ANA PAULA CALHEIROS DE LIMA

**Efeitos *in vitro* de soro de pacientes com nefrite lúpica ativa em células
de linhagem osteoblástica humana hFOB 1.19**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutora em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Viktoria Woronik

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Ana Paula Calheiros de
Efeitos in vitro de soro de pacientes com
nefrite lúpica ativa em células de linhagem
osteoblástica humana hFOB 1.19 / Ana Paula
Calheiros de Lima. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientadora: Viktoria Woronik.

Descritores: 1.Nefrite lúpica 2.Inflamação
3.Doença óssea 4.Vitamina D 5.Osteoblastos
6.Osteoclastos 7.Receptor ativador de fator
nuclear kappa-B 8.Osteoprotegerina 9.Via de
sinalização wnt 10.Beta catenina

USP/FM/DBD-382/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

DEDICATÓRIA

À minha Mãe, Dilza (*In Memoriam*), combinação perfeita entre doçura, altruísmo, força e resiliência, cujos ensinamentos moldaram meu caráter com amor e me prepararam para a vida.

AGRADECIMENTOS

Dedico minha gratidão a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Viktoria Woronik, pela acolhida no Ambulatório de Glomerulopatias, discussão de casos e compartilhamento de sua experiência na especialidade, por toda orientação, direcionamento e tempo dedicados para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Vanda Jorgetti, pelo suporte global ao trabalho, sem o qual eu não estaria escrevendo estas linhas hoje. Obrigada pela acolhida carinhosa no LIM 16 e por sempre acreditar que daria certo, apesar das adversidades.

À Dra. Luciene dos Reis, pela transmissão dos conhecimentos técnicos, apoio, dedicação diária e por sempre julgar que havia solução para cada entrave que passamos nesse período. Obrigada pela paciência com uma clínica de vocação e convicção que voltou para a bancada.

À Ivone Braga, Wagner Dominguez e Luzia Fukukawa, pelo apoio técnico e amizade. Vocês foram fundamentais na execução e conclusão deste projeto.

À toda equipe do LIM 16 que, em suas diferentes funções, edificam um ambiente propício e acolhedor a diversos alunos de diferentes áreas e graus de formação galgarem suas trajetórias científica e acadêmica.

Ao meu pai, Oscar, pelo companheirismo, renúncia e apoio incondicional, sem os quais minha trajetória profissional não teria sido possível.

Aos meus irmãos, Paulo e Francisco, pelos cuidados com a irmã caçula. Com certeza, fizeram a minha infância mais doce.

Aos meus amigos-irmãos da Residência de Nefrologia, Janaína Garcia e Gabriel Giollo, pela incrível parceria. Nunca mais haverá um “PowerTrio” como aquele.

A todos meus amigos, sob todas as alcunhas: “melhores”, “de infância”, “do colégio”, “da faculdade”, “da residência”, “da pós”, “de viagens”, “do trabalho”... Enfim, obrigada pelo companheirismo, empatia, complexidade, diversidade e leveza.

Às Instituições que possibilitaram a minha formação profissional superior: Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e Universidade de São Paulo (USP).

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Lista de símbolos
Resumo
Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nefrite lúpica (NL) e inflamação.....	3
1.2 Vitamina D e sistema imune.....	4
1.3 Remodelação, atividade inflamatória e doença óssea	5
1.4 Células osteoblásticas fetais humanas hFOB 1.19	15
2. RACIONAL	18
3. OBJETIVOS	20
4. MÉTODOS.....	22
4.1 Pacientes e controles.....	23
4.2 Critérios de inclusão de pacientes	23
4.3 Critérios de exclusão	24
4.4 Análises bioquímicas	24
4.5 Cultura de células	24
4.6 Incorporação de timidina	25
4.7 Citometria de fluxo.....	26
4.7.1 Marcação de proteínas de membrana	26
4.7.2 Marcação de proteínas intracelulares	27

4.8 qRT-PCR	28
4.9 Técnica de avaliação do conteúdo proteico – multiplex.....	29
4.10 Análise estatística	30
4.11 Resumo do protocolo do estudo	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Análises bioquímicas.....	33
5.2 Culturas de células hFOB 1.19	35
5.2.1 Incorporação de timidina.....	35
5.2.2 Citometria de fluxo.....	38
5.2.2.1 Moléculas de adesão e fosfatase alcalina (FA).....	38
5.2.2.2 NF- κ B, CD14 and TLR4 (Toll Like Receptor 4)	38
5.2.3 qRT-PCR	40
5.2.4 Conteúdo proteico – multiplex	40
6. DISCUSSÃO	43
6.1 Características clínicas e laboratoriais.....	44
6.2 Moléculas de adesão e fosfatase alcalina	45
6.3 Citocinas inflamatórias e perda óssea.....	45
6.4 Via Wnt/ β -catenina (DKK-1, SOST e β -catenina).....	47
6.5 RANKL/OPG	50
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ALCAM	<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
APC	Célula apresentadora de antígenos, do inglês <i>antigen-presenting cell</i>
AR	Artrite reumatoide
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas, do inglês <i>Bone morphogenetic proteins</i>
BM-MSC	<i>Bone marrow Mesenchymal stem cells</i>
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CF	Citometria de fluxo
CFU	Unidade formadora de colônia, do inglês <i>colony forming unit</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CRO	Compartimento de remodelação óssea
CS	Controles saudáveis
CYP24A1	24-hidroxilase, do inglês <i>cytochrome P450 family 24 subfamily A member 1</i>
DBP	Proteína ligadora de vitamina D, do inglês <i>vitamin D binding protein</i>
DC	Célula dendrítica, do inglês <i>Dendritic Cell</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DKK-1	Dickkopf-1
DRC	Doença renal crônica
eTFG	Taxa de filtração glomerular estimada
FA	Fosfatase alcalina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Foxp3⁺	<i>Forkhead box P3</i>
FvW	Fator de von Willebrand

Fz	Frizzled
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
hFOB	<i>Human fetal osteoblasts</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IFN-γ	Interferon gama
iPTH	Paratormônio intacto
IL	Interleucina
ISN/RPS	<i>International Society of Nephrology/Renal Pathology Society</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LIM16	Laboratório de Investigação Médica 16
LPS	Lipopolissacádideo
mRNA	RNA mensageiro, do inglês <i>Messenger ribonucleic acid</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
Msx2	<i>msh homeobox homolog 2</i>
n	Número da amostra
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NL	Nefrite lúpica
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
1,25(OH)₂D₃	1,25 dihidroxivitamina D ₃

OPG	Osteoprotegerina
Osx	Osterix
p	Significância estatística
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>
PGE2	Prostaglandina E2
PTH	Paratormônio
qRT-PCR	<i>Real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
r	Índice de correlação
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SEMA3B	Semaforina 3B
SFB	Soro fetal bovino
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.</i>
SOST	Esclerostina
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
WHO	<i>World Health Association</i>
Wnt	<i>Wingless</i>
TCA	Ácido tricloracético
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TFG	Taxa de filtração glomerular
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TRAP	<i>TNF-receptor associated protein</i>
Treg	Células T reguladoras
TREM2	<i>Triggering receptor expressed by myeloid cells-2</i>

VDR	Receptor de vitamina D, do inglês <i>vitamin D receptor</i>
vitD	Vitamina D
uOPG	Osteoprotegerina urinária
UVB	Ultravioleta, tipo B

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência dos <i>primers</i> para RT-PCR	29
Tabela 2.	Características clínicas e bioquímicas de pacientes e controles	34
Tabela 3.	Níveis séricos de citocinas em pacientes com nefrite lúpica e controles saudáveis.....	35
Tabela 4.	Proliferação celular	35
Tabela 5.	Representação da expressão de mRNA dos genes β -catenina, SOST, OPG e RANKL em culturas de células hFOB 1.19 com soro de controles e pacientes	41
Tabela 6.	Expressão proteica de células hFOB 1.19 cultivadas com soro de controles e pacientes	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema simplificado do metabolismo da vitamina D.....	4
Figura 2. Representação do processo de remodelação óssea	7
Figura 3. Esquema das etapas da diferenciação osteoclástica	8
Figura 4. Sistema RANK/RANKL/OPG.....	9
Figura 5. Esquema do envolvimento de IL-17 na indução da osteoclastogênese.....	10
Figura 6. Esquema da via de sinalização Wnt/ β -catenina	13
Figura 7. Esquema ilustrando equilíbrio entre formação e reabsorção ósseas	19
Figura 8. Ilustração do protocolo do estudo	31
Figura 9. Níveis séricos de citocinas em pacientes com nefrite lúpica e controles.....	36
Figura 10. Correlações e regressões lineares com parâmetros clínicos e laboratoriais..	37
Figura 11. Gráficos de citometria de fluxo.....	39

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca²⁺	Cálcio iônico
cm³	Centímetros cúbicos
cpm	Contagem por minuto
Cél	Células
dL	Decilitro
g	Grama
°C	Graus centígrados
h	Horas
=	Igual a
IMF	Intensidade média de fluorescência
kDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
L	Litro
+	Mais
+	Positivo ou carga positiva
±	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
μCi	Microcurie
μg	Micrograma
μl	Microlitro
m²	Metro quadrado
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
M	Molar

ng	Nanograma
pg	Picograma
%	Porcentagem
% cél +	Porcentagem de células positivas
U	Unidades
UI	Unidades internacionais
x	Versus

RESUMO

Lima APC. *Efeitos in vitro de soro de pacientes com nefrite lúpica ativa em células de linhagem osteoblástica humana hFOB 1.19* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: Perda óssea é um achado comum em pacientes com Nefrite Lúpica (NL), mesmo naqueles com diagnóstico recente. Algumas evidências indicam um aumento na osteoclastogênese como um dos distúrbios principais no processo de remodelamento ósseo. O objetivo deste estudo foi investigar algumas vias de sinalização (RANKL/OPG, Wnt/ β -catenin and Th17/IL-17) possivelmente envolvidas na osteoclastogênese anormal detectada em mulheres jovens ao diagnóstico de nefrite lúpica ativa, assim como avaliar a ação da vitamina D (VitD) nesse cenário e sua correlação com fatores inflamatórios. **MÉTODOS:** Realizamos culturas com a linhagem de células osteoblásticas humanas hFOB 1.19 (ATCC) e as dividimos em um grupo suplementado com soro de pacientes lúpicos (NL) (n=15) e em um grupo com soro de controles saudáveis (CS) (n=15) em vez de soro fetal bovino (SFB). Em seguida, adicionamos 1,25-dihidroxitamina D3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) em dois subgrupos nas concentrações 10^{-9}M e 10^{-7}M , resultando em 6 grupos: CS, CS+vitD 10^{-9}M , CS+vitD 10^{-7}M , NL, NL+vitD 10^{-9}M , NL+vitD 10^{-7}M . Após 48h da adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao meio de cultura, células hFOB foram tripsinizadas e separado o lisato celular de cada grupo. Ensaios de citometria de fluxo e multiplex foram realizados para quantificação das seguintes proteínas do lisato celular: CD166, CD54, fosfatase alcalina, RANKL, OPG, CD14, TLR4, NF- κB , SOST, DKK-1, β -catenina, IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22. RT-PCR foi empregado para quantificação de mRNA dos genes RANKL, SOST, OPG e β -catenina. **RESULTADOS:** Pacientes com NL evidenciaram maiores níveis séricos de DKK-1 ($2802,04 \pm 1380,06 \times 696,30 \pm 421,22\text{pg/ml}$, $p<0,001$), OPG ($560,12 \pm 333,56 \times 340,24 \pm 102,08\text{pg/ml}$, $p=0,0212$), TNF- α ($9,63 \pm 14,49 \times 1,27 \pm 0,35\text{pg/ml}$, $p=0,0337$), IL-6 ($15,58 \pm 39,08 \times 8,02 \pm 3,49$, $p=0,0053$) and IL-2 ($3,36 \pm 3,06 \times 1,54 \pm 0,9\text{pg/ml}$, $p=0,0353$) do que CS. Após exposição ao meio enriquecido com soro de pacientes com NL, células hFOB 1.19 apresentaram maior nível de mRNA de RANKL ($p=0,045$) e menor nível de proteína OPG ($178,81 \pm 66,40 \times 298,76 \pm 114,94\text{pg/mg}$, $p=0,0016$). Suplementação com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumentou a diferença da expressão das proteínas DKK-1 ($673,03 \pm 171,93 \times 456,69 \pm 234,53\text{pg/mg}$, $p=0,0215$), IL-6 ($0,80 \pm 0,25\text{pg/mg} \times 0,66 \pm 0,18$, $p=0,0417$) and IL-2 ($4,97 \pm 2,2 \times 3,90 \pm 1,66\text{pg/mg}$, $p=0,042$) entre hFOB NL comparados com hFOB CS, enquanto diminuiu o nível de mRNA de β -catenina em células do grupo NL. **DISCUSSÃO:** Dentro das limitações deste estudo, os resultados sugerem que os maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e talvez IL-2, detectadas em pacientes com NL pode ter induzido a maior expressão osteoblástica de RANKL, representada pelo maior nível de mRNA RANKL em células do grupo NL, e suprimido OPG, conforme a diminuição observada na quantificação proteica de OPG nos lisatos celulares, o que pode ter contribuído para a aumentada osteoclastogênese evidenciada pela biópsia óssea dessas pacientes. A adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não preveniu os efeitos inflamatórios do soro de pacientes com NL ativa em células hFOB 1.19 neste estudo.

Descritores: nefrite lúpica; inflamação; doença óssea; vitamina D; osteoblastos; osteoclastos; receptor ativador de fator nuclear kappa-B; osteoprotegerina; via de sinalização wnt; beta catenina.

SUMMARY

Lima APC. *The in vitro effects of the serum of patients with active lupus nephritis on the human osteoblast-like cell model hFOB 1.19* [thesis]. Sao Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

INTRODUCTION: Bone loss is a common finding in Lupus Nephritis (LN) patients even in those recently diagnosed. Some evidences indicate an increased osteoclastogenesis as the main disturb of the bone remodeling process. The aim of this study was to investigate some pathways (RANK-L/OPG, Wnt/ β -catenin and Th17/IL-17) possibly involved in the abnormal osteoclastogenesis detected in women at the diagnosis of proliferative LN as well as evaluating the action of vitamin D (vitD) in this scenario and their correlation with inflammatory factors. **METHODS:** We cultured the human osteoblastic cell line hFOB 1.19 (ATCC), and divided cultures into those supplemented with serum from healthy controls (HC) (n=15) and LN patients (n=15) instead of fetal bovine serum (FBS). Then 1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] was added in two subgroups at the concentrations of 10⁻⁹M e 10⁻⁷M while vitD was absent in one subgroup in both HC and LN cultures (HC, HC+vitD 10⁻⁹M, HC+vitD 10⁻⁷M, LN, LN+vitD 10⁻⁹M, LN+vitD 10⁻⁷M). After 48h of vitD addition, hFOB cultures were trypsinized. Flow cytometry and multiplex assays were performed to test CD166, CD54, alkaline phosphatase, RANKL, OPG, CD14, TLR4, NF- κ B, SOST, DKK-1, β -catenin, IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22 concentrations in the cell lysates. Polymerase reaction chain (RT-PCR) assays analyzed the expression of RANKL, SOST, OPG and β -catenin mRNA. **RESULTS:** LN patients showed higher serum levels of DKK-1 (2802.04 $\pm$ 1380.06 x 696.3 $\pm$ 421.22pg/ml, p<0.001), OPG (560.12 $\pm$ 333.56 x 340.24 $\pm$ 102.08pg/ml, p=0.0212), TNF- α (9.63 $\pm$ 14.49 x 1.27 $\pm$ 0.35pg/ml, p=0.0337), IL-6 (15.58 $\pm$ 39.08 x 8.02 $\pm$ 3.49, 0.0053) and IL-2 (3.36 $\pm$ 3.06 x 1.54 $\pm$ 0.9pg/ml, p=0.0353) than HCs. After exposure to medium enriched with LN serum, osteoblasts expressed higher RANKL mRNA (fold change 1.573, p=0.045) and lower OPG protein (178.81 $\pm$ 66.40 x 298.76 $\pm$ 114.94pg/mg, p=0.0016). 1,25(OH)₂D₃ supplementation increased the difference between LN and HC expression of DKK-1 (673.03 $\pm$ 171.93 x 456.69 $\pm$ 234.53pg/mg, p=0.0215), IL-6 (0.80 $\pm$ 0.25pg/mg x 0.66 $\pm$ 0.18, p=0.0417) and IL-2 (4.97 $\pm$ 2.2 x 3.90 $\pm$ 1.66pg/mg, p=0.042) proteins and diminished β -catenin mRNA in LN cells. **DISCUSSION:** Within the limitations of this study, the results suggest that the higher serum levels of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6 and perhaps IL-2, detected in LN patients would possibly have induced RANKL genes, as demonstrated by an enhanced RANKL mRNA expression in LN osteoblasts, and suppressed OPG protein in cell lysates, which would have contributed to the increased osteoclastogenesis detected in bone biopsies of women with new onset of LN. 1,25(OH)₂D₃ addition to osteoblast cultures did not prevent the effects of inflammatory LN serum *in vitro*.

