



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULA GODENY

**NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D E DE MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA**

Londrina
2012

PAULA GODENY

**NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D E DE MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA
RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino.

Londrina
2012

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G581n Godeny, Paula

Níveis de vitamina D e de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica não dialítica / Paula Godeny. – Londrina, 2012.
71 f. : il.

Orientador: Vinícius Daher Alvares Delfino.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2010.

Inclui bibliografia.

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

CDU 616.61

PAULA GODENY

**NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D E DE MARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA NÃO DIALÍTICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de agosto de 2012.

*Aos meus pais que não mediram esforços
para me incentivar na realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por toda força, inspiração e dedicação que me concedeu durante a realização deste trabalho.

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos aos meus pais por sempre me incentivarem na busca pelo conhecimento, proporcionando condições para isso e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino pela oportunidade, pela confiança, apoio e pela contribuição no meu aperfeiçoamento profissional.

Em especial ao Professor Dr. Décio Sabbatini Barbosa pela disposição, atenção e ativa colaboração no projeto, sem as quais eu não teria concluído minha dissertação.

Aos demais colaboradores do projeto: Abel Esteves Soares, Taysa A. Felix da Silva, Flávio Henrique O. Souza e Andressa Keiko Matsumoto que não mediram esforços, pelo apoio e toda a contribuição que propiciaram ao projeto.

Agradeço também a todos os funcionários, estagiários e demais estudantes da pós-graduação e do laboratório de pós-graduação que estiveram sempre presentes, pela amizade e pela companhia, tornando as horas de trabalho mais alegres e divertidas.

Em geral, a todos os meus amigos, pacientes, funcionários e professores do HU e do Instituto do Rim por estarem presentes nesse momento especial da minha vida e que me estimularam de alguma forma.

Finalmente agradeço aos demais laboratórios e setores da UEL e do HU, em especial ao LAPA e laboratório de imunologia, pelo acolhimento e por toda a ajuda oferecida.

A alegria não chega apenas no encontro do achado,
mas faz parte do processo da busca.
(Paulo Freire)

GODENY, P. **Níveis séricos de vitamina D e de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica não dialítica.** 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma síndrome clínica decorrente da perda progressiva e irreversível das funções renais que está associada à elevada mortalidade cardiovascular e baixos níveis de vitamina D. Fatores de risco cardiovascular específicos da DRC, como toxinas urêmicas, inflamação, estresse oxidativo aumentado e metabolismo do cálcio e fósforo alterados (incluindo a deficiência de vitamina D) somam-se aos fatores de risco tradicionais na explicação desta mortalidade tão aumentada. Existem diferenças entre as diretrizes sugeridas pelo Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) e pelo Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) com relação ao metabolismo mineral e ósseo na DRC. Este estudo teve por objetivo verificar a existência de uma possível associação entre deficiência de vitamina D e níveis séricos de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com DRC estágios 3-5 (não dialítico). Foi realizado um estudo transversal com 158 pacientes com DRC do Ambulatório de DRC da disciplina de Nefrologia da Universidade Estadual de Londrina e do Instituto do Rim de Londrina, na cidade de Londrina, Paraná. Foram excluídos os menores de 18 anos, em uso de suplementação de qualquer forma de vitamina D, os pacientes já em diálise ou receptores de transplante renal, pacientes com antecedente de cirurgia de *bypass* intestinal ou história de enterectomia prévia, história de doença intestinal de má absorção ou de cirrose hepática, presença de doença infecciosa ou maligna ativa, perda inexplicada de mais de 5% do peso corporal nos últimos 6 meses, em uso de corticóides ou de outros fármacos que pudessem interferir no metabolismo da vitamina D. Os participantes responderam a um questionário para coleta de dados, e foram submetidos a exame clínico. Foram realizados exames de: 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, creatinina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, PTHi, glicose, hemoglobina, ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL, triglicérides, índice proteinúria/creatinúria, PCR e fibrinogênio. O estresse oxidativo foi avaliado pela quantificação da AOPP, determinação da peroxidação lipídica pela dosagem de hidroperóxidos lipídicos e MDA, quantificação dos metabólitos do NO (NOx) e avaliação da capacidade antioxidante total (TRAP). Os pacientes foram separados em grupos conforme os valores séricos da vitamina D em adequados ≥ 30 ng/mL, insuficientes entre 15 e 29,9 ng/mL e deficientes < 15 ng/mL. Aproximadamente 60% dos pacientes apresentaram níveis inadequados de vitamina D. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos separados pelos níveis de 25(OH)D (adequado, insuficiente e deficiente) em relação ao peso, altura, IMC, circunferência abdominal, PCR, fibrinogênio, TRAP, MDA, NOx, AOPP e hidroperóxido. Houve correlação positiva entre os níveis de vit D e os níveis de 1,25(OH)₂D, TFG e albumina, bem como houve correlação negativa entre os níveis de vit D e os níveis de PTHi e a relação proteinúria/creatinúria. Não foram encontradas correlações entre os valores da 25(OH)D e as medidas antropométricas analisadas, também não houve correlação entre os valores da vitamina D e os marcadores de estresse oxidativo ou de inflamação (PCR e fibrinogênio). Este estudo possibilitou verificar, também, que as diretrizes sugeridas pelo KDIGO se mostraram mais apropriadas para acompanhamento e tratamento da hipovitaminose D em pacientes com DRC não dialítica.

Palavras-chaves: Insuficiência renal crônica. Vitamina D. Deficiência de vitamina D. Estresse oxidativo.

