Prevalence of 25(OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis. *Hemodial Int.* 2007 Jul;11(3):315-21.
105. Mucsi I, Almasi C, Deak G, Marton A, Ambrus C, Berta K, et al. Serum 25(OH)-vitamin D levels and bone metabolism in patients on maintenance hemodialysis. *Clin Nephrol.* 2005 Oct;64(4):288-94.
106. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, et al. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis.* 2005 Jun;45(6):1026-33.
107. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. *Am J Nephrol.* 2004 Sep-Oct;24(5):503-10.
108. 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 Jan;23(1):269-74.
109. Cuppari L, Garcia-Lopes MG. Hypovitaminosis D in chronic kidney disease patients: prevalence and treatment. *J Ren Nutr.* 2009 Jan;19(1):38-43.
110. Cuppari L, Carvalho AB, Draibe SA. Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country. *J Ren Nutr.* 2008 Sep;18(5):408-14.
111. Shah N, Bernardini J, Piraino B. Prevalence and correction of 25(OH) vitamin D deficiency in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 2005 Jul-Aug;25(4):362-6.
112. Aloni Y, Shany S, Chaimovitz C. Losses of 25-hydroxyvitamin D in peritoneal fluid: possible mechanism for bone disease in uremic patients treated with chronic ambulatory peritoneal dialysis. *Miner Electrolyte Metab.* 1983 Mar-Apr;9(2):82-6.

113. Al-Aly Z. Vitamin D as a novel nontraditional risk factor for mortality in hemodialysis patients: the need for randomized trials. *Kidney Int.* 2007 Oct;72(8):909-11.
114. Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, Emoto M, Tahara H, Koyama H, et al. Lower risk for cardiovascular mortality in oral 1alpha-hydroxy vitamin D3 users in a haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Jan;19(1):179-84.
115. Teng M, Wolf M, Lowrie E, Ofsthun N, Lazarus JM, Thadhani R. Survival of patients undergoing hemodialysis with paricalcitol or calcitriol therapy. *N Engl J Med.* 2003 Jul 31;349(5):446-56.
116. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN, Lazarus JM, Hernan MA, Camargo CA, Jr., et al. Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Apr;16(4):1115-25.
117. Melamed ML, Eustace JA, Plantinga L, Jaar BG, Fink NE, Coresh J, et al. Changes in serum calcium, phosphate, and PTH and the risk of death in incident dialysis patients: a longitudinal study. *Kidney Int.* 2006 Jul;70(2):351-7.
118. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA, Rohrscheib MR, Bedrick EJ, Meyer KB, et al. Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney Int.* 2006 Nov;70(10):1858-65.
119. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, Shinaberger CS, et al. Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2006 Aug;70(4):771-80.
120. Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Association of activated vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease. *Arch Intern Med.* 2008 Feb 25;168(4):397-403.
121. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2003 Oct;42(4 Suppl 3):S1-201.
122. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009 Aug(113):S1-130.
123. Tokmak F, Quack I, Schieren G, Sellin L, Rattensperger D, Holland-Letz T, et al. High-dose cholecalciferol to correct vitamin D deficiency in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Dec;23(12):4016-20.