Descriptors: lupus nephritis; inflammation; bone diseases; vitamin D; osteoblasts; osteoclasts; receptor activator of nuclear factor-kappa B; osteoprotegerin; wnt signaling pathway; beta catenin.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, que acomete inúmeros órgãos como pele, articulações, a hematopoese, o sistema nervoso central e periférico e os rins. Seu curso clínico é variável e, dependendo dos órgãos acometidos, pode ser extremamente agressivo. O LES cursa com grande atividade inflamatória, lesão tecidual e disfunção orgânica e os pacientes desenvolvem respostas imunes anormais, mediadas principalmente por linfócitos T e B, contra auto antígenos¹.

O envolvimento renal, nefrite lúpica (NL), é uma das complicações mais importantes, presente em cerca de 15% dos pacientes no momento do diagnóstico e em aproximadamente 40% durante o curso da doença². São considerados como portadores de NL os pacientes com manifestações clínicas, laboratoriais e histológicas, mesmo na ausência de critérios para o diagnóstico clínico de LES que são os estabelecidos pelo American College of Rheumatology (ACR)^{3,4}.

A patogênese da NL é complexa² e decorrente da deposição tecidual de complexos imunes^{5,6}, ativação do sistema complemento⁷, ativação de macrófagos e células dendríticas, ativação de linfócitos T e B, produção de grande quantidade de citocinas, com consequente infiltração celular, dano tecidual e perpetuação da inflamação^{6,8}. Inúmeros estudos demonstram o papel do desbalanço entre respostas via linfócitos T *helper* 1 (Th1) e 2 (Th2), dos linfócitos Th17 e células produtoras de interleucina (IL)-17 como promotoras de inflamação e defeitos da linhagem de células T regulatórias (Treg)⁹⁻¹³.

Pacientes com LES/NL frequentemente apresentam alterações na remodelação óssea, com consequente osteopenia, osteoporose e aumento do risco de fraturas^{14,15}. O comprometimento ósseo é multifatorial e influenciado por fatores de risco tradicionais como idade, sexo feminino, raça branca, baixo peso corporal, pós-menopausa e também por fatores relacionados à doença, como uso de corticoides, imobilidade, fotossensibilidade, fotoproteção, proteinúria, insuficiência renal e atividade inflamatória¹⁵.

A vitamina D é um hormônio esteroide com efeitos bem estabelecidos no metabolismo mineral e na saúde óssea^{16,17}. Mais recentemente, sua participação na regulação dos sistemas imune¹⁸ e cardiovascular¹⁹ tem sido fonte contínua de pesquisas. Nos pacientes com LES, a prevalência de insuficiência ou deficiência de vitamina D varia de 38-68% e 8-18%,

respectivamente²⁰⁻²². Paralelamente, tem sido demonstrada a participação da vitamina D tanto na imunidade inata, promovendo maturação de macrófagos, diminuindo apresentação de antígenos e produzindo substâncias antimicrobianas²³, quanto na adaptativa, redirecionando a resposta imune Th1 para Th2^{18, 24}, controlando a atividade inflamatória mediada via Th17 e estimulando a ação imunossupressora das células Treg^{25, 26}.

Apesar dos avanços nos últimos anos, muitas lacunas ainda precisam ser preenchidas sobre o papel da deficiência/insuficiência de vitamina D na atividade inflamatória de doenças autoimunes como LES/NL, participação na remodelação óssea e interação entre linhagens Th17 e Treg com células ósseas.

1.1 Nefrite lúpica (NL) e inflamação

Na patogênese da NL é fundamental a interação entre células residentes renais e inflamatórias, recrutadas pela deposição e/ou produção de imunocomplexos *in situ*, que ativam o sistema complemento, aumentam a produção de citocinas e moléculas de adesão, atraem macrófagos, células dendríticas e T, resultando em uma cascata de inflamação e dano tecidual^{2, 27}.

Estudos experimentais e em humanos sugerem que na NL ocorre um desbalanço entre os subtipos de células T e produção alterada de citocinas Th1/Th2. Chan e colaboradores¹⁰ demonstraram no sedimento urinário e no tecido renal de pacientes com NL um aumento da expressão do fator de transcrição associado à via Th1 (T-bet) e menor expressão do fator de transcrição associado à via Th2 (GATA-3). Os níveis de T-bet urinários (via Th1) se correlacionaram com o escore de atividade clínica SLEDAI²⁸, a intensidade da proteinúria e a gravidade da lesão renal.

Este e outros estudos sugerem ainda o predomínio da resposta Th1 nas formas proliferativas de NL (classes III e IV WHO, ISN/ RPS – World Health Organization²⁹, International Society of Nephrology /Renal Pathology Society⁴), e da via Th2 na forma membranosa da doença (classe V)⁹⁻¹¹. Além disso, a expansão da linhagem Th17 e de células regulatórias Treg defectivas em número e função também exerceriam um papel relevante na modulação da sinalização inflamatória e, portanto, maior dano renal¹³.

1.2 Vitamina D e sistema imune

A vitamina D é um hormônio classicamente relacionado com o metabolismo ósseo e homeostase mineral. Age principalmente aumentando a absorção intestinal de cálcio e fósforo¹⁶. Resumidamente, sob circunstâncias normais, vitamina D é principalmente obtida na pele através da ação da radiação ultravioleta (UVB) de baixo comprimento de onda (290–315 nm) sobre o substrato 7-deidrocolesterol, convertendo em pré-vitamina D. Através da ligação à proteína ligadora de vitamina D, pré-vitamina D chega ao fígado, onde ocorre a 25-hidroilação, resultando em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], o principal metabólito circulante. Posteriormente, 25(OH)D sofre a segunda hidroilação, principalmente nos rins, pela ação finamente controlada da enzima 1α -hidroxilase, gerando a forma ativa de vitamina D, 1,25 dihidroxivitamina D3 [1,25(OH)₂D₃] ou calcitriol¹⁷ (Figura 1).

Figura 1. Esquema simplificado do metabolismo da vitamina D. DBP, proteína ligadora de vitamina D; PTH, paratormônio; Ca^{2+} , íons cálcio. Fonte: <https://doctorlib.info/physiology/illustrated/32>, acesso em 09/2018.

Receptores de vitamina D estão presentes em vários tipos celulares mediando as diferentes ações da vitamina D nestes tecidos¹⁷. Sua interface com o sistema imune se dá tanto por influenciar a imunidade inata, quanto a adaptativa. Induz também a maturação e a atividade dos macrófagos e diminui a maturação de células dendríticas e, portanto, a

apresentação de antígenos às células T. Além disso, aumenta a produção de proteínas com ação antimicrobiana, como a catelicidina^{18, 23}.

Quanto à atuação na imunidade adaptativa, vários trabalhos mostraram que a vitamina D diminui a resposta imune via Th1 e Th17 e melhora a ação de linfócitos Treg^{18, 24, 26}. Van Hamburg e colaboradores³⁰ avaliaram o papel dos linfócitos Th17 na inflamação sinovial de pacientes com artrite reumatoide (AR). Os autores adicionaram vitamina D ativa em cultura de células sinoviais obtidas de pacientes com AR e demonstraram que sozinha ou após adição Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF- α), ocorria supressão de IL-17A e IL-22 e diminuição da inflamação.

Pelo exposto, é possível inferir que a vitamina D atua nos distúrbios imunológicos presentes no LES/NL. Daí o crescente interesse em esclarecer o papel da deficiência dessa vitamina como fator de risco para o desencadeamento da doença e/ou persistência ou piora da inflamação. Estudos tem demonstrado associação entre atividade da doença e deficiência de vitamina D, o que motiva a suplementação objetivando um estado de suficiência. Atualmente, considera-se como suficiente os níveis séricos maiores que 30ng/ml³¹. Abou-Raya e colaboradores³² avaliaram 267 pacientes com LES quanto ao *status* de vitamina D e atividade de doença. Os resultados mostraram 69% de insuficiência e 39% de deficiência e uma correlação indireta entre níveis de vitamina D e índice de atividade. Após 12 meses de suplementação (2000UI/dia), as pacientes melhoraram significativamente os marcadores inflamatórios e o índice de atividade quando comparadas ao grupo placebo.

1.3 Remodelação, atividade inflamatória e doença óssea

A remodelação óssea é um processo altamente complexo e dinâmico que, em um estado fisiológico, resulta do perfeito e coordenado equilíbrio entre reabsorção (realizada pelos osteoclastos) e formação (realizada pelos osteoblastos), disso resultando a integridade do esqueleto e a regulação do metabolismo mineral^{33, 34}. Os osteoblastos, além de formar osso, interagem com o sistema imune, recebendo e gerando mensagens via citocinas e moléculas de adesão, ativando osteoclastos e exercendo função de célula apresentadora de antígenos (APC)³⁵. A reabsorção óssea, por sua vez, é controlada por múltiplos fatores, entre eles os mediadores inflamatórios que podem estimular ou suprimir a reabsorção. As citocinas podem agir diretamente, influenciando a osteoclastogênese, aumentando a sobrevivência dessas

células, além de aumentar a atividade osteoblástica que também regula a diferenciação dos osteoclastos³⁶⁻³⁸.

Resumidamente, o ciclo de remodelação óssea ocorre em 5 estágios, partindo de uma fase de repouso até a mineralização da matriz óssea, numa interação coordenada entre células e citocinas (Figura 2). Quando dano ou estímulos bioquímicos ocorrem, osteócitos se comunicam com células de revestimento que estão na superfície do compartimento de remodelação óssea (CRO) a ser reparado, conhecidas como *lining cells*, as quais sofrem destacamento. Osteócitos então sofrem apoptose e liberam debris contendo moléculas de sinalização, levando à fase de reabsorção. Sob a ação de fatores osteoclastogênicos como RANKL (receptor ativador de NF- κ B ligante) e M-CSF (Fator estimulador de colônias de macrófagos), células tronco hematopoiéticas são recrutadas para áreas específicas da superfície óssea e se diferenciam em osteoclastos e iniciam a reabsorção óssea. Uma vez diferenciados e ativados, osteoclastos promovem desmineralização e degradação da matriz óssea, após a qual se destacam e sofrem apoptose, iniciando a chamada fase de reversão. Macrófagos diferenciados a partir de monócitos removem os debris remanescentes na superfície de reabsorção enquanto fatores de crescimento (como BMPs – proteínas morfogenéticas ósseas, TGF- β – fator de crescimento transformador beta, PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas) são liberados da matriz óssea e induzem à diferenciação de células tronco mesenquimais (MSC) em pré-osteoblastos, dando início à fase de formação óssea. Osteoblastos maduros secretam a matriz osteoide, que posteriormente sofre mineralização. Durante este processo, alguns osteoblastos podem ser incorporados à matriz óssea como novos osteócitos, enquanto alguns osteoblastos de superfície podem sofrer apoptose ou permanecer como *lining cells*^{33, 34}.

Figura 2. Representação esquemática do processo de remodelação óssea. Fase de Repouso (A): as *lining cells* (1) estão na superfície do compartimento de remodelação óssea. Após um dano (2), osteócitos sofrem apoptose (3), as *lining cells* se destacam da superfície (4) e a fase de reabsorção (B) começa. Monócitos migram dos vasos sanguíneos (5,6) para se diferenciarem em pré-osteoclastos. Após ativados, osteoclastos (7) promovem degradação da matriz óssea e sofrem apoptose (8) após finalizá-la, iniciando a fase de reversão (C). Macrófagos diferenciados de monócitos (9) removem os detritos da superfície de reabsorção, enquanto fatores de crescimento (BMPs, TGF-β, PDGF) são liberados da matriz (10) e induzem a diferenciação de MSCs (11) em pré-osteoblastos, que também liberam fatores de crescimento (BMPs) para sinalização autócrina e parácrina (12). No começo da fase de formação óssea (D), osteoblastos liberam matriz não mineralizada (osteóide) e, na sequência, osteoblastos são incorporados pela matriz como novos osteócitos (13). Nesse momento, alguns osteoblastos da superfície podem sofrer apoptose (14) ou permanecer como *lining cells* após a fase de mineralização (E). BMPs, proteínas morfogenéticas ósseas; TGF-β, fator de crescimento transformador beta; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; MSC, células tronco mesenquimais. Fonte: Matsumoto AM et al., Bone Tissue Healing Dynamics: From Damage to Reconstruction. Journal of Molecular Signaling Updates, 2016, 1, 33-40. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/305223133>. Acesso em 09/2018.

A osteoclastogênese é uma fase fundamental para que o osso a ser reparado seja removido, possibilitando a formação de novo tecido ósseo no local. Durante a diferenciação osteoclástica (Figura 3), o M-CSF induz os precursores a se diferenciarem em células que expressam receptores RANK (receptor ativador de NF-κB) e TREM2 (Triggering receptor expressed by myeloid cells-2). Através do estímulo de RANKL e ativação de ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), essas células se diferenciam em

osteoclastos mononucleares com indução NFATc1 (Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1) e expressam genes que codificam a TRAP (TNF-receptor associated protein), CtsK (cathepsin K) e $\alpha\text{v}\beta 3$. Os precursores se fusionam constituindo osteoclastos com capacidade de reabsorção óssea^{36, 37}.

Figura 3. Esquema das etapas da diferenciação osteoclástica, onde as substâncias indutoras estão ilustradas em vermelho e as supressoras em azul.

Fonte: Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: 234.

Nesse contexto, o sistema RANK-RANKL e Osteoprotegerina (OPG) (Figura 4), membros da família do receptor de TNF, tem importância fundamental na osteoclastogênese.

O RANKL é uma molécula que se liga ao receptor RANK promovendo diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos^{39, 40}. O RANKL se expressa principalmente nos osteoblastos, mas também é encontrado em células sinoviais, células T ativadas, linfócitos B maduros e células NK (*Natural Killer*), podendo ser detectado ancorado à membrana ou solúvel (sRANKL). A OPG é um receptor solúvel que funciona como inibidor fisiológico (*decoy receptor*) de RANKL, ligando-se a ele em competição com RANK, exercendo assim efeito supressor da osteoclastogênese. Nas doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide e LES/NL esse sistema tem sido bastante estudado^{14, 36, 37} e é um dos mecanismos que explicam a perda óssea nos pacientes acometidos.

Figura 4. Sistema RANK/RANKL/OPG: sistema imune induzindo osteoclastogênese. Células envolvidas na imunidade inata e adaptativa expressam RANKL, RANK ou OPG. RANKL é um mediador essencial da formação, função e sobrevivência dos osteoclastos e é produzido por células estromais da medula óssea, osteoblastos e também linfócitos T. RANKL age através da ligação com RANK que é expressado por monócitos e células dendríticas. OPG é expressado por osteoblastos maduros, linfócitos B e outros tipos celulares (não representados aqui) e inibe a osteoclastogênese mediada por RANKL. Adaptada de Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.

Nos pacientes com LES/NL ativo, já se demonstrou aumento de $\text{TNF-}\alpha$ e LDL oxidado, que por sua vez induzem ativação de células T, produção do RANKL, $\text{TNF-}\alpha$ e aumento da razão RANKL/OPG com consequente diferenciação osteoclástica. Vale lembrar que o LDL oxidado diminui a atividade osteoblástica e, consequentemente, a formação óssea^{14, 41}. De fato, Resende e colaboradores⁴² demonstraram menor expressão de OPG e maior expressão de RANKL no tecido ósseo de pacientes lúpicas quando comparadas aos controles, o que pode ter contribuído para o aumento da reabsorção óssea detectada na análise histomorfométrica de biópsias ósseas realizadas próximo ao diagnóstico de nefrite lúpica.

Recentemente, o papel da via Th17/IL-17 na perda óssea tem sido abordado em muitas pesquisas⁴³⁻⁴⁷ (Figura 5). IL-17 é produzida especialmente por linfócitos T CD4+ (*helper*) diferenciados em células Th17⁴⁸. A IL-17 está presente em diversos processos inflamatórios,

inclusive no osso, onde promove amplificação da produção de outras citocinas como IL-1 β e IL-6 pelas células mesenquimais e osteoblastos e está relacionada ao aumento da expressão de RANKL⁴⁹.

Figura 5. Esquema do envolvimento de IL-17 na indução da osteoclastogênese e reabsorção óssea. Linfócitos T podem sofrer diferenciação em Th17 e produzirem IL-17, a qual aumenta expressão de RANKL e induz produção de citocinas inflamatórias por células mesenquimais e osteoblastos, amplificando a inflamação, a diferenciação e ativação osteoclásticas, levando a reabsorção óssea aumentada. Fonte: Joller N, Kuchroo VK. Good guys gone bad: exTreg cells promote autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014; 20: 15-17.

Komatsu et al⁴³ identificou um subgrupo de linfócitos Treg CD25^{low}Foxp3⁺ em pacientes com artrite autoimune que perdeu a proteína Foxp3⁺ (forkhead box P3) em resposta à IL-6 produzida por fibroblastos sinoviais, transformando-se em linfócitos Th17, que por sua vez secretam IL-17 e induzem mais secreção de IL-6, além de produzirem grande quantidade de RANKL, com indução direta de osteoclastogênese e destruição óssea contínua.

Eskan e colaboradores⁴⁵, estudando a reabsorção óssea na periodontite, observaram diminuição da expressão de Del-1, um endógeno inibidor de LFA-1, uma integrina necessária à adesão de neutrófilos, concomitante com um aumento da expressão de IL-17, que por sua

vez inibiu a expressão endotelial de Del-1 e aumentou o recrutamento de LFA-1, favorecendo à adesão e invasão de neutrófilos, maior inflamação e perda óssea.

Ainda na tentativa de avançar no entendimento do processo de indução de reabsorção óssea por IL-17, Kikuta et al⁴⁶, em um elegante trabalho, estudaram *in vivo* a mobilidade de osteoclastos em tecido ósseo de camundongos e identificaram duas populações de células com diferentes padrões de mobilidade e função: uma estática e reabsortiva (R) e outra em movimento e não-reabsortiva (N). Após a administração de RANKL houve mudança no padrão de osteoclastos N em R. No mesmo estudo, avaliaram também a relação de células CD4⁺ Th17 que expressam RANKL e perceberam que os linfócitos Th17 eram capazes de estabelecer contato célula-célula com os osteoclastos, promovendo mudança do perfil N para R. Esses resultados contribuíram para esclarecer o papel das células Th17 RANKL⁺ na destruição óssea mediada pela inflamação.

A participação das células Th17 e de IL-17 também vêm sendo determinada na perda óssea por deficiência estrogênica na pós-menopausa. Tyagi et al⁴⁷ estudaram o efeito do estrógeno sobre a osteoclastogênese induzida por IL-17 e sobre a diferenciação de células Th17 e suas controladoras, as células T regulatórias Treg, em culturas de células de medula óssea de murinos. Os resultados indicaram que a deficiência de estrógeno aumenta a diferenciação de Th17 e suprime a das células Treg Foxp3⁺ que antagonizam a diferenciação de Th17. IL-17, por sua vez, estimulou a diferenciação osteoclástica, inibiu a mineralização pelos osteoblastos, sendo esses efeitos suprimidos pelo estrógeno.

A participação da vitamina D na atividade dos osteoblastos e seu controle na osteoclastogênese têm sido fonte de investigação. A ingestão reduzida de cálcio e de vitamina D aumentam a osteoclastogênese e a reabsorção óssea, em parte, por estimular a expressão de RANKL pelos osteoblastos. Por outro lado, em condições de normocalcemia, a vitamina D também modula a diferenciação de osteoblastos e a mineralização. Sutton et al⁵⁰, estudando a ação da vitamina D sobre diferentes linhagens osteoblásticas (MG-63, ST-2, MC3T3 e osteoblastos de camundongos), demonstraram que o gene da semaforina 3B (SEMA3B) é um dos alvos da vitamina D. Camundongos transgênicos para o gene SEMA3B apresentam menor peso, menor comprimento de tíbias, menor densidade mineral óssea e estrutura trabecular alterada, indicando aumento da reabsorção. As semaforinas fazem parte das glicoproteínas identificadas originalmente como proteínas axonais e que posteriormente foram

associadas à regulação da migração, crescimento e diferenciação celular e angiogênese em vários tecidos.

Ainda com o objetivo de tentar identificar genes e vias de sinalização que possam ser modulados pela vitamina D, Tarroni et al⁵¹, determinaram através de análise de *microarray*, confirmados por qRT-PCR (reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa em tempo real), séries de genes que são estimulados e que são inibidos pelo acréscimo de 1,25(OH)₂D₃ a culturas da linhagem de células osteoblásticas humanas hFOB 1.19. Destacam-se o efeito estimulatório sobre o gene CYP24A1, cuja enzima codificada está envolvida na degradação da própria vitamina D e o gene que codifica a molécula CD14, que pode funcionar como um co-receptor de membrana para LPS (lipopolissacarídeo) em conjunto com o complexo de membrana do TLR4 (Toll Like Receptor), estimulando a resposta imune. CD14 é identificada ainda em sua fase solúvel, que pode ser considerada proteína de fase aguda e tem sido encontrada em níveis elevados no sangue de pacientes com estados inflamatórios como AR e LES⁵¹⁻⁵³.

Dentro do complexo contexto da regulação da massa óssea na saúde e doença, tem-se ainda que destacar o papel da via de sinalização intracelular Wnt/ β -Catenina (Figura 6). As proteínas Wnt são uma família de proteínas secretadas que regulam vários aspectos do metabolismo celular como crescimento, diferenciação, função e morte em vários tecidos, incluindo o tecido ósseo^{54, 55}. Apesar da importante participação da sinalização via proteínas Wnt na modelação óssea durante o desenvolvimento, despertam atenção especial as ações da via canônica Wnt/ β -Catenina no processo contínuo de remodelação óssea, principalmente pela possibilidade de intervenção terapêutica nesta via em doenças sistêmicas com conhecido acometimento ósseo, como doenças inflamatórias e osteoporose.

A)

B)

Figura 6. A) Elementos da via de sinalização Wnt/ β -catenina. No estado “ligado”, a ligação de uma proteína Wnt ao receptor frizzled e co-receptores LRP 5/6 desencadeiam cascata de sinalização que resulta na desfosforilação de β -catenina, tornando-a ativa. Esta então é capaz de migrar para o núcleo e se ligar a fatores de transcrição e induzir ou suprimir genes de interesse. Antagonistas da via Wnt, como DKK-1 e SOST podem estimular a fosforilação de β -catenina, causando sua degradação. **B)** A via Wnt/ β -catenina regula a osteogênese por vários mecanismos. Proteínas Wnt podem suprimir a diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e condrócitos, por exemplo, promovendo proliferação e diferenciação osteoblástica e mineralização, além de bloquear a apoptose de osteoblastos. β -catenina pode inibir osteoclastogênese por aumentar a razão entre OPG/RANKL. Dlx5, distal-less homeobox 5; MSC, mesenchymal stem cell; Msx2, msh homeobox homolog 2; Osx, osterix; Runx2, runt-related transcription factor 2. Adaptada de Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling.

Resumidamente, a ativação da via Wnt/ β -catenina ocorre através da ligação de Wnt ao receptor transmembrana com 7 domínios chamado Frizzled (Fz) e aos co-receptores conhecidos como proteínas relacionadas a lipoproteínas de baixa densidade subtipos 5 e 6 (LRP 5/6). Sinais são gerados através das proteínas Disheveled, Axin e Frat-1, que fragmentam o complexo proteico e inibem a atividade da enzima GSK3, causando hipofosforilação da β -catenina. A β -catenina estabilizada (hipofosforilada, desfosforilada ou ativa) acumula-se no citosol e migra para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição (TCF/LEF) para mediar muitos dos efeitos de Wnt sobre a transcrição gênica, favorecendo, entre outras ações, a proliferação, diferenciação, apoptose de osteoblastos e mineralização. Por outro lado, existem vários antagonistas que exercem controle estrito sobre esta via de sinalização celular como, por exemplo, a esclerostina (produto do gene SOST) e Dickkopf-1 (DKK-1), que podem se ligar aos co-receptores LRP 5/6, impedir a ligação de Wnt e ainda não inibir a ação de GSK3, provocando fosforilação e inativação de β -catenina⁵⁴⁻⁵⁷.

Alguns estudos têm reportado a ação da vitamina D sobre a via Wnt/ β -catenina. Em células de câncer de cólon, por exemplo, foi demonstrado que a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promove a redução do complexo de transcrição β -catenina/TCF, a indução de relocação de β -catenina de volta às junções de membrana plasmática e o aumento no nível do inibidor DKK-1, combatendo a progressão das células tumorais^{58, 59}. Embora a vitamina D pareça inibir as ações transcricionais efetoras de β -catenina em muitos tipos de câncer, a mesma parece estimular a via Wnt/ β -catenina nos osteoblastos, talvez através da ativação de VDR e/ou por meio de algumas citocinas, promovendo formação óssea^{54, 59}.

A possível associação da via Wnt/ β -catenina com a perda óssea presente em doenças inflamatórias crônicas como AR e LES/NL tem sido fonte de pesquisas. Brabnikova-Maresova e colaboradores⁵⁶, estudando 31 pacientes com artrite idiopática juvenil ativa, demonstraram níveis basais de esclerostina significativamente maiores nos pacientes com artrite juvenil do que nos controles saudáveis e ainda uma queda nos níveis de esclerostina, seguida de diminuição dos índices de atividade de doença, após terapia com inibidores de TNF- α .

Continuando nesta linha, Long e colaboradores⁵⁷ avaliaram o potencial papel dos níveis séricos do inibidor DKK-1 circulante em avaliar artrite erosiva em LES. Concluíram que níveis elevados de DKK-1 séricos estão associados com erosão óssea em pacientes com

LES. Mas, por outro lado, nenhuma mudança significativa foi encontrada nos níveis de OPG nesses pacientes.

Estudando agora pacientes com NL, Wang et al⁶⁰ avaliou a presença de componentes da via Wnt/ β -catenina no tecido renal oriundo de espécimes de biópsias, além de dosar níveis séricos de DKK-1. Os autores demonstraram elevada expressão de β -catenina nos rins de pacientes com NL, acompanhada de aumento no seu mRNA e dos níveis séricos de DKK-1.

Quanto à doença óssea em pacientes com LES/NL, sabidamente multifatorial, conforme mencionado previamente, tem despertado grande interesse a precocidade do início das alterações celulares/teciduais em relação ao início do quadro clínico e diagnóstico sistêmico/renal^{42, 61, 62}.

Nesse sentido, Resende et al⁴², estudando pacientes com NL recentemente diagnosticada através de biópsia óssea, concluíram que as pacientes com NL apresentavam distúrbios do metabolismo ósseo caracterizado por diminuição na formação e mineralização associados a aumento dos parâmetros de reabsorção óssea, havendo correlação positiva entre tais distúrbios e marcadores séricos e urinários de inflamação, bem como destes com baixa 25(OH)D sérica.

1.4 Células osteoblásticas fetais humanas hFOB 1.19

Os processos de formação e remodelamento ósseos envolvem a ação coordenada de diferentes tipos celulares, principalmente de osteoblastos e osteoclastos³³. Nas últimas décadas, muitos avanços ocorreram no entendimento desses processos, tanto em condições saudáveis, quanto patológicas. Para tanto, os modelos científicos utilizados para os diferentes estudos tiveram importância capital.

Muitos modelos de cultura de células osteoblásticas têm sido criados, testados e confirmados como viáveis para a realização de pesquisas sobre o comportamento do tecido ósseo humano. Dentre os mais comumente empregados, estão os osteoblastos primários humanos extraídos de ossos adultos, osteoblastos fetais humanos imortalizados, osteoblastos extraídos da calvária de roedores e osteoblastos oriundos de diversas linhagens de osteossarcoma⁶³. Recentemente, com o objetivo de revisar e determinar vantagens e desvantagens desses tipos celulares, Czekanska et al⁶³, destaca que a escolha do modelo

experimental de osteoblastos é crucial para o sucesso da pesquisa e deve ser feita de acordo com o que se pretende estudar e com as questões a serem respondidas.

Em 1995, Harris e colaboradores⁶⁴ desenvolveram e inicialmente caracterizaram uma nova linhagem celular, obtida a partir de amostras de tecido ósseo fetal de um aborto espontâneo, que foram transfectadas com um gene que codifica um grande antígeno T temperatura sensível de SV40 juntamente com um gene que confere resistência à neomicina (G418). O clone de células com o mais elevado nível de produção de fosfatase alcalina foi isolado e chamado hFOB 1.19.

Durante os seguintes experimentos para avaliar proliferação e diferenciação, os autores comprovaram tratar-se de uma linhagem imortalizada, com comportamento diferenciado nas chamadas temperaturas permissiva (33,5⁰C), na qual as células sofrem rápido processo de divisão celular, e restritiva (39,5⁰C), na qual praticamente não ocorre divisão celular e as células se diferenciam, exibindo marcadores e processos biológicos semelhantes aos osteoblastos adultos humanos. Quando submetidas a doses crescentes de 1,25(OH)₂D₃, as células em cultura responderam com aumento na secreção de osteocalcina e atividade de fosfatase alcalina em ambas temperaturas, porém de maneira mais significativa na temperatura restritiva. Adicionalmente, quando foram tratadas com PTH, detectou-se elevação nos níveis de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) celular o que, em conjunto com a resposta à vitamina D, sugeriu que hFOB 1.19 contém receptores funcionais para vitamina D e PTH. Além disso, as culturas pós-confluentes de osteoblastos também foram capazes de expressar osteonectina, sialoproteínas, colágeno tipo I e formar matrix mineralizada.

Para avaliar possíveis alterações cariotípicas da linhagem hFOB 1.19, Subramaniam et al⁶⁵ realizaram estudos de hibridização multicolorida fluorescente *in situ* que revelaram poucas alterações estruturais e numéricas nos cromossomos 1-2, contrastando com as linhagens de osteossarcoma que geralmente apresentam muitas anormalidades complexas, numéricas e estruturais.

Mais recentemente, sob a luz da osteoimunologia, Stanley et al³⁵ estudaram a interação bidirecional entre algumas linhagens osteoblásticas, entre elas hFOB 1.19, e leucócitos T. Detectaram que a linhagem transfectada hFOB apresentava, tanto constitutivamente quanto estimulada por IFN- γ (interferon gama), as moléculas CD166 (ALCAM) e 3A11, ambas possíveis ligantes de CD6 expressado por leucócitos, com papel na adesão e ativação de

células T. Além disso, apresentavam CD54 (ICAM-1) e MHC-II (complexo principal de histocompatibilidade classe II) na presença de IFN- γ .

Através dos experimentos de interação celular, os pesquisadores detectaram que células hFOB produziram IL-6 em resposta ao tratamento com IL-17. Por incorporação de timidina, avaliaram a proliferação de células T após cultura simultânea com osteoblastos e na presença de superantígeno ou lectina, percebendo que esta linhagem osteoblástica era capaz de apresentar antígenos e aumentar a proliferação dos linfócitos T. Tais resultados sugerem que essa interação osteoblastos/linfócitos possa exercer importante papel na reabsorção óssea que ocorre em condições patológicas, em especial autoimunes, como AR e LES por exemplo.

Em adição ao fato de hFOB 1.19 constituir um bom modelo experimental para o estudo do tecido ósseo humano em vários estágios, Yen et al⁶⁶ demonstraram que esta linhagem possui muitos marcadores de superfície celular similares às células estromais mesenquimais da medula óssea humana (BM-MSC) e que também expressam o gene oct-4 que confere pluripotência, assim como o marcador progenitor neuronal nestina, podendo se diferenciar, sob condições adequadas, em condrócitos e adipócitos e até mesmo em um tipo celular semelhante aos neurônios. Dessa forma, os autores concluem que hFOB 1.19 constitui também um facilmente disponível, consistente e homogêneo modelo experimental *in vitro* para o estudo de células progenitoras mesenquimais humanas.

Portanto, devido à sua boa capacidade de multiplicação sem grandes alterações cariotípicas, à sua grande semelhança aos osteoblastos humanos, seja em termos de expressão molecular ou em resposta a hormônios, e à sua capacidade de interagir com o sistema imune, nós escolhemos a linhagem hFOB 1.19 como modelo experimental *in vitro* para o desenvolvimento de nosso estudo.

2. RACIONAL

2. RACIONAL

Considerando que a saúde óssea, no contexto de LES/NL de início recente, sem outros fatores perturbadores, resultaria da combinação do equilíbrio entre atividade osteoblástica e osteoclástica no contexto de atividade inflamatória e níveis de vitamina D adequados, um elevado estado inflamatório, com alto nível de citocinas circulantes, estaria associado tanto com uma predominância da reabsorção sobre a formação óssea, quanto com diminuição nos níveis de vitamina D séricos, resultando em um círculo vicioso, o que agravaria a perda óssea^{41, 42} (Figura 7). Frente à fisiopatologia de LES/NL, às propriedades da vitamina D e os dados disponíveis de literatura mencionados previamente, nós hipotetizamos que a perda óssea precoce na população do estudo possa ser secundária principalmente à inflamação e que a suplementação de vitamina D possa modificar o padrão de resposta de osteoblastos imortalizados em cultura por diminuir inflamação. Para isso, estudamos *in vitro* células osteoblásticas hFOB 1.19, cultivadas com soro de pacientes com NL de início recente e função renal preservada e, portanto, com esperados elevados níveis de citocinas inflamatórias circulantes, com e sem adição de vitamina D. Para avaliarmos e associarmos uma possível melhor resposta osteoblástica às ações da vitamina D e à diminuição da inflamação, usamos culturas controles de osteoblastos, cultivadas em meio enriquecido com soro de mulheres saudáveis.