124. Coratelli P, Petrarulo F, Buongiorno E, Giannattasio M, Antonelli G, Amerio A. Improvement in left ventricular function during treatment of hemodialysis patients with 25-OHD3. *Contrib Nephrol.* 1984;41:433-7.
125. Saab G, Young DO, Gincherman Y, Giles K, Norwood K, Coyne DW. Prevalence of vitamin D deficiency and the safety and effectiveness of monthly ergocalciferol in hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract.* 2007;105(3):c132-8.
126. Zisman AL, Hristova M, Ho LT, Sprague SM. Impact of ergocalciferol treatment of vitamin D deficiency on serum parathyroid hormone concentrations in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2007;27(1):36-43.
127. Al-Aly Z, Qazi RA, Gonzalez EA, Zeringue A, Martin KJ. Changes in serum 25-hydroxyvitamin D and plasma intact PTH levels following treatment with ergocalciferol in patients with CKD. *Am J Kidney Dis.* 2007 Jul;50(1):59-68.
128. Gallieni M, Kamimura S, Ahmed A, Bravo E, Delmez J, Slatopolsky E, et al. Kinetics of monocyte 1 alpha-hydroxylase in renal failure. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 2):F746-53.
129. Chandra P, Binongo JN, Ziegler TR, Schlanger LE, Wang W, Someren JT, et al. Cholecalciferol (vitamin D3) therapy and vitamin D insufficiency in patients with chronic kidney disease: a randomized controlled pilot study. *Endocr Pract.* 2008 Jan-Feb;14(1):10-7.
130. Blair D, Byham-Gray L, Lewis E, McCaffrey S. Prevalence of vitamin D [25(OH)D] deficiency and effects of supplementation with ergocalciferol (vitamin D2) in stage 5 chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr.* 2008 Jul;18(4):375-82.
131. DeVille J, Thorp ML, Tobin L, Gray E, Johnson ES, Smith DH. Effect of ergocalciferol supplementation on serum parathyroid hormone and serum 25-hydroxyvitamin D in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2006 Dec;11(6):555-9.
132. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Nov;89(11):5387-91.
133. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method. *Circulation.* 1977 Apr;55(4):613-8.

134. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, et al. Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol.* 1986 Feb 15;57(6):450-8.
135. de Simone G, Daniels SR, Devereux RB, Meyer RA, Roman MJ, de Divitiis O, et al. Left ventricular mass and body size in normotensive children and adults: assessment of allometric relations and impact of overweight. *J Am Coll Cardiol.* 1992 Nov 1;20(5):1251-60.
136. Savage DD, Garrison RJ, Kannel WB, Levy D, Anderson SJ, Stokes J, 3rd, et al. The spectrum of left ventricular hypertrophy in a general population sample: the Framingham Study. *Circulation.* 1987 Jan;75(1 Pt 2):126-33.
137. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005 Dec;18(12):1440-63.
138. Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 2002 Feb;15(2):167-84.
139. Rakowski H, Appleton C, Chan KL, Dumesnil JG, Honos G, Jue J, et al. Canadian consensus recommendations for the measurement and reporting of diastolic dysfunction by echocardiography: from the Investigators of Consensus on Diastolic Dysfunction by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 1996 Sep-Oct;9(5):736-60.
140. Sohn DW, Song JM, Zo JH, Chai IH, Kim HS, Chun HG, et al. Mitral annulus velocity in the evaluation of left ventricular diastolic function in atrial fibrillation. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999 Nov;12(11):927-31.
141. Nagueh SF, Middleton KJ, Kopelen HA, Zoghbi WA, Quinones MA. Doppler tissue imaging: a noninvasive technique for evaluation of left ventricular relaxation and estimation of filling pressures. *J Am Coll Cardiol.* 1997 Nov 15;30(6):1527-33.
142. Khouri SJ, Maly GT, Suh DD, Walsh TE. A practical approach to the echocardiographic evaluation of diastolic function. *J Am Soc Echocardiogr.* 2004 Mar;17(3):290-7.

143. Lester SJ, Ryan EW, Schiller NB, Foster E. Best method in clinical practice and in research studies to determine left atrial size. *Am J Cardiol.* 1999 Oct 1;84(7):829-32.
144. Pritchett AM, Jacobsen SJ, Mahoney DW, Rodeheffer RJ, Bailey KR, Redfield MM. Left atrial volume as an index of left atrial size: a population-based study. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Mar 19;41(6):1036-43.
145. Tsang TS, Barnes ME, Gersh BJ, Bailey KR, Seward JB. Left atrial volume as a morphophysiological expression of left ventricular diastolic dysfunction and relation to cardiovascular risk burden. *Am J Cardiol.* 2002 Dec 15;90(12):1284-9.
146. Moller JE, Hillis GS, Oh JK, Seward JB, Reeder GS, Wright RS, et al. Left atrial volume: a powerful predictor of survival after acute myocardial infarction. *Circulation.* 2003 May 6;107(17):2207-12.
147. Beinart R, Boyko V, Schwammenthal E, Kuperstein R, Sagie A, Hod H, et al. Long-term prognostic significance of left atrial volume in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Jul 21;44(2):327-34.
148. Barberato SH, Pecoits-Filho R. Usefulness of left atrial volume for the differentiation of normal from pseudonormal diastolic function pattern in patients on hemodialysis. *J Am Soc Echocardiogr.* 2007 Apr;20(4):359-65.
149. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998 Nov;32(5 Suppl 3):S112-9.
150. Pecoits-Filho R, Barany P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Sep;17(9):1684-8.
151. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int.* 1995 Jan;47(1):186-92.
152. Barberato SH, Pecoits-Filho R. Prognostic value of left atrial volume index in hemodialysis patients. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Jun;88(6):643-50.
153. Huting J, Alpert MA. Course of left ventricular diastolic dysfunction in end-stage renal disease on long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol.* 1993 Feb;39(2):81-7.