Figura 7. Esquema ilustrando a saúde óssea com resultante do equilíbrio entre formação e absorção óssea, num contexto de baixa atividade inflamatória e estado de suficiência de vitamina D. Fonte: feita pela autora, baseada em: Alele JD, Kamen DL. The importance of inflammation and vitamin D status in SLE-associated osteoporosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 137-139.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito *in vitro* do soro de pacientes com nefrite lúpica ativa de diagnóstico recente sobre uma linhagem de células osteoblástica humana, com ênfase em algumas vias de sinalização (RANKL/OPG, Wnt/ β -catenina e Th17/IL-17) possivelmente envolvidas na osteoclastogênese anormal detectada nesta mesma população, assim como avaliar a ação da vitamina D nesse cenário e sua correlação com fatores inflamatórios.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Pacientes e controles

Utilizamos amostras de soro de pacientes com NL ativa, com diagnóstico recente (inferior a 2 meses), com função renal preservada (Taxa de filtração glomerular – TFG estimada $> 30\text{ml/min/1,73m}^2$), em idade fértil, baixa ou nenhuma exposição a corticoides, coletados por Resende AL⁴² em protocolo de estudo prévio de nosso grupo conforme entrada das pacientes no ambulatório, armazenados em freezer -80°C em soroteca no Laboratório de Investigação Médica – LIM16 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Tais pacientes são/foram acompanhadas no Ambulatório de Glomerulopatias da FMUSP, recebendo tratamento pela equipe médica assistente conforme protocolos médicos vigentes para o tratamento de NL. Utilizamos como controles mulheres em menacme, saudáveis, sem suplementação de vitamina D ou cálcio ou drogas que sabidamente influenciam o metabolismo ósseo, cuja amostras foram coletadas sequencialmente ao longo dos meses do ano para simular a coleta das pacientes. Os critérios de inclusão e exclusão das pacientes estão detalhados abaixo

4.2 Critérios de inclusão de pacientes

- Diagnóstico recente de LES (há menos de 2 meses) com atividade renal e diagnóstico de Nefrite Lúpica de acordo com os critérios do American College of Rheumatology – ACR, disponível em: <https://www.rheumatology.org> , acesso em 09/2014;
 - A biópsia renal foi indicada pela Equipe Clínica da Nefrologia e não por este protocolo. Foi realizada em todas as pacientes utilizando-se a classificação anátomo-patológica vigente: WHO/ ISN/RPS⁴);
- Sexo feminino;
- Menacme (período compreendido entre a menarca e a menopausa);
- Taxa de filtração glomerular - TFG (estimada pelo pela fórmula MDRD simplificada, Modification of Diet in Renal Disease⁶⁷) $> 30\text{ ml/min/1,73m}^2$;

- Dose cumulativa total de prednisona < 10.000 mg (ou equivalente, diante do uso de outros glicocorticoides).

4.3 Critérios de exclusão

- Gestação;
- Uso de medicações que influenciam o metabolismo ósseo (como anticoagulantes orais e anticonvulsivantes);
- Uso prévio de suplementação de cálcio ou vitamina D;
- Portadores de doença tireoidiana.

4.4 Análises bioquímicas

As mensurações séricas de: iPTH (paratormônio intacto) foram realizadas por método imunoquimioluminométrico (valor de referência: 15-65 pg/ml); de 25(OH)D por eletroquimioluminescência (valor de referência: 30-100 ng/ml); cálcio iônico (Cai) (valor de referência: 4-5 mg/dl) e fósforo (valor de referência: 2,7-4,5 mg/dl) por método calorimétrico automatizado; fosfatase alcalina (valor de referência: 35-104 U/L) medida por método cinético automatizado; creatinina (valor de referência: 0,7-1,2 mg/dl) dosada por método colorimétrico cinético; hemogramas foram realizados por método automatizado de contagem de rotina. Níveis séricos de RANKL, OPG, DKK-1, SOST e das interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- α foram dosados através de kits Milliplex® MAP (multi-analyte panels – Human Bone Magnetic Bead Panels - HRNKL MAG-51K-01 RANKL; HBNMAG-51K-06 IL-1b, IL-6, TNF- α , OPG, SOST, e Dkk1; HTH17MAG-14K-05 IL17A, IL-17F, IL-2, IL-21 e IL-22, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha), baseado na tecnologia Luminex™ xMAP, de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Cultura de células

Células de linhagem osteoblástica fetal humana imortalizadas, hFOB 1.19 (ATCC, Manassas, VA), foram inicialmente semeadas em garrafas de cultura de 75cm³, permanecendo em estufa com CO₂ 5% e à temperatura permissiva de 33,5°C para proliferarem. O meio de cultura, uma mistura 1:1 do meio Ham's F12/Dulbecco's Modified

Eagle's (Invitrogen, Carlsbad, CA) com 2,5mM de L-glutamina (sem fenol) mais 0,3 mg/ml de G418 (Gibco Laboratories, Gaithersburg, MD) e soro fetal bovino (SFB) 10% (Gibco, Invitrogen. <http://www.invitrogen.com/gibco>), foi trocado a cada 2 dias em média. Quando as células atingiram confluência de aproximadamente 80%, foram dissociadas com tripsina recombinante TrypLE™ Express (Gibco, USA) e ressemeadas em garrafas de 25cm³ (0,1x10⁶ células/ml) (6 dias, em média) para fornecer material para citometria de fluxo, multiplex, RT-PCR e montadas placas de 24 *wells* para avaliação de proliferação celular. Após mais 5 dias proliferando em temperatura permissiva, as culturas celulares em garrafas de 25cm³ foram transferidas para estufa à temperatura restritiva de 39,5°C e à CO₂ 5% para limitar proliferação e estimular diferenciação celular, enquanto que as placas de proliferação de 24 *wells* permaneceram à 33,5°C. Após 24h, os respectivos estímulos foram adicionados, sendo o meio de cultura enriquecido como soro de pacientes ou controles a 10% em substituição ao SFB (soro, soro + vitD 10⁻⁹ M e soro + vitD 10⁻⁷ M) permanecendo por 48h. Nas últimas 12h do período de estímulo, as placas de proliferação foram submetidas à privação *overnight* com soro a 1% (controle ou paciente). Nesse momento, as culturas de osteoblastos das garrafas de 25cm³ foram tripsinizadas para extração de material direcionado à citometria de fluxo, extração de RNA, extração de proteínas para mensuração pela técnica de *Milliplex*. Foi coletado sobrenadante de cultura nos tempos D0, D1 e D2 do estímulo e congelados a -20°C para análise posterior.

4.6 Incorporação de timidina

As células hFOB 1.19 foram semeadas em placas de 24 *wells* (1,8x10⁴ células por *well*). Os experimentos foram realizados em triplicata. Após 36h de estímulo (soro, soro + vitD 10⁻⁹ M e soro + vitD 10⁻⁷ M), as células foram submetidas à privação *overnight* com apenas 1% do soro (paciente ou controle). Finalizado o período de estímulo de 48h, acrescentamos ³H-Timidina (Amersham Pharmacia Biotech Brasil Ltda, SP, Brasil) em meio de cultura suplementado com o respectivo soro a 10%, concentração final de 5μCi/mL, durante 2 horas. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado (1 mL) e duas vezes com 1 mL de ácido tricloracético – TCA 5%. As células foram ressuspensas com 300 μL de NaOH 0.2N/Sarcosil 0,3% (n-lauroylsarcosine Na salt) e 60 μL desse homogenato foram adicionados a 3 mL de líquido de cintilação (com ácido acético glacial: 1,2 μL/3 mL). Os frascos foram agitados no vortex, protegidos da luz por duas horas e em seguida

analisados em contador de cintilação beta Beckman modelo LS6200 (Beckman Instruments, Palo Alto, USA). A contagem do controle foi realizada em 60 µL de NaOH 0.2N/Sarcosil 3%. Os valores desse controle foram descontados daqueles obtidos das células. Os resultados foram expressos como contagem por minuto (cpm/µg de proteína).

4.7 Citometria de fluxo

As células hFOB 1.19 foram contadas em câmaras de Neubauer (ou hemocitômetro) e colocadas na proporção de aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células por tubo.

4.7.1 Marcação de proteínas de membrana

Os seguintes anticorpos conjugados com fluorocromos e respectivas concentrações foram usados para marcação de proteínas de membrana:

- Mouse anti-human Alkaline Phosphatase – Alexa Fluor 647, 5µl/teste (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA);
- anti-human CD54 – PE-Cy 5, 10µl/teste (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA);
- Mouse anti-human CD166 – PE, 20µl/teste (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA);
- anti-human CD284 – APC, 5µl/teste (Affymetrix eBioscience, Santa Clara, Califórnia, EUA)
- Mouse anti-human CD14 – PerCP-Cy 5.5, 1,25µl/teste (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA)

Cada tubo com $1,0 \times 10^6$ cél/tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min a 4°C. Em seguida, realizadas 2 lavagens com 500 µl de tampão de lavagem e ressuspensas as células. Acrescentada a quantidade acima mencionada de cada anticorpo, com incubação por 30min a 4°C. Depois da incubação, realizadas 2 lavagens com 500 µl de tampão de lavagem, centrifugados a 1200 rpm por 5 min a 4°C, aspirado o sobrenadante de cada tubo, quebrado o *pellet* de células e fixado o material de cada tubo com 250 µl PAFA (paraformaldeído) 1%.

As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho *FacsCanto* (Becton Dickinson, San Jose, EUA). Os dados foram analisados com o *software FlowJo* (LLC, USA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 20.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

4.7.2 Marcação de proteínas intracelulares

Os seguintes anticorpos com suas respectivas concentrações foram usados para marcação de proteínas intracelulares:

- Mouse anti-NF- κ B p65 (pS529) – PE, 20 μ l/teste (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA)
- Anti-Active- β -catenin (anti-ABC), clone 8E7, 1 μ l/ml (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)

Como anticorpo secundário, conjugado com fluorocromo, para uso com anticorpo anti- β -catenina ativa, usamos:

- F (ab')₂-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, FITC, 5 μ l/ml (ThermoFisher, Rockford, IL, USA).

Cada tubo com 1,0 x 10⁶ cél/tubo foi fixado por 10min com 500 μ l de PAFA 1%, homogeneizado em *vortex*, realizadas 2 lavagens com 500 μ l de DPBS, centrifugados a 200xg por 7 min a 4°C, aspirado o sobrenadante de cada tubo, quebrado o *pellet* de células. Posteriormente, realizada a ressuspensão das células com 2ml de tampão SAP, centrifugados a 200xg por 7 min a 4°C, decantado o sobrenadante, deixando 100 μ l do tampão SAP em cada tubo. Adicionados os anticorpos em cada tubo na quantidade mencionada acima, homogeneizado e incubados os tubos por 45min, em temperatura ambiente e protegido da luz. Realizadas 2 lavagens com 2ml de tampão SAP, centrifugando 200xg por 7 min a 4°C. Acrescentado o anticorpo secundário, seguido de nova incubação por 30min no escuro. Realizadas 2 lavagens com 2ml de tampão SAP, aspirado o sobrenadante de cada tubo e ressuspensas as células em 500 μ l de PBS. Realizada leitura no citômetro de fluxo, conforme descrição acima.

4.8 qRT-PCR

O meio de cultura foi removido da placa de cultura e adicionado 1mL de TRIzol Reagent diretamente em cada poço onde continham as células na placa de cultura. Essas células foram lisadas através do movimento de up and down com a pipeta automática em cada um dos poços e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a completa dissociação do complexo nucleoproteico. Em seguida, o lisato de células foi transferido para tubo onde foram adicionados 200 µL de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta mistura foi homogeneizada no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 2 minutos e a seguir foi centrifugada por 15 minutos, a 4°C e 12.000x g. A fase incolor foi transferida para outro tubo ao qual foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos, a 4°C e 12.000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1 mL de etanol 75 % gelado. Novamente o *pellet* foi centrifugado (12.000 x g, 5 minutos, 4°C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuscitado com 50 µL de água MilliQ e esta suspensão de RNA total foi incubada em banho seco a 60° C por 10 minutos. As amostras de RNA total foram armazenadas em freezer – 80°C.

Após a quantificação do RNA total utilizando o Nanodrop, foram sintetizados os cDNAs através do kit ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA).

A expressão gênica foi determinada por meio de PCR quantitativo a partir do cDNA utilizando o método de SYBR Green (Rotor Gene SYBR Green PCR kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) e o termociclador Rotor-Gene Q, (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os genes analisados foram SOST (ACC# AF_331844.1), RANKL (ACC # NM_003701.3), OPG (ACC# U94332), beta-catenina (ACC# X_87838.1), e o gene normalizador GAPDH (Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - ACC# NM_002046.4) através dos seus respectivos primers (tabela), os quais foram desenhados pelo programa da IDT (Integrated DNA Technologies). A análise dos resultados foi realizada de forma relativa, com a comparação entre dois grupos, controle e experimental. Os resultados da expressão gênica foram analisados pelo programa REST 2009 (Relative Expression Software Tool).

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanhos dos amplicons dos genes SOST, β -catenina, OPG, RANKL e GAPDH

Gene	Sequência 5' - 3'	Tamanho do amplicon
SOST (sense)	GGGCAACTGTAGATGTGGTT	84
SOST (antisense)	GTCCCGAAGGAGAATTGTGTAG	
Beta-Catenina (sense)	CTTCACCTGACAGATCCAAGTC	98
Beta-Catenina (antisense)	CCTTCCATCCCTTCCTGTTTAG	
OPG (sense)	GATGTCCAGATGGGTCTTCTC	95
OPG (antisense)	CTGAGTTAGCAGGAGACCAAAG	
RANKL (sense)	CCAAGTTCTCATACCCTGATG	118
RANKL (antisense)	TTCCTCTCCAGACCGTAACT	
GAPDH (sense)	CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG	102
GAPDH (antisense)	CTACATGGCAACTGTGAGGAG	

SOST, esclerostina; OPG, osteoprotegerina; RANKL, receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante; GAPDH Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

4.9 Técnica de avaliação do conteúdo proteico - multiplex

Nos lisatos proteicos, obtidos a partir da tripsinização e processamento das células hFOB1.19 em cultura conforme descrito previamente, foram quantificadas a expressão das proteínas RANKL, OPG, DKK-1, SOST e das interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- α através de kits Milliplex® MAP (multi-analyte panels – Human Bone Magnetic Bead Panels - HRNKL MAG-51K-01 RANKL; HBNMAG-51K-06 IL-1b, IL-6, TNF- α , OPG, SOST, e Dkk1; HTH17MAG-14K-05 IL17A, IL-17F, IL-2, IL-21 e IL-22, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha), baseado na tecnologia Luminex™ xMAP, de acordo com as instruções do fabricante. O princípio dessa tecnologia utiliza microesferas conjugadas com anticorpos específicos e impregnadas com dois diferentes tipos de corantes fluorescentes que permite a obtenção de diferentes tipos de combinação de cores. Uma vez adicionadas as amostras de interesse na reação, os anticorpos específicos ligam-se a seus respectivos antígenos, permitindo a detecção dos diferentes antígenos ao mesmo tempo, dependendo da composição de cada kit. Em seguida, anticorpos específicos conjugados com biotina são adicionados à reação, os quais também irão capturar seus respectivos antígenos de interesse, formando um sistema de captura chamado “captura sanduíche” (anticorpo-antígeno-anticorpo). Após essa etapa, adiciona-se estreptavidina conjugada com ficoeritrina (PE) que

irá ligar-se ao anticorpo conjugado biotina. Após a formação desse imuno-complexo, a leitura da reação é feita num sistema de detecção das microesferas (Luminex 200TM, Luminex Inc., Austin, EUA), identificando o anticorpo-antígeno a ela associado e a magnitude do sinal obtido pela estreptavidina – PE, que é diretamente proporcional à quantidade dos antígenos de interesse detectados.

4.10 Análise estatística

Os dados descritivos foram expressos como médias e desvios-padrão ou medianas e quartis 25-75%, para variáveis com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. A normalidade das distribuições foi determinada pelo teste de D’Agostino-Pearson.

Para comparação das médias das variáveis contínuas entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Enquanto que o teste de Mann-Whitney foi usado para determinar a significância entre variáveis não paramétricas. Para análise intergrupos de 3 subgrupos, utilizamos a análise de variância (ANOVA).

Foram utilizados o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a associação entre variáveis contínuas.

Os seguintes *softwares* foram utilizados para realização das análises estatísticas: SPSS *for Windows* 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA), Prism 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, USA) e REST 2009 2.0.13 (QIAGEN GmbH, Munich, Germany).

A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4.11 Resumo do protocolo do estudo

A figura 8 resume a linha do tempo do protocolo deste estudo. Os grupos para análise de material celular proveniente de culturas de hFOB 1.19 resumem-se em 6 (n=15 para cada grupo): 1) hFOB 1.19 + soro NL, 2) hFOB 1.19 + soro NL + vitD 10^{-9} M, 3) hFOB 1.19 + soro NL + vitD 10^{-7} M, 4) hFOB 1.19 + soro CS, 5) hFOB 1.19 + soro CS + vitD 10^{-9} M e 6) hFOB 1.19 + soro CS + vitD 10^{-7} M.

Figura 8. Ilustração do protocolo do estudo. A) Linha do tempo, onde segunda fase corresponde ao estudo atual; B) 6 grupos de análise para material celular de hFOB 1.19 de acordo com o estímulo adicionado ao meio de cultura. NL, nefrite lúpica; CS, controles saudáveis; vitD, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; n=15 para cada grupo.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análises bioquímicas

A Tabela 2 sumariza os dados clínicos e laboratoriais de pacientes e controles. As pacientes com NL apresentaram idade média de $30,28 \pm 9,96$ anos, proteinúria média de 24h de $4,96 \pm 2,84$ g/dia e eTFG de $63,13 \pm 40,79$ ml/min/1,73m². As biópsias renais, classificadas de acordo com a *International Society of Nephrology (ISN)/Renal Pathology Society (RPS)*⁴, apresentaram a seguinte distribuição: 13 proliferativas (classes III + IV), 1 classe II e 1 classe V. Não houve diferença entre pacientes e controles com relação à idade, índice de massa corporal (IMC), fosfatase alcalina (FA) e PTH intacto (iPTH).

Através de técnica de multiplex testamos os níveis séricos de IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , IL-17A, IL17F, IL-21, IL-22, DKK-1, OPG e RANKL. Os dados mostraram níveis séricos significativamente maiores de IL-2 ($3,36 \pm 3,06 \times 1,54 \pm 0,9$ pg/ml, $p=0,0353$), IL-6 ($15,58 \pm 39,08 \times 8,02 \pm 3,49$ pg/ml, $p=0,0053$), TNF- α ($9,63 \pm 14,49 \times 1,27 \pm 0,35$ pg/ml, $p=0,0337$), DKK-1 ($2802,04 \pm 1380,06 \times 696,3 \pm 421,22$ pg/ml, $p<0,001$) e OPG ($560,12 \pm 333,56 \times 340,24 \pm 102,08$ pg/ml, $p=0,0212$) nas pacientes lúpicas do que nos controles saudáveis (Tabela 3, Figura 9).

Proteinúria se correlacionou positivamente com níveis séricos de IL-17A ($r=0,623$, $p=0,013$) e SLEDAI ($r=0,60$, $p=0,0223$) e negativamente com albumina sérica ($r=-0,61$, $p=0,016$). Entretanto, não houve correlação entre proteinúria e eTFG, 25(OH)D ou OPG séricos. Os níveis séricos de SOST se correlacionaram positivamente com OPG ($r=0,56$, $p=0,018$), enquanto TNF- α e IL-6 séricos se correlacionaram positivamente (Figura 10).

Tabela 2 – Características clínicas e bioquímicas de pacientes e controles

	NL (n = 15)	CS (n = 15)	p
Idade (anos)	30,28±9,96	35,00±10,14	0,2344
Índice de massa corporal (IMC) (Kg/m ²)	23,30±2,95	25,37±5,27	0,1990
eTFG (ml/min/1.73 m ²)	63,13±40,79	111,64 ±17,24	0,0002
Hemoglobina (g/dL)	9,8±0,96	13,21±0,76	< 0,0001
Leucócitos (cél/mm ³)	7445,33±4037,54	7092,73±2063,75	0,9291
Plaquetas (cél/mm ³)	267533,3±141627,70	246727,30±57051,01	0,7112
Albumina sérica (g/dL)	2,65±0,83	4,41±0,20	<0,0001
Cálcio iônico (mg/dL)	4,76±0,20	4,95±0,10	0,0075
Fósforo (mg/dL)	4,83±1,07	3,46±0,54	0,0003
Fosfatase alcalina (U/L)	75,93±54,31	56,44±10,37	0,6138
25(OH)D (ng/ml)	11,50±6,52	22,54±7,88	0,0008
iPTH (pg/ml)	68,13±49,56	40,00±12,68	0,2420
SLEDAI	20,43±5,43	-	-
Proteinúria	4,96 ± 2,84	-	-

Resultados estão expressos em média ± desvio padrão. NL, Nefrite lúpica; CS, Controles saudáveis; n, número de indivíduos; eTFG, Taxa de filtração glomerular estimada pela fórmula MDRD simplificada; 25(OH)D, 25-hidroxivitamina D; iPTH, Paratormônio intacto; SLEDAI, *Systemic lupus erythematosus disease activity index*; p, Significância estatística.

Tabela 3. Níveis séricos de citocinas em pacientes com nefrite lúpica e controles saudáveis

	NL (n = 15)	CS (n = 15)	p
IL-1 β (pg/ml)	1,10 $\pm$ 0,21	1,31 $\pm$ 0,42	0,1090
IL-2 (pg/ml)	3,36 $\pm$ 3,36	1,54 $\pm$ 0,9	0,0353
IL-6 (pg/ml)	15,58 $\pm$ 39,08	8,02 $\pm$ 3,49	0,0053
IL-17A (pg/ml)	4,91 $\pm$ 0,90	5,99 $\pm$ 1,96	0,0491
IL17F (ng/ml)	0,05 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,02	0,1183
TNF- α (pg/ml)	9,63 $\pm$ 14,49	1,27 $\pm$ 0,35	0,0001
RANKL (pg/ml)	20,30 $\pm$ 11,74	21,09 $\pm$ 21,65	0,9023
OPG (pg/ml)	560,12 $\pm$ 333,12	340,24 $\pm$ 102,08	0,0212
DKK-1 (pg/ml)	2802,04 $\pm$ 1380,06	696,30 $\pm$ 421,22	< 0,0001
SOST (pg/ml)	2390,85 $\pm$ 2566,41	1770,60 $\pm$ 989,63	0,9103

Resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. CS, Controles saudáveis; NL, pacientes com nefrite lúpica; n, número de indivíduos; IL-1 β , Interleucina 1 β ; IL-2, Interleucina 2; IL-6, Interleucina 6; IL-17, Interleucina 17; TNF- α , Fator de necrose tumoral- α ; RANKL, Receptor Ativador de NF- κ B ligante; OPG, Osteoprotegerina; DKK-1, Dickkopf-1; p, significância estatística.

5.2 Culturas de células hFOB 1.19

5.2.1 Incorporação de timidina

Os dados de proliferação celular pelo método de incorporação de timidina não evidenciaram diferenças entre todos os grupos, sejam pacientes ou controles, com ou sem vitamina D (Tabela 4).

Tabela 4. Proliferação celular

	hFOB NL cpm/ μ g de proteína	hFOB CS cpm/ μ g de proteína	p
Sem vitD	120,44 $\pm$ 49,20	135,86 $\pm$ 101,24	0,79
vitD 10 ⁻⁹ M	165,13 $\pm$ 121,51	99,79 $\pm$ 42,24	0,36
vitD 10 ⁻⁷ M	143,47 $\pm$ 78,36	124,23 $\pm$ 69,61	0,64

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. hFOB NL, osteoblastos com soro de pacientes com nefrite lúpica; hFOB CS, osteoblastos com soro de controles saudáveis; vitD, vitamina D como 1,25(OH) $_2$ D $_3$

Figura 9. Níveis séricos de citocinas em pacientes com nefrite lúpica e controles.

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. A) Níveis séricos de IL-2; B) Níveis séricos de IL-6; C) Níveis séricos de TNF- α ; D) Níveis séricos de DKK-1; E) Níveis séricos de OPG; F) Níveis sérico de RANKL. IL-2, Interleucina 2; IL-6, Interleucina 6; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa; DKK-1, Dickkopf-1; OPG, Osteoprotegerina; RANKL, Receptor Ativador de NF- κ B ligante; p, significância estatística.

Figura 10. Correlações entre parâmetros clínicos e laboratoriais.

A) Correlação positiva entre IL-6 e TNF- α séricos; B) Correlação positiva entre SOST e OPG séricos; C) Correlação positiva entre Proteinúria e IL-17A séricos; D) Correlação positiva entre SLEDAI e proteinúria; E) Correlação negativa entre Proteinúria e albumina sérica; F) Correlação negativa entre SLEDAI e albumina sérica. IL-6, Interleucina 6; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa; SOST, esclerostina; OPG, Osteoprotegerina; r, coeficiente de correlação de Spearman; p, significância estatística.

5.2.2 Citometria de fluxo

5.2.2.1 Moléculas de adesão e fosfatase alcalina (FA)

Embora células hFOB 1.19 tenham expressado uma forte marcação para CD54, CD166 e FA observada nos ensaios de citometria de fluxo (Figura 11), não houve diferença entre os grupos analisados NL e CS. A adição de vitamina D não modificou significativamente este comportamento.

Com relação aos grupos de hFOB NL, nós detectamos as seguintes correlações positivas considerando tanto a porcentagem de células positivas (%cél+) quanto a intensidade média de fluorescência (IMF):

- 1) hFOB NL (sem vitD): CD166 x CD54 ($r=0,697$, $p=0,004$, % cél / $r=0,879$, $p<0,001$, MFI); FA x CD54 ($r=0,618$, $p=0,014$, % cél / $r=0,946$, $p<0,001$, MFI).
- 2) hFOB NL + vitD 10^{-7} M: CD166 x CD54 ($r=0,882$, $p<0,001$, % cél / $r=0,657$, $p=0,008$, MFI); FA x CD54 ($r=0,835$, $p<0,001$, % cél / $r=0,964$, $p<0,0001$, MFI) e FA x CD166 ($r=0,613$, $p=0,015$, % cél / $r=0,579$, $p=0,024$, MFI).
- 3) hFOB CS (sem vitD): CD166 x CD54 ($r=0,896$, $p<0,001$, % cél / $r=0,586$, $p=0,022$, MFI); AP x CD54 ($r=0,693$, $p=0,004$, % cél / $r=0,932$, $p<0,001$, MFI).
- 4) hFOB CS + vitD 10^{-7} M: CD166 x CD54 ($r=0,882$, $p<0,001$, % cél / $r=0,657$, $p=0,008$, MFI), FA x CD166 ($r=0,613$, $p=0,015$, % cél / $r=0,579$, $p=0,024$, MFI).

5.2.2.2 NF- κ B, CD14 e TLR4 (Toll Like Receptor 4)

Quando analisamos por citometria de fluxo as proteínas NF- κ B, CD14 e TLR4 (CD284) extraídas do lisato celular de hFOB, não encontramos diferença entre os grupos pacientes, controles, com ou sem vitamina D.

No entanto, CD14 e NF- κ B apresentaram as seguintes correlações positivas:

- 1) hFOB NL (sem vitD): CD14 x NF- κ B ($r=0,675$, $p=0,006$, % cél / $r=0,546$, $p=0,0035$, MFI).
- 2) hFOB NL + vitD 10^{-7} M: CD14 x NF- κ B ($r=0,769$, $p=0,001$, % cél / $r=0,654$, $p=0,008$, MFI).

3) hFOB CS (sem vitD): CD14 x NF- κ B ($r=0,539$, $p=0,038$, % cél/ $r=0,755$, $p=0,001$, MFI).

4) hFOB CS + vitD 10^{-7} M: CD14 x NF- κ B ($r=0,841$, $p<0,0001$, MFI).

TLR4 não se correlacionou com nenhum parâmetro neste estudo.

Figura 11. Gráficos de citometria de fluxo.

Dados expressos em média de porcentagem de células marcadas com os referidos anticorpos. A) Primeira linha mostra os controles negativos com células não marcadas e segunda linha com a marcação para (da esquerda para a direita) CD166, CD54 e FA. B) Primeira linha mostra os controles negativos com células não marcadas e segunda linha com a marcação para (da esquerda para a direita) β -catenina e NF- κ B (intracelulares) e CD14.

5.2.3 qRT-PCR

Foram analisadas as expressões gênicas, através da mensuração de mRNA, dos genes SOST, β -catenina, RANKL e OPG. A Tabela 5 descreve as alterações detectadas nos níveis de mRNA dos genes citados.

Não achamos diferença significativa com relação aos níveis de mRNA de SOST entre os grupos de células osteoblásticas NL ou CS, no basal ou com vitamina D nas duas concentrações estudadas.

No basal, não houve diferença no mRNA de β -catenina. Porém, a adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-9}M e 10^{-7}M diminuiu mais os níveis de mRNA β -catenina dos osteoblastos NL quando comparados tanto com hFOB NL (sem vitD) tanto com hFOB CS + vitD 10^{-7}M . Adicionalmente, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ não alterou significativamente a expressão de mRNA β -catenina em osteoblastos de controles saudáveis.

RANKL mostrou expressão aumentada de seu mRNA em hFOB NL comparados com CS no basal. Após adição de vitamina D, a diferença entre os grupos não mais se fez presente.

O mRNA de OPG nas células hFOB CS apresentou elevação significativa após adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-7}M em comparação com o basal sem vitamina D. Em contraste, hFOB NL teve seu mRNA diminuído após adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-7}M em comparação ao grupo hFOB CS + vitD 10^{-7}M .

5.2.4 Conteúdo proteico – multiplex

Avaliação proteica das células osteoblásticas em cultura evidenciaram um aumento dos níveis celulares de DKK-1 em hFOB NL+ vitD 10^{-7}M comparado com hFOB CS + vitD 10^{-7}M ($673,03 \pm 171,93$ x $456,69 \pm 234,53\text{pg/mg}$, NL n=12, CS n=10, p=0,0215)

A expressão proteica celular de β -catenina não sofreu alteração de maneira significativa, mesmo após adição de vitamina D, o mesmo ocorrendo com SOST.

Células hFOB NL exibiram menor expressão de OPG no basal do que hFOB CS ($178,81 \pm 66,40$ x $298,76 \pm 114,94$ pg/mg, p=0,0016), diferença atribuída possivelmente apenas à diferença de soros (NL x CS). Apesar do fato de a adição de vitamina D ter aumentado a média de concentração de OPG celular em pacientes e controles de maneira dose dependente, não houve diferença estatística entre os grupos com vitamina D. A expressão de IL-2 só

apresentou diferença entre os grupos NL e CS após adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-7}M ($4,97\pm 2,20$ x $3,90\pm 1,66$, respectivamente), e no grupo controle também após suplementação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-7}M ($3,90\pm 1,66$ x $5,20\pm 1,75$, $p=0,046$), diminuindo expressão de IL-2 nos CS. Consideramos que o soro das pacientes com NL não permitiu que a ação da vitamina D em diminuir IL-2 que ocorreu nos CS ocorresse nas células hFOB NL. O soro NL induziu possivelmente aumento de IL-6 em hFOB NL x hFOB CS ($0,78\pm 0,16$ x $0,69\pm 0,16$ $p=0,02$), diferença que a vitamina D não conseguiu reverter.

Tabela 5. Representação da expressão de mRNA dos genes β -catenina, SOST, OPG e RANKL em culturas de células hFOB 1.19 com soro de controles e pacientes

	β -catenina	SOST	OPG	RANKL
ObCS+vitD 10^{-9}M x ObCS	Expressão: 0,794 SEM: 0,406-1,453 95% IC: 0,287-2,533 $p=0,152$	Expressão: 1,143 SEM: 0,424-2,712 95% IC: 0,154-10,435 $p=0,621$	Expressão: 1,102 SEM: 0,660-1,866 95% IC: 0,161-4,287 $p=0,629$	Expressão: 0,973 SEM: 0,536-2,203 95% IC: 0,227-3,482 $p=0,902$
ObCS+vitD 10^{-7}M x ObCS	Expressão: 1,000 SEM: 0,536-1,917 95% IC: 0,330-3,342 $p=0,988$	Expressão: 1,617 SEM: 0,536-4,595 95% IC: 0,177-11,314 $p=0,107$	Expressão: 1,441 ↑UP SEM: 0,933-2,297 95% IC: 0,424-4,727 $p=0,017$	Expressão: 1,338 SEM: 0,660-2,639 95% IC: 0,406-5,657 $p=0,127$
ObNL+vitD 10^{-9}M x ObNL	Expressão: 0,654 ↓down SEM: 0,308-1,320 95% IC: 0,156-2,057 $p=0,027$	Expressão: 0,691 SEM: 0,189-2,462 95% IC: 0,067-5,278 $p=0,260$	Expressão: 1,062 SEM: 0,574-2,055 95% IC: 0,243-3,839 $p=0,727$	Expressão: 0,761 SEM: 0,308-1,866 95% IC: 0,165-4,287 $p=0,250$
ObNL+vitD 10^{-7}M x ObNL	Expressão: 0,681 ↓down SEM: 0,330-1,320 95% IC: 0,180-2,000 $p=0,040$	Expressão: 1,159 SEM: 0,308-4,405 95% IC: 0,117-10,859 $p=0,670$	Expressão: 1,344 SEM: 0,791-2,297 95% IC: 0,406-4,595 $p=0,065$	Expressão: 0,912 SEM: 0,396-2,144 95% IC: 0,203-4,287 $p=0,693$
ObNL x ObCS	Expressão: 0,945 SEM: 0,487-1,789 95% IC: 0,308-3,118 $p=0,702$	Expressão: 1,558 SEM: 0,522-5,657 95% IC: 0,146-13,929 $p=0,182$	Expressão: 0,751 SEM: 0,435-1,231 95% IC: 0,233-2,828 $p=0,073$	Expressão: 1,573 ↑UP SEM: 0,689-3,732 95% IC: 0,344 $p=0,045$
ObNL+vitD 10^{-9}M x ObCS+vitD 10^{-9}M	Expressão: 0,737 SEM: 0,369-1,414 95% IC: 0,189-2,00 $p=0,082$	Expressão: 0,991 SEM: 0,354-2,639 95% IC: 0,127-2,639 $p=0,962$	Expressão: 0,697 SEM: 0,330-1,265 95% IC: 0,1405-4,30 $p=0,103$	Expressão: 1,243 SEM: 0,574-2,462 95% IC: 0,334-6,423 $p=0,275$
ObNL+vitD 10^{-7}M x ObCS+vitD 10^{-7}M	Expressão: 0,610 ↓down SEM: 0,308-1,149 95% IC: 0,172-1,741 $p=0,004$	Expressão: 1,176 SEM: 0,435-4,000 95% IC: 0,144-9,453 $p=0,574$	Expressão: 0,675 ↓down SEM: 0,379-1,149 95% IC: 0,243-2,373 $p=0,016$	Expressão: 1,082 SEM: 0,536-2,144 95% IC: 0,268 $p=0,651$

Resultados expressos em número de vezes de mudança do primeiro grupo em relação ao segundo grupo em cada comparação. Células hFOB 1.19 foram cultivadas com soro de pacientes com nefrite lúpica ou controles saudáveis. Alguns grupos foram tratados com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-9}M ou 10^{-7}M). Níveis de mRNA dos osteoblastos foram determinados por RT-PCR. GAPDH foi usado como gene de referência em cada experimento. CS, controles saudáveis; NL, pacientes com nefrite lúpica; ObCS, osteoblastos cultivados com soro de controles saudáveis; ObNL, osteoblastos cultivados com soro de pacientes com nefrite lúpica; vitD, vitamina D como $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$; RANKL, Receptor Ativador de NF- κ B ligante; OPG, Osteoprotegerina; SOST, esclerostina; GAPDH, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; IC, intervalo de confiança; Down, diminuído; UP, elevado; SEM, erro padrão da média; p, significância estatística.