154. Covic A, Goldsmith DJ, Georgescu G, Venning MC, Ackrill P. Echocardiographic findings in long-term, long-hour hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 1996 Feb;45(2):104-10.
155. Foley RN, Curtis BM, Randell EW, Parfrey PS. Left Ventricular Hypertrophy in New Hemodialysis Patients without Symptomatic Cardiac Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* Apr 8.
156. Foley RN, Parfrey PS. Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol.* 1998 Sep-Oct;11(5):239-45.
157. London GM, Guerin AP, Verbeke FH, Pannier B, Boutouyrie P, Marchais SJ, et al. Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Feb;18(2):613-20.
158. Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation.* 2008 Jan 29;117(4):503-11.
159. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, et al. Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin D deficiency in haemodialysis patients: effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Nov;23(11):3670-6.
160. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 Nov;65(5):593-7.
161. Seibert E, Levin NW, Kuhlmann MK. Immunomodulating effects of vitamin D analogs in hemodialysis patients. *Hemodial Int.* 2005 Oct;9 Suppl 1:S25-9.
162. Mathieu C, Jafari M. Immunomodulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: therapeutic implications in hemodialysis and renal transplantation. *Clin Nephrol.* 2006 Oct;66(4):275-83.
163. Silberberg JS, Barre PE, Prichard SS, Sniderman AD. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 1989 Aug;36(2):286-90.
164. Rostand SG, Drueke TB. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999 Aug;56(2):383-92.

165. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, Wittke A. Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, and the immune system. *Am J Clin Nutr.* 2004 Dec;80(6 Suppl):1717S-20S.
166. Fishbane S, Chittineni H, Packman M, Dutka P, Ali N, Durie N. Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial. *Am J Kidney Dis.* 2009 Oct;54(4):647-52.
167. de Almeida EA, de Oliveira EI, Lopes JA, Almeida AG, Lopes MG, Prata MM. Diastolic function in several stages of chronic kidney disease in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a tissue Doppler imaging study. *Kidney Blood Press Res.* 2007;30(4):234-9.
168. Walters MR, Ilenchuk TT, Claycomb WC. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake by cultured adult rat ventricular cardiac muscle cells. *J Biol Chem.* 1987 Feb 25;262(6):2536-41.
169. O'Connell TD, Weishaar RE, Simpson RU. Regulation of myosin isozyme expression by vitamin D<sub>3</sub> deficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the rat heart. *Endocrinology.* 1994 Feb;134(2):899-905.
170. Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL, Lompre AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B. Myosin isoenzymic distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J Mol Cell Cardiol.* 1981 Dec;13(12):1071-5.
171. O'Connell TD, Giacherio DA, Jarvis AK, Simpson RU. Inhibition of cardiac myocyte maturation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology.* 1995 Feb;136(2):482-8.
172. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab.* 2008 Mar;10(3):185-97.
173. 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.* Mar;65(3):225-36.
174. Suzuki A, Kotake M, Ono Y, Kato T, Oda N, Hayakawa N, et al. Hypovitaminosis D in type 2 diabetes mellitus: Association with microvascular complications and type of treatment. *Endocr J.* 2006 Aug;53(4):503-10.
175. Tai K, Need AG, Horowitz M, Chapman IM. Glucose tolerance and vitamin D: effects of treating vitamin D deficiency. *Nutrition.* 2008 Oct;24(10):950-6.

176. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1247-57.

177. Isaia G, Giorgino R, Adami S. High prevalence of hypovitaminosis D in female type 2 diabetic population. *Diabetes Care*. 2001 Aug;24(8):1496.