Tabela 6. Expressão proteica de células hFOB 1.19 cultivadas com soro de controles e pacientes

	IL-1 β pg/mg	IL-2 pg/mg	IL-6 pg/mg	TNF- α pg/mg	IL-17A pg/mg	IL-21 pg/mg	DKK-1 pg/mg	RANKL pg/mg	OPG pg/mg
ObCS+vitD 10 ⁻⁹ M x ObCS	0,39 $\pm$ 0,1 0,41 $\pm$ 0,07 p=0,23	3,91 $\pm$ 1,55 5,20 $\pm$ 1,75 p=0,06	0,69 $\pm$ 0,21 0,69 $\pm$ 0,16 p=0,77	0,10 $\pm$ 0,03 0,11 $\pm$ 0,04 p=0,11	12,91 $\pm$ 10,1 18,08 $\pm$ 23,24 p=0,70	10,33 $\pm$ 7,48 13,84 $\pm$ 11,47 p=0,87	456,7 $\pm$ 234 460,44 $\pm$ 211 p=0,73	4,58 $\pm$ 3,8 4,72 $\pm$ 3,2 p=0,50	347,15 $\pm$ 171,46 298,76 $\pm$ 114,94 p=0,38
ObCS+vitD 10 ⁻⁷ M x ObCS	0,38 $\pm$ 0,1 0,41 $\pm$ 0,07 p=0,23	3,90$\pm$1,66 5,20$\pm$1,75 p=0,046	0,66 $\pm$ 0,18 0,69 $\pm$ 0,16 p=0,77	0,10 $\pm$ 0,04 0,11 $\pm$ 0,04 p=0,11	10,98 $\pm$ 6,16 18,08 $\pm$ 23,24 p=0,70	9,80 $\pm$ 7,10 13,84 $\pm$ 11,47 p=0,87	456,69 $\pm$ 234 460,44 $\pm$ 211 p=0,97	4,58 $\pm$ 3,8 4,72 $\pm$ 3,2 p=0,50	347,15 $\pm$ 171,46 298,76 $\pm$ 114,94 p=0,38
ObNL+vitD 10 ⁻⁹ M x ObNL	0,44 $\pm$ 0,17 0,39 $\pm$ 0,13 p=0,51	5,14 $\pm$ 3,26 4,38 $\pm$ 1,74 p=0,80	0,85 $\pm$ 0,22 0,78 $\pm$ 0,16 p=0,83	0,11 $\pm$ 0,06 0,09 $\pm$ 0,04 p=0,82	13,81 $\pm$ 9,68 13,00 $\pm$ 12,23 p=0,57	12,61 $\pm$ 14,06 9,97 $\pm$ 11,58 p=0,92	622,4 $\pm$ 262 668,6 $\pm$ 282 p=0,93	4,23 $\pm$ 4,0 2,99 $\pm$ 2,1 p=0,79	239,5 $\pm$ 102,2 178,8 $\pm$ 66,4 p=0,075
ObNL+vitD 10 ⁻⁷ M x ObNL	0,46 $\pm$ 0,13 0,39 $\pm$ 0,13 p=0,51	4,97 $\pm$ 2,20 4,38 $\pm$ 1,74 p=0,80	0,80 $\pm$ 0,25 0,78 $\pm$ 0,16 p=0,83	0,11 $\pm$ 0,05 0,09 $\pm$ 0,04 p=0,82	17,73 $\pm$ 15,01 13,00 $\pm$ 12,23 p=0,57	12,31 $\pm$ 15,98 9,97 $\pm$ 11,58 p=0,92	673 $\pm$ 172 668,6 $\pm$ 282 p=0,81	4,29 $\pm$ 4,0 2,99 $\pm$ 2,1 p=0,79	256,1 $\pm$ 107 178,8 $\pm$ 66,4 p=0,075
ObNL x ObCS	0,39 $\pm$ 0,13 0,41 $\pm$ 0,07 p=0,62	4,38 $\pm$ 1,74 5,20 $\pm$ 1,75 p=0,21	0,78$\pm$0,16 0,69$\pm$0,16 p=0,02	0,09 $\pm$ 0,04 0,11 $\pm$ 0,04 p=0,12	13,00 $\pm$ 12,23 18,08 $\pm$ 23,24 p=0,51	9,97 $\pm$ 11,58 13,84 $\pm$ 11,47 p=0,33	668,6 $\pm$ 282 460,44 $\pm$ 211 p=0,07	2,99 $\pm$ 2,1 4,72 $\pm$ 3,2 p=0,062	178,8$\pm$66,4 298,76$\pm$114,94 p<0,001
ObNL+vitD 10 ⁻⁹ M x ObCS+vitD 10 ⁻⁹ M	0,44 $\pm$ 0,17 0,39 $\pm$ 0,1 p=0,70	5,14 $\pm$ 3,26 3,91 $\pm$ 1,55 p=0,17	0,85$\pm$0,22 0,69$\pm$0,21 p=0,04	0,11 $\pm$ 0,06 0,10 $\pm$ 0,03 p=0,91	13,81 $\pm$ 9,68 12,91 $\pm$ 10,1 p=0,92	12,61 $\pm$ 14,06 10,33 $\pm$ 7,48 p=0,62	622,4 $\pm$ 262 456,7 $\pm$ 234 p=0,11	4,23 $\pm$ 4,0 4,58 $\pm$ 3,7 p=0,62	239,5 $\pm$ 102,2 347,15 $\pm$ 171,46 p=0,18
ObNL+vitD 10 ⁻⁷ M x ObCS+vitD 10 ⁻⁷ M	0,46 $\pm$ 0,13 0,38 $\pm$ 0,1 p=0,12	4,97$\pm$2,20 3,90$\pm$1,66 p=0,04	0,80 $\pm$ 0,25 0,66 $\pm$ 0,18 p=0,08	0,11 $\pm$ 0,05 0,10 $\pm$ 0,04 p=0,97	17,73 $\pm$ 15,01 10,98 $\pm$ 6,16 p=0,18	12,31 $\pm$ 15,98 9,80 $\pm$ 7,10 p=0,83	673$\pm$172 456,69$\pm$234 p=0,02	4,29 $\pm$ 4,0 4,58 $\pm$ 3,8 p=0,84	256,1 $\pm$ 107 347,15 $\pm$ 171,46 p=0,11

Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Comparação do primeiro grupo com o segundo grupo em cada linha. Células hFOB 1.19 foram cultivadas com soro de pacientes com nefrite lúpica ou controles saudáveis. Alguns grupos foram tratados com 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10⁻⁹ M ou 10⁻⁷ M). Níveis de proteínas dos osteoblastos foram determinados por Multiplex. CS, controles saudáveis; NL, pacientes com nefrite lúpica; ObCS, osteoblastos cultivados com soro de controles saudáveis; ObNL, osteoblastos cultivados com soro de pacientes com nefrite lúpica; vitD, vitamina D como 1,25(OH) $_2$ D $_3$; RANKL, Receptor Ativador de NF- κ B ligante; OPG, Osteoprotegerina; DKK-1, Dickkopf-1 p, significância estatística.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 Características clínicas e laboratoriais

Nefrite lúpica (NL) é uma complicação grave no quadro clínico de pacientes com LES e pode evoluir rapidamente com disfunção renal². De fato, nossos pacientes apresentaram menor eTFG ($63,13 \pm 40,79$ ml/min/1,73 m²) quando comparados aos controles saudáveis (CS), o que poderia potencialmente influenciar nossos resultados por supostamente poder aumentar os níveis séricos de algumas substâncias ou também modificar a expressão óssea de outras⁶⁸. Portanto, a influência da TFG será adequadamente discutida em cada seção a seguir, conforme necessário.

Proteinúria é um achado muito frequente em glomerulopatias como NL^{2, 69, 70} e pode levar à perda lenta de função renal⁷¹. Uma vez que a proteinúria de 24h média observada em nossas pacientes foi de $4,96 \pm 2,84$ g/dia e o nível sérico de albumina foi de $2,65 \pm 0,83$ g/dL, podemos concluir que a maioria delas estava cursando com síndrome nefrótica⁷². Consequentemente, isso poderia influenciar profundamente algumas de nossas dosagens séricas uma vez que algumas moléculas podem não ser normalmente reabsorvidas devido à competição por transportadores nas células tubulares renais ou porque suas proteínas às quais circulam ligadas foram perdidas com a proteinúria. Isso tem sido documentado com a vitamina D, cujos níveis séricos podem diminuir seguindo um declínio nos níveis de DBP (proteína ligadora de vitamina D)^{17, 73}.

Embora tenhamos detectado menores níveis séricos de 25(OH)D em pacientes com NL do que em CS, tal fato não pode ser atribuído apenas à proteinúria, conforme sugerido por Dias et al⁷⁴ e Resende et al⁴². Quando as autoras compararam pacientes com NL e pacientes com glomerulopatias primárias (sem o mesmo padrão de inflamação) e com níveis de proteinúria semelhantes, verificaram que as pacientes lúpicas apresentaram menores níveis de 25(OH)D, sugerindo que o componente inflamatório presente nas pacientes com NL poderia exercer um papel importante em diminuir a concentração de vitamina D circulante.

Contrariamente, talvez pelo pequeno tamanho da amostragem, 25(OH)D não se correlacionou em nosso estudo com proteinúria ou com níveis séricos de citocinas inflamatórias. Por outro lado, houve correlação entre proteinúria e inflamação, como

evidenciado pela positiva correlação entre proteinúria e níveis séricos de IL-17A e proteinúria com SLEDAI²⁸, um índice marcador de atividade lúpica.

6.2 Moléculas de adesão e fosfatase alcalina

Está bem documentado que diferentes tipos celulares expressam um amplo perfil de marcadores de superfície, receptores e produtos que caracterizam tanto o tipo celular quanto seu estágio de desenvolvimento. Nosso modelo de osteoblasto humano, hFOB 1.19, foi desenvolvido⁶⁴ e, desde então, vem tendo suas propriedades validadas como um modelo confiável para substituir as características de osteoblastos humanos em cultura^{51, 65, 66}.

Avaliando a comunicação entre tecido ósseo e sistema imune, Stanley et al³⁵ conduziram um estudo de co-cultura entre osteoblastos humanos primários ou modelos de osteoblastos e linfócitos T. Eles observaram uma mútua ativação com desencadeamento das respectivas respostas celulares, muitas das quais mediadas pelo aumento da expressão de moléculas de adesão nas superfícies celulares, como CD54 e CD166, levando ao aumento da interação via contato célula-célula.

Nossas culturas hFOB 1.19 expressaram fortemente esses marcadores e também fosfatase alcalina (Figura 8), o que nos leva a acreditar que nosso modelo experimental atingiu desempenho e grau de diferenciação celular, proliferação e maturação adequados. Não houve diferença entre os grupos pacientes e controles, com ou sem tratamento com vitamina D, com relação a CD54, CD166 e fosfatase alcalina, talvez devido ao estímulo (soro e/ou vitamina D) ter sido adicionado em uma fase já avançada de diferenciação celular, ou ainda porque a interação célula-célula com linfócitos ou outras células inflamatórias seja fundamental para a indução aumentada de tais moléculas observada pelos estudos de co-cultura e não apenas a presença de citocinas no microambiente de cultura.

6.3 Citocinas inflamatórias e perda óssea

As citocinas pró-inflamatórias exercem múltiplos efeitos na remodelação óssea. Na fisiopatologia da AR, por exemplo, TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-17 produzidas por macrófagos sinoviais e linfócitos T agem sobre os osteoblastos e promovem expressão de RANKL, levando à osteoclastogênese^{75, 76}. IL-1, por sua vez, medeia os efeitos osteoclastogênicos de

TNF- α por aumentar a expressão de RANKL em células mesenquimais estromais (MSC), estimulando a diferenciação dos precursores osteoclásticos⁷⁷. Ainda neste campo, tem sido demonstrado que IL-6 estimula a osteoclastogênese por indiretamente induzir a expressão de RANKL em osteoblastos e por promover diferenciação de osteoclastos em cooperação com TNF- α ⁷⁸. Por outro lado, TNF- α apresenta também efeito inibitório durante vários estágios da diferenciação osteoblástica, agindo sobre os precursores dos osteoblastos desde fases precoces.⁷⁹ Interessantemente, IL-2 tem sido ligada a funções opostas durante a resposta inflamatória, por um lado induzindo a proliferação, ativação e sobrevivência de células T, perpetuando a inflamação, enquanto que por outro lado pode também promover a diferenciação, sobrevivência e função de células T regulatórias (TREG), inibindo o desenvolvimento da linhagem Th17, limitando a resposta inflamatória, numa espécie de alça de *feedback* negativo para auto-regulação⁸⁰.

A família de citocinas de IL-17 é composta por 6 membros conhecidos até o momento, incluindo IL-17A e IL-17F, que são primariamente secretadas por células Th17 e têm sido consideradas capazes de induzir perda óssea. IL-17A, o membro mais estudado, pode agir sobre uma variedade de tipos celulares como células imunes, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, osteoclastos e osteoblastos⁸¹. Dentre as já demonstradas ações de IL-17, estão a habilidade de induzir a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos⁴⁹, a expressão de RANKL por células imunes, promovendo formação e diferenciação osteoclástica, e também de modificar, via contato célula-célula, o comportamento de osteoclastos residentes maduros de um estado não reabsortivo para ativamente reabsortivo⁴⁶. Interessantemente, IL17, sozinha ou sinergicamente com outras citocinas, tem sido também associada a aumentar a formação osteoblástica a partir de células precursoras^{81, 82}, o que poderia estar relacionado a diferentes receptores para IL-17 nas superfícies celulares⁸³. Portanto, parece haver um processo bimodal, finamente controlado por IL-17, numa combinação específica de citocinas, que promove regeneração tecidual após destruição óssea inflamatória numa via auto-regulatória⁸².

Contrariamente a alguns estudos, nossos dados não demonstraram maiores níveis séricos de citocinas envolvidas na resposta Th17, como IL-17A, IL-17F, IL-21 ou IL-22, em pacientes com NL do que em CS, o que poderia ser uma consequência do pequeno número de nossa amostra. Notoriamente, estudos tem evidenciado que IL-17 é uma potente citocina pró-inflamatória e que está relacionada à patogênese de LES/NL e que ainda altos níveis de IL-

17A poderiam prever NL em pacientes com LES⁴⁸. Adicionalmente, elevados níveis circulantes de IL-17 têm sido detectados concomitantemente com células Treg suprimidas em número e função em pacientes com LES/NL, diminuindo a ação supressora de tais células na limitação do processo inflamatório⁸⁴⁻⁸⁶.

Nosso estudo, entretanto, mostrou maiores concentrações séricas de TNF- α , IL-6 e IL-2 em mulheres com NL do que nos controles, sendo as duas primeiras consideradas potentes indutoras de osteoclastogênese através, dentre outros mecanismos, da indução de RANKL nos osteoblastos. Como mencionado anteriormente, IL-2 pode exercer tanto ações pró quanto anti-inflamatórias⁸⁰ e níveis séricos elevados têm sido determinados em modelos animais de LES/NL, ora melhorando⁸⁷, ora promovendo⁸⁸ inflamação. Logo, baseados no desenho do nosso estudo, não podemos determinar o papel isolado de IL-2 sobre as culturas de osteoblastos, se pró-inflamatória ou reguladora da inflamação, uma vez que o soro das pacientes lúpicas também continham maiores níveis de TNF- α e IL-6. No entanto, apesar disso, as principais mudanças detectadas nos osteoblastos cultivados com soro NL, maiores níveis de mRNA de RANKL e menor expressão da proteína OPG (conforme discussão abaixo), supostamente consideradas como resultantes do efeito de maiores níveis de citocinas inflamatórias, ocorreram independentemente dos maiores níveis séricos de IL-2.

6.4 Via Wnt/ β -catenina (DKK-1, SOST e β -catenina)

A via Wnt canônica ou Wnt/ β -catenina exerce papel crucial em regular o crescimento, diferenciação, função e morte celulares em muitos órgãos e tecidos, incluindo o tecido ósseo, especialmente a diferenciação osteoblástica e a formação óssea^{54, 55}. No que se refere aos antagonistas da via Wnt, a expressão e ações de SOST e DKK-1 em pacientes com NL e indivíduos saudáveis necessitam ser interpretadas sob as perspectivas local e sistêmica, assim como de saúde e doença.

Em um elegante estudo, Tveita e Rekvig⁸⁹, avaliando a atividade da via Wnt durante o desenvolvimento de doença num modelo murino de nefrite lúpica, observaram atividade renal aumentada da via Wnt em paralelo com aumentada expressão renal e sérica de DKK-1. Além disso, eles cultivaram células mesangiais com soro de camundongos com nefrite lúpica contendo elevada concentração de DKK-1 e observaram significativo aumento de células apoptóticas. Os autores concluíram que juntos esses achados sugeriam que os fatores

inibitórios no soro dos camundongos lúpicos não eram responsáveis pelas mudanças proliferativas detectadas nos rins e que o aumento da atividade renal da via Wnt seria regulado por mecanismos intra-renais e não pelos componentes sistêmicos como elevado nível sérico de DKK-1. Correspondentemente, a patogênese da NL humana parece também envolver uma aberrante ativação da via Wnt/ β -catenina, apresentando elevados níveis séricos de DKK-1 e β -catenina difusamente distribuída no tecido renal, podendo estar também correlacionada com a formação de fibrose intersticial⁶⁰.

Em concordância com os estudos acima mencionados, nossos dados mostraram níveis séricos significativamente maiores de DKK-1 em pacientes com NL do que nos controles saudáveis, reforçando o potencial papel de DKK-1 como um biomarcador e preditor de nefrite lúpica ativa, conforme proposto por Xue et al⁹⁰. Vale ressaltar o papel cada vez mais discutido da elevação dos níveis séricos de inibidores da via Wnt como possível resposta protetora à injúria endotelial e combate à calcificação vascular. Estudos de calcificação vascular ao longo dos estágios de doença renal crônica têm sugerido que fatores como hipertensão, dislipidemia, inflamação e estresse oxidativo poderiam causar lesão/disfunção endotelial, levando à transdiferenciação de células musculares lisas vasculares em células fenotipicamente osteocíticas, resultando em calcificação vascular. Tais células com fenótipo osteocítico aumentariam a secreção de SOST e DKK-1 por exemplo como mecanismo de inibir adicional transformação das células vasculares e consequente calcificação. Porém, no caso da doença renal crônica, a elevação desses inibidores poderia desencadear diminuição da formação e aumento da reabsorção ósseas⁹¹⁻⁹³.

Quando analisamos o lisato celular, o grupo hFOB 1.19 + soro NL + $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-7}M exibiu maior expressão de proteína DKK-1 concomitante com menor detecção de mRNA de β -catenina, possivelmente traduzindo o efeito inibitório da vitamina D sobre a via Wnt canônica. Interessante notar que adição de vitamina D não mudou significativamente a expressão do mRNA de β -catenina nos osteoblastos de controles saudáveis, suportando a hipótese de uma resposta celular diferencial dependendo do estado saúde/doença⁹⁴⁻⁹⁷.

Curiosamente, tais ações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre DKK-1 e β -catenina em osteoblastos achadas em nossos experimentos são similares às aquelas demonstradas por alguns estudos que avaliaram os efeitos de vitamina D sobre a via de sinalização Wnt/ β -catenina em células de câncer colorretal^{98, 99}, os quais detectaram uma forte indução da expressão genética e proteica de DKK-1 em paralelo com diminuída expressão de β -catenina, o que tem sido considerada

como uma das principais ações da vitamina D em suprimir o crescimento do câncer de cólon e a progressão de suas metástases¹⁰⁰.

Outro conhecido inibidor da via Wnt/ β -catenina é a esclerostina, uma glicoproteína solúvel secretada pelos osteócitos, que estritamente controla a osteoblastogênese⁹⁷. Níveis séricos aumentados de SOST tem sido classicamente associados a declínio da função renal, calcificação vascular e mortalidade cardiovascular¹⁰¹⁻¹⁰⁴. De fato, devido a estudos observacionais e de correlação, supunha-se que a elevação dos níveis séricos de SOST paralelamente à progressão da disfunção renal resultaria da retenção renal de SOST, o que poderia ser esperado em nossas pacientes lúpicas nesse estudo uma vez que as mesmas apresentaram menor eTFG em relação aos controles. Em contraste, nosso estudo não evidenciou elevadas concentrações séricas de SOST em relação aos CSs. Elucidativamente, Cejka et al¹⁰⁵ demonstraram que a excreção fracional de esclerostina aumenta com o declínio da função renal e, a despeito do fato de que SOST parece ser ativamente reabsorvida pelas células tubulares renais, não houve associação entre a excreção fracional de SOST e proteinúria na análise multivariada. Consequentemente, os autores concluíram que a elevação na concentração sérica de SOST à medida que a TFG diminui poderia ser explicada por aumento na produção pelos osteócitos e que o aumento na excreção renal seria adicionalmente influenciado pela disfunção tubular. Similarmente ao comentado para DKK-1 em relação à calcificação vascular, as clássicas associações de níveis elevados de SOST com doença arterial e mortalidade estão sendo revisadas^{91, 104}, tentando-se esclarecer seu potencial papel na resposta protetora à injúria endotelial.

Intrigantemente, nossos dados não revelaram diferenças entre todos os grupos quando analisamos os níveis de mRNA de SOST das células hFOB 1.19, especialmente após suplementação com vitamina D. Recentemente, um significativo corpo de estudos tem descrito as ações de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre osteoblastos^{51, 95, 96, 106-108}. Com relação a isso, Wijenayaka et al⁹⁶ mostraram que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ elevou a expressão gênica de SOST tanto em modelos de osteócitos humanos quanto em osso humano e de camundongos *ex vivo*, assim como induziu a produção e secreção de esclerostina.

Pouco tempo depois, o mesmo grupo observou que a positiva responsividade do gene SOST a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ocorreu precocemente em 3h e declinou em resposta ao PTH no mesmo intervalo. Interessantemente, após 12h pós-tratamento das culturas da linhagem de osteócitos SaOS2 já diferenciadas com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 10^{-9}M , os níveis de mRNA de SOST já tinham

significativamente diminuído em paralelo com o aumento das concentrações de RANKL e CYP24A1¹⁰⁶, a qual codifica a enzima 24-hidroxilase, capaz de rapidamente metabolizar os níveis disponíveis de vitamina D. Isso poderia explicar o fato de não termos detectado elevados níveis de mRNA e SOST após 48h da adição de vitamina D. De fato, o cenário genômico celular após exposição à vitamina D é complexo e fortemente dependente da espécie, tipo celular, estágio de diferenciação, tempo de exposição, dose e condições ambientais, como hipocalcemia por exemplo¹⁶. Infelizmente, nós não tripsinizamos culturas de hFOB 1.19 sequencialmente dentro do período de 48h de exposição a 1,25(OH)₂D₃ para avaliação total das moléculas de interesse.

Nesse contexto, torna-se relevante também atentar para as diferenças entre suplementação sistêmica de vitamina D e seus níveis e ações locais¹⁰⁹. Para exemplificar, Cidem et al⁹⁷ eficazmente suplementaram jovens adultas do sexo feminino com deficiência de vitamina D por 1 mês e então observaram significativa diminuição nos níveis séricos de SOST em comparação com as dosagens iniciais. Assim, questões como sexo, idade, raça, estado saúde/doença e nível ideal de suficiência ainda não estão totalmente elucidados no que diz respeito à indicação de suplementação de vitamina D.

6.5 RANKL/OPG

O sistema RANK/RANKL/OPG tem sido largamente reconhecido como um fator chave na regulação da osteoclastogênese e no processo de remodelação óssea. RANKL é uma molécula ancorada à membrana e liberada para a circulação através de clivagem mediada por metaloproteinases. É amplamente expresso no osso, tecido linfoide, células estromais e linfócitos T ativados^{108, 110, 111}.

OPG é uma glicoproteína secretada, pertencente à família do receptor TNF e que se liga a RANKL com maior afinidade, bloqueando a ativação de RANK, resultando em inibição da diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos^{108, 110, 111}. É expressa por uma variedade de tipos celulares, incluindo osteoblastos, linfócitos B, células dendríticas, células musculares lisas vasculares e endoteliais, condrócitos, células epiteliais do trato gastrointestinal, pulmões, mamas e pele^{108, 111}. Tem sido demonstrado que a expressão de OPG é induzida por sobrecarga detectada pelos osteócitos, TGF- β , IL-1, TNF- α , ions Ca²⁺ e estrógeno, enquanto é suprimida por ação do PTH, vitamina D, glicocorticoides,

imunossupressores e PGE2 (prostaglandina E2)⁴⁰. Adicionalmente, a concentração sérica de OPG tem sido classicamente descrita como um fator de risco associado ao envelhecimento, progressão de doença renal crônica (DRC), calcificação vascular e mortalidade cardiovascular e por todas as causas^{68, 101, 112-115}.

Em nosso estudo, nós observamos maiores níveis séricos de OPG em mulheres com NL do que em CS, o que está em conformidade com a literatura. Entretanto, o significado desses achados requer discussão adicional. Gupta et al¹¹⁶, avaliando o papel de OPG como um biomarcador para nefrite lúpica, detectaram maiores níveis séricos de OPG em NL e LES ativos do que em LES sem doença renal ou NL inativa. Adicionalmente, os autores concluíram que a OPG urinária (uOPG) é derivada dos rins e que pode ser usada como biomarcador para diferenciar pacientes com LES ativo com ou sem acometimento renal, além de apresentar potencial para prever pobre resposta à terapia e recidivas de NL.

OPG existe como monômeros de 60 kDa ou dímeros de 120 kDa e, devido tais tamanhos, é improvável que suas moléculas sejam filtradas nos glomérulos sob condições fisiológicas¹¹⁷. Nesse sentido, as propriedades farmacocinéticas de moléculas radiomarcadas de OPG recombinante foram avaliadas após administração intravenosa em ratos e a depuração de tais moléculas se mostrou predominantemente hepática¹¹⁸. Estudos têm evidenciado que as fontes de OPG em rins com NL são os capilares inflamados, túbulos e células imunes infiltrantes¹¹⁹. Combinados, os dados acima sugerem que inflamação e lesão tecidual nos rins podem induzir uma produção local aumentada de OPG, que resulta em elevação da uOPG, a qual reflete mais a doença renal do que um aumento sérico ou retenção devido TFG diminuída.

Atualmente, uma mais profunda compreensão a respeito da relação entre OPG sérica com envelhecimento, calcificação vascular e mortalidade tem estado em evidência. Tradicionalmente, tem-se creditado a elevação dos níveis de OPG circulantes ao processo de envelhecimento¹¹². Porém, de forma interessante, um estudo populacional norueguês¹²⁰ relatou um comportamento dual, caracterizado pela associação de OPG com TFG aumentada em jovens e com TFG diminuída em idosos.

Referente à calcificação vascular, mais recentemente tem-se identificado OPG como um possível protetor da integridade vascular, cujos níveis séricos podem aumentar através da produção e liberação por células vasculares em complexo com moléculas derivadas do

endotélio, como o fator de von Willebrand (FvW) por exemplo, em resposta à injúria vascular e citocinas inflamatórias¹¹⁹, o que poderia dar suporte ao nosso achado de maiores níveis séricos de OPG em pacientes com NL. Concordantemente, alguns estudos têm fornecido informação relevante, correlacionando maiores concentrações de OPG circulante com retardada progressão de doença arterial aterosclerótica, placas ateroscleróticas sem ou com pouca calcificação¹²¹⁻¹²³.

A análise de nossos lisatos celulares demonstraram menor expressão de OPG em culturas com soro NL do que CS, mas tal diferença desapareceu após exposição à vitamina D, sugerindo que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induziu a expressão da proteína OPG pelos osteoblastos, e de forma mais marcante nos grupos NL. Intrigantemente, análise de RT-PCR não exibiu diferença na dosagem de mRNA sem vitamina D, cuja adição ao meio aumentou mRNA dos controles, mas não dos células NL. Isso poderia corresponder a uma ação diferencial da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dependendo do estado saúde/doença, diferença entre concentração local e sistêmica de vitamina D e também devido à interferência das citocinas inflamatórias sobre às ações da vitamina D. Uma medida sequencial dos parâmetros de interesse dentro do período de 48h após exposição das culturas à vitamina D poderia ser interessante para responder algumas questões, assim como a análise do sobrenadante de culturas.

Tradicionalmente, tem-se considerado que a prevenção de perda óssea associada à vitamina D seria secundária às suas ações anabólicas. Entretanto, a vitamina D possui também efeitos catabólicos e níveis locais aumentados podem ser resultado ou levar à destruição óssea¹²⁴. Os efeitos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sobre os osteoclastos, por sua vez, são considerados serem mediados por osteoblastos. Especificamente, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimula os osteoblastos a expressarem RANKL, que é essencial para osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos¹⁶. Nesse sentido, Yuce et al¹²⁴, estudando pacientes com AR e periodontite, avaliaram níveis de vitamina D, $\text{TNF-}\alpha$, RANKL e OPG no fluido gengival crevicular (FGC) e no soro. Eles acharam que níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ estavam elevados no FGC nos pacientes com AR e periodontite, enquanto que os níveis séricos não foram afetados. Além disso, em seguida ao tratamento da periodontite, os níveis de $25(\text{OH})\text{D}$ e $\text{TNF-}\alpha$ no FGC e os níveis séricos de RANKL significativamente diminuíram em pacientes com RA. Portanto, tais dados sugerem que um processo inflamatório e suas citocinas poderiam induzir aumento local de vitamina D levando à destruição óssea.

Nossos dados evidenciaram maiores níveis séricos de TNF- α em pacientes com NL. mRNA de RANKL estava aumentado em células NL na análise basal sem vitamina D. Embora o papel da sinalização via TNF- α na osteoclastogênese ainda não seja completamente compreendida, tem sido documentado que TNF- α pode promover a expressão de RANKL em células estromais e osteoblastos, RANK em precursores osteoclásticos⁷⁵ e inibir a diferenciação osteoblástica⁷⁹, promovendo um perfil predominantemente reabsortivo. Nossos dados não mostraram diferença entre os grupos com relação à proliferação ou diferenciação, talvez porque as culturas de hFOB 1.19 já estivessem em avançado estágio de diferenciação quando o estímulo (soro e vitamina D) foi adicionado aos respectivos meios de cultura.

Portanto, sumariamente, osteoblastos cultivados em um microambiente com elevados níveis de TNF- α , IL-6 e talvez IL-2, como nossas culturas de hFOB 1.19, poderia induzir a produção de RANKL, suportando nosso achado de mRNA de RANKL elevado, e poderia também inibir a expressão de OPG, substanciando nossa detecção de menor nível da proteína OPG na células NL. Tomados conjuntamente, esses achados podem suportar as alterações ósseas detectadas em biópsia de pacientes com diagnóstico recente de nefrite lúpica⁴². Adicionalmente e em concordância com alguns estudos^{50, 96, 106, 125}, nossos dados sugerem que as ações de 1,25(OH)₂D₃ sobre hFOB 1.19 *in vitro* foram predominantemente catabólicas, favorecendo a reabsorção. Adicionalmente, meio de cultura enriquecido com vitamina D não preveniu as ações inflamatórias do soro de pacientes com NL sobre osteoblastos em cultura neste estudo, talvez porque a exposição a 1,25(OH)₂D₃ tenha sido feita no mesmo momento da exposição ao soro (NL ou CS), podendo ter sido diferente caso tivéssemos procedido ao pré-tratamento das culturas com vitamina D.

Limitações deste estudo incluem o pequeno tamanho dos grupos, a ausência de experimentos de co-cultura com células imunes ou osteoclastos, a não avaliação sequencial com tripsinização de grupos de culturas em intervalos intermediários dentro do período total de análise após exposição à vitamina D e a não análise dos sobrenadantes de cultura.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que os maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e talvez IL-2, detectados em nossas pacientes com nefrite lúpica ativa, podem possivelmente ter induzido genes de RANKL, como demonstrado pela maior expressão de mRNA RANKL, e inibido a expressão celular da proteína OPG, o que pode corroborar o embasamento das alterações catabólicas detectadas em biópsias ósseas dessas pacientes. Em nosso estudo, adição de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ às culturas de hFOB 1.19 não preveniu os efeitos pró-inflamatórios do soro de pacientes com nefrite lúpica ativa *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Vilas-Boas A, Bakshi J, Isenberg DA. What can we learn from systemic lupus erythematosus pathophysiology to improve current therapy? *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11: 1093-1107.
2. Schwartz N, Goilav B, Putterman C. The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26: 502-509.
3. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2677-2686.
4. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 241-250.
5. Wang H, Xu J, Zhang X, *et al.* Tubular basement membrane immune complex deposition is associated with activity and progression of lupus nephritis: a large multicenter Chinese study. *Lupus* 2018; 27: 545-555.
6. Grammer AC, Lipsky PE. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 Suppl 4: S22-27.
7. Bao L, Cunningham PN, Quigg RJ. Complement in Lupus Nephritis: New Perspectives. *Kidney Dis (Basel)* 2015; 1: 91-99.
8. Tucci M, Stucci S, Strippoli S, *et al.* Cytokine overproduction, T-cell activation, and defective T-regulatory functions promote nephritis in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010: 457146.
9. Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 980286.
10. Chan RW, Lai FM, Li EK, *et al.* Imbalance of Th1/Th2 transcription factors in patients with lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 951-957.
11. Uhm WS, Na K, Song GW, *et al.* Cytokine balance in kidney tissue from lupus nephritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 935-938.

12. Apostolidis SA, Crispín JC, Tsokos GC. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* 2011; 20: 120-124.
13. Alunno A, Bartoloni E, Bistoni O, *et al.* Balance between regulatory T and Th17 cells in systemic lupus erythematosus: the old and the new. *Clin Dev Immunol* 2012; 2012: 823085.
14. Bultink IE, Vis M, van der Horst-Bruinsma IE, *et al.* Inflammatory rheumatic disorders and bone. *Curr Rheumatol Rep* 2012; 14: 224-230.
15. Almethed K, Forsblad d'Elia H, Kvist G, *et al.* Prevalence and risk factors of osteoporosis in female SLE patients-extended report. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46: 1185-1190.
16. St-Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 225-230.
17. Mason RS, Sequeira VB, Gordon-Thomson C. Vitamin D: the light side of sunshine. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65: 986-993.
18. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010; 39: 365-379, table of contents.
19. Norman PE, Powell JT. Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res* 2014; 114: 379-393.
20. Souto M, Coelho A, Guo C, *et al.* Vitamin D insufficiency in Brazilian patients with SLE: prevalence, associated factors, and relationship with activity. *Lupus* 2011; 20: 1019-1026.
21. Sumethkul K, Boonyaratavej S, Kitumnuaypong T, *et al.* The predictive factors of low serum 25-hydroxyvitamin D and vitamin D deficiency in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2013; 33: 1461-1467.
22. Toloza SM, Cole DE, Gladman DD, *et al.* Vitamin D insufficiency in a large female SLE cohort. *Lupus* 2010; 19: 13-19.
23. Bruce D, Ooi JH, Yu S, *et al.* Vitamin D and host resistance to infection? Putting the cart in front of the horse. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235: 921-927.

24. Cantorna MT, Zhu Y, Froicu M, *et al.* Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1717S-1720S.
25. Skrobot A, Demkow U, Wachowska M. Immunomodulatory Role of Vitamin D: A Review. *Adv Exp Med Biol* 2018.
26. Jeffery LE, Burke F, Mura M, *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 2009; 183: 5458-5467.
27. Giannakakis K, Faraggiana T. Histopathology of lupus nephritis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011; 40: 170-180.
28. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002; 29: 288-291.
29. Appel GB, Cohen DJ, Pirani CL, *et al.* Long-term follow-up of patients with lupus nephritis. A study based on the classification of the World Health Organization. *Am J Med* 1987; 83: 877-885.
30. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, *et al.* TNF blockade requires 1,25(OH)₂D₃ to control human Th17-mediated synovial inflammation. *Ann Rheum Dis* 2012; 71: 606-612.
31. Singh A, Kamen DL. Potential benefits of vitamin D for patients with systemic lupus erythematosus. *Dermatoendocrinol* 2012; 4: 146-151.
32. Abou-Raya A, Abou-Raya S, Helmii M. The effect of vitamin D supplementation on inflammatory and hemostatic markers and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: a randomized placebo-controlled trial. *J Rheumatol* 2013; 40: 265-272.
33. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 421746.
34. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, *et al.* Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124: 991-998.
35. Stanley KT, VanDort C, Motyl C, *et al.* Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 29-36.

36. Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: 235.
37. Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: 234.
38. Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Orthop* 2012; 3: 175-181.
39. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337-342.
40. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 795-823.
41. Alele JD, Kamen DL. The importance of inflammation and vitamin D status in SLE-associated osteoporosis. *Autoimmun Rev* 2010; 9: 137-139.
42. Resende AL, dos Reis LM, Dias CB, *et al.* Bone disease in newly diagnosed lupus nephritis patients. *PLoS One* 2014; 9: e106728.
43. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, *et al.* Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014; 20: 62-68.
44. Joller N, Kuchroo VK. Good guys gone bad: exTreg cells promote autoimmune arthritis. *Nat Med* 2014; 20: 15-17.
45. Eskin MA, Jotwani R, Abe T, *et al.* The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* 2012; 13: 465-473.
46. Kikuta J, Wada Y, Kowada T, *et al.* Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J Clin Invest* 2013; 123: 866-873.
47. Tyagi AM, Srivastava K, Mansoori MN, *et al.* Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. *PLoS One* 2012; 7: e44552.
48. Li D, Guo B, Wu H, *et al.* Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *Autoimmunity* 2015; 48: 353-361.

49. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, *et al.* IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998; 160: 3513-3521.
50. Sutton AL, Zhang X, Dowd DR, *et al.* Semaphorin 3B is a 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced gene in osteoblasts that promotes osteoclastogenesis and induces osteopenia in mice. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 1370-1381.
51. Tarroni P, Villa I, Mrak E, *et al.* Microarray analysis of 1,25(OH)₂D₃ regulated gene expression in human primary osteoblasts. *J Cell Biochem* 2012; 113: 640-649.
52. Mikuls TR, LeVan TD, Sayles H, *et al.* Soluble CD14 and CD14 polymorphisms in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2011; 38: 2509-2516.
53. Bas S, Gauthier BR, Spenato U, *et al.* CD14 is an acute-phase protein. *J Immunol* 2004; 172: 4470-4479.
54. Wang Y, Li YP, Paulson C, *et al.* Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; 19: 379-407.
55. Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 116: 1202-1209.
56. Brabnikova-Maresova K, Jarosova K, Pavelka K, *et al.* Serum sclerostin in high-activity adult patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014; 16: 460.
57. Long L, Liu Y, Wang S, *et al.* Dickkopf-1 as potential biomarker to evaluate bone erosion in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 2010; 30: 669-675.
58. Larriba MJ, González-Sancho JM, Barbáchano A, *et al.* Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/b-Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 2013; 5: 1242-1260.
59. Larriba MJ, González-Sancho JM, Bonilla F, *et al.* Interaction of vitamin D with membrane-based signaling pathways. *Front Physiol* 2014; 5: 60.
60. Wang XD, Huang XF, Yan QR, *et al.* Aberrant activation of the WNT/β-catenin signaling pathway in lupus nephritis. *PLoS One* 2014; 9: e84852.

61. Teichmann J, Lange U, Stracke H, *et al.* Bone metabolism and bone mineral density of systemic lupus erythematosus at the time of diagnosis. *Rheumatol Int* 1999; 18: 137-140.
62. Lee C, Almagor O, Dunlop DD, *et al.* Disease damage and low bone mineral density: an analysis of women with systemic lupus erythematosus ever and never receiving corticosteroids. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45: 53-60.
63. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, *et al.* In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater* 2012; 24: 1-17.
64. Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, *et al.* Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 178-186.
65. Subramaniam M, Jalal SM, Rickard DJ, *et al.* Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *J Cell Biochem* 2002; 87: 9-15.
66. Yen ML, Chien CC, Chiu IM, *et al.* Multilineage differentiation and characterization of the human fetal osteoblastic 1.19 cell line: a possible in vitro model of human mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2007; 25: 125-131.
67. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, *et al.* A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999; 130: 461-470.
68. Graciolli FG, Neves KR, Barreto F, *et al.* The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017; 91: 1436-1446.
69. Rezende GM, Viana VS, Malheiros DM, *et al.* Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus* 2014; 23: 255-262.
70. Bargman JM, Avila-Casado C. Resolution of proteinuria in lupus nephritis: hurry up and wait. *J Rheumatol* 2014; 41: 622-625.
71. Hirayama A, Konta T, Kamei K, *et al.* Blood Pressure, Proteinuria, and Renal Function Decline: Associations in a Large Community-Based Population. *Am J Hypertens* 2015; 28: 1150-1156.

72. Kodner C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2009; 80: 1129-1134.
73. Schmidt-Gayk H, Grawunder C, Tschöpe W, *et al.* 25-hydroxy-vitamin-D in nephrotic syndrome. *Lancet* 1977; 2: 105-108.
74. Dias CB, Dos Reis LM, Caparbo VF, *et al.* Decreased in vitro osteoblast proliferation and low turnover bone disease in nonuremic proteinuric patients. *Kidney Int* 2007; 71: 562-568.
75. Kitauro H, Kimura K, Ishida M, *et al.* Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 181849.
76. Schett G. Review: Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. *Autoimmunity* 2008; 41: 224-229.
77. Wei S, Kitauro H, Zhou P, *et al.* IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 282-290.
78. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, *et al.* Combination of tumor necrosis factor α and interleukin-6 induces mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both in vitro and in vivo. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 121-129.
79. Gilbert L, He X, Farmer P, *et al.* Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* 2000; 141: 3956-3964.
80. Hoyer KK, Doms H, Barron L, *et al.* Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 2008; 226: 19-28.
81. Liao C, Zhang C, Yang Y. Pivotal Roles of Interleukin-17 as the Epicenter of Bone Loss Diseases. *Curr Pharm Des* 2017; 23: 6302-6309.
82. Croes M, Öner FC, van Neerven D, *et al.* Proinflammatory T cells and IL-17 stimulate osteoblast differentiation. *Bone* 2016; 84: 262-270.
83. Kim YG, Park JW, Lee JM, *et al.* IL-17 inhibits osteoblast differentiation and bone regeneration in rat. *Arch Oral Biol* 2014; 59: 897-905.

84. Cai XY, Luo M, Lin XJ, *et al.* [Expression and significance of Th17 and Treg cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2012; 92: 460-463.
85. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, *et al.* Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* 2015; 72: 146-153.
86. Prado C, de Paz B, López P, *et al.* Relationship between FOXP3 positive populations and cytokine production in systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2013; 61: 90-96.
87. Dai H, He F, Tsokos GC, *et al.* IL-23 Limits the Production of IL-2 and Promotes Autoimmunity in Lupus. *J Immunol* 2017; 199: 903-910.
88. Yan JJ, Lee JG, Jang JY, *et al.* IL-2/anti-IL-2 complexes ameliorate lupus nephritis by expansion of CD4. *Kidney Int* 2017; 91: 603-615.
89. Tveita AA, Rekvig OP. Alterations in Wnt pathway activity in mouse serum and kidneys during lupus development. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 513-522.
90. Xue J, Yang J, Yang L, *et al.* Dickkopf-1 Is a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus and Active Lupus Nephritis. *J Immunol Res* 2017; 2017: 6861575.
91. Evenepoel P, D'Haese P, Brandenburg V. Sclerostin and DKK1: new players in renal bone and vascular disease. *Kidney Int* 2015; 88: 235-240.
92. Lu KC, Wu CC, Yen JF, *et al.* Vascular calcification and renal bone disorders. *ScientificWorldJournal* 2014; 2014: 637065.
93. Sabbagh Y, Gracioli FG, O'Brien S, *et al.* Repression of osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is an early event in the progression of renal osteodystrophy. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 1757-1772.
94. Bisson SK, Ung RV, Mac-Way F. Role of the Wnt/. *Int J Endocrinol* 2018; 2018: 5893514.
95. Dawson-Hughes B, Harris SS, Ceglia L, *et al.* Effect of supplemental vitamin D and calcium on serum sclerostin levels. *Eur J Endocrinol* 2014; 170: 645-650.

96. Wijenayaka AR, Yang D, Prideaux M, *et al.* $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 stimulates human SOST gene expression and sclerostin secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 413: 157-167.
97. Cidem M, Karacan I, Arat NB, *et al.* Serum sclerostin is decreased following vitamin D treatment in young vitamin D-deficient female adults. *Rheumatol Int* 2015; 35: 1739-1742.
98. Aguilera O, Peña C, García JM, *et al.* The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 associated to the differentiation of human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1877-1884.
99. Pendás-Franco N, Aguilera O, Pereira F, *et al.* Vitamin D and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer: role and regulation of DICKKOPF genes. *Anticancer Res* 2008; 28: 2613-2623.
100. Ferrer-Mayorga G, Larriba MJ, Crespo P, *et al.* Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018.
101. Morena M, Jaussent I, Dupuy AM, *et al.* Osteoprotegerin and sclerostin in chronic kidney disease prior to dialysis: potential partners in vascular calcifications. *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30: 1345-1356.
102. Lv W, Guan L, Zhang Y, *et al.* Sclerostin as a new key factor in vascular calcification in chronic kidney disease stages 3 and 4. *Int Urol Nephrol* 2016; 48: 2043-2050.
103. Kanbay M, Solak Y, Siriopol D, *et al.* Sclerostin, cardiovascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol* 2016; 48: 2029-2042.
104. Claes KJ, Viaene L, Heye S, *et al.* Sclerostin: Another vascular calcification inhibitor? *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 3221-3228.
105. Cejka D, Marculescu R, Kozakowski N, *et al.* Renal elimination of sclerostin increases with declining kidney function. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 248-255.
106. Wijenayaka AR, Prideaux M, Yang D, *et al.* Early response of the human SOST gene to stimulation by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016; 164: 369-373.

107. Farach-Carson MC, Ridall AL. Dual 1,25-dihydroxyvitamin D3 signal response pathways in osteoblasts: cross-talk between genomic and membrane-initiated pathways. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 729-742.
108. Han Y, You X, Xing W, *et al.* Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res* 2018; 6: 16.
109. Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, *et al.* Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 2007; 40: 1517-1528.
110. Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. *Physiol Rev* 2017; 97: 1295-1349.
111. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 2014; 5: 511.
112. Lewis JR, Lim WH, Zhu K, *et al.* Elevated osteoprotegerin predicts declining renal function in elderly women: a 10-year prospective cohort study. *Am J Nephrol* 2014; 39: 66-74.
113. Lewis JR, Lim WH, Ueland T, *et al.* Elevated Circulating Osteoprotegerin and Renal Dysfunction Predict 15-Year Cardiovascular and All-Cause Mortality: A Prospective Study of Elderly Women. *PLoS One* 2015; 10: e0134266.
114. Jono S, Ikari Y, Shioi A, *et al.* Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation* 2002; 106: 1192-1194.
115. Abedin M, Omland T, Ueland T, *et al.* Relation of osteoprotegerin to coronary calcium and aortic plaque (from the Dallas Heart Study). *Am J Cardiol* 2007; 99: 513-518.
116. Gupta R, Aggarwal A, Sinha S, *et al.* Urinary osteoprotegerin: a potential biomarker of lupus nephritis disease activity. *Lupus* 2016; 25: 1230-1236.
117. Sato T, Tominaga Y, Iwasaki Y, *et al.* Osteoprotegerin levels before and after renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: S175-177.

118. Miyaji Y, Kurihara A, Kamiyama E, *et al.* Pharmacokinetics and disposition of recombinant human osteoprotegerin (rhOPG) after intravenous administration in female fischer rats. *Xenobiotica* 2009; 39: 113-124.
119. Montañez-Barragán A, Gómez-Barrera I, Sanchez-Niño MD, *et al.* Osteoprotegerin and kidney disease. *J Nephrol* 2014; 27: 607-617.
120. Vik A, Brodin EE, Mathiesen EB, *et al.* Serum osteoprotegerin and renal function in the general population: the Tromsø Study. *Clin Kidney J* 2017; 10: 38-44.
121. Vik A, Mathiesen EB, Brox J, *et al.* Relation between serum osteoprotegerin and carotid intima media thickness in a general population - the Tromsø Study. *J Thromb Haemost* 2010; 8: 2133-2139.
122. Morony S, Tintut Y, Zhang Z, *et al.* Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr(-/-) mice. *Circulation* 2008; 117: 411-420.
123. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, *et al.* Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2117-2124.
124. Balci Yuce H, Gokturk O, Aydemir Turkal H, *et al.* Assessment of local and systemic 25-hydroxy-vitamin D, RANKL, OPG, and TNF levels in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Oral Sci* 2017; 59: 397-404.
125. van de Peppel J, van Leeuwen JP. Vitamin D and gene networks in human osteoblasts. *Front Physiol* 2014; 5: 137.