GODENY, P. **Serum vitamin D and markers of oxidative stress in patients with chronic kidney disease not on dialysis.** 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is a clinical syndrome caused by progressive and irreversible loss of kidney function that is associated with increased cardiovascular mortality and low levels of vitamin D. Specific CKD cardiovascular risk factors such as uremic toxins, inflammation, increased oxidative stress and metabolism of calcium and phosphorus (including vitamin D deficiency) add to the traditional risk factors in explaining this so increased cardiovascular mortality. There are differences between Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) and *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) guidelines regarding the management of mineral and bone metabolism in CKD. This study aimed to verify the existence of a possible association between vitamin D deficiency and serum levels of markers of oxidative stress in patients with CKD stages 3-5 (no dialysis). We conducted a cross-sectional study with 158 patients with CKD followed in CKD Clinic of Nephrology, State University of Londrina, and in the Kidney Institute of Londrina, in Londrina, Paraná. We excluded those younger than 18 years, using any form of supplemental vitamin D, patients already on dialysis or renal transplant recipients, patients with a history of intestinal bypass surgery or a history of prior bowel resection, a history of intestinal malabsorption or liver cirrhosis, presence of active infectious disease or malignancy, unexplained loss of more than 5% of body weight in the last 6 months, use of corticosteroids or other drugs that could interfere with the metabolism of vitamin D. The participants answered a questionnaire and underwent clinical examination. Weight, height and waist circumference (WC) were measured on this occasion. Laboratory tests were performed: 25(OH)D, 1,25(OH)₂D, creatinine, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, iPTH, glucose, hemoglobin, uric acid, total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, proteinuria/creatinine ratio, CRP, and fibrinogen. Oxidative stress was evaluated by quantification of advanced oxidation protein products (AOPP), determination of lipid peroxidation by measurement of lipid hydroperoxides and MDA, measurement of NO metabolites (NOx) and evaluation of antioxidant activity by TRAP. Patients were divided into groups according to serum levels of vitamin D in adequate ≥ 30 ng/mL, insufficient between 15 and 29.9 ng / mL and deficient <15 ng/mL. Almost 60% of patients had inadequate levels of vitamin D. There was no significant difference between groups separated by levels of 25 (OH) D (adequate, insufficient and deficient) in relation to weight, height, BMI, WC, CRP, fibrinogen, TRAP, MDA, NOx, AOPP and hydroperoxide. Positive correlation between levels of vitamin D and levels of 1,25(OH)₂D, eGFR, and albumin as well as negative correlation between levels of vit D and iPTH levels and the relationship proteinuria/creatinuria ratio were found. No correlation was found between the values of 25 (OH) D and anthropometric measurements analyzed and also no correlation between the values of vitamin D and markers of oxidative stress or inflammation (CRP and fibrinogen). This study also enabled us to verify that the guidelines suggested by KDIGO were more appropriate to evaluate and treat vitamin D deficiency in patients with CKD not yet on dialysis.

Keywords: Chronic kidney Disease. Vitamin D. Vitamin D deficiency. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo:

- Gráfico 1** – Frequências dos níveis séricos de 25(OH)D, em ng/dL, nos pacientes estudados40
- Gráfico 2** – Prevalência de deficiência/insuficiência de vitamina D de acordo com as diretrizes do KDOQI.....41
- Gráfico 3** – Percentagem de pacientes com valores de PTHi (pg/mL) sérico acima, dentro e abaixo dos níveis sugeridos pelo KDOQI (2003) e percentagem de vitamina D sérica adequada (25(OH)D>30ng/mL) e inadequada (25(OH)D <30ng/mL) dentro dos 3 grupos de PTHi, nos estágios 3-5 (não dialítico) da DRC41

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO:

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Estagiamento da DRC..... | 15 |
| Tabela 2 – Principais fatores de risco para deficiência de vitamina D | 18 |

ARTIGO:

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Características gerais dos pacientes estudados | 37 |
| Tabela 2 - Diferenças relativas ao gênero nos exames laboratoriais realizados e nas TFGs entre os participantes do estudo | 38 |
| Tabela 3 - Medidas antropométricas dos pacientes, em função dos níveis séricos da vitamina D | 39 |
| Tabela 4 - Valores séricos dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo entre os grupos classificados segundo o valor da 25(OH)D | 39 |
| Tabela 5 - Correlações de Spearman estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas no estudo e os valores de 25(OH)D ou 1,25(OH) ₂ D..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| AOPP | Produtos avançados da oxidação proteica |
| BRA | Medicamentos bloqueadores dos receptores da angiotensina II |
| CA | Circunferência abdominal |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CPM | Contagem por minuto |
| DRC | Doença Renal Crônica |
| ERNs | Espécies reativas de Nitrogênio |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| GLADE | <i>Grading of Recommendations Assessment Development and Evaluation</i> |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IECA | Medicamentos inibidores da enzima conversora de angiotensina. |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IMC | Índice de massa corporal |
| KDIGO | <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i> |
| KDOQI | <i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i> |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LPO | Lipoperoxidação |
| MDA | Malondialdeído |
| MDRD | <i>Modification of Diet in Renal Disease</i> |
| NKF | <i>National Kidney Foundation</i> |
| NO | Óxido Nítrico |
| NOx | Metabólitos do óxido nítrico |
| PCR | Proteína C reativa |

| | |
|-----------------------|--|
| PTHi | Hormônio Paratireoideano intacto |
| QL | Quimioluminescência |
| SBN | Sociedade Brasileira de Nefrologia |
| TBA | Ácido Tiobarbitúrico |
| T-butil hidroperóxido | Terc-butil hidroperóxido |
| TFG | Taxa de filtração glomerular |
| TFGe | Taxa de filtração glomerular estimada |
| TNF α | Fator de Necrose Tumoral α |
| TRAP | Capacidade antioxidante total plasmática |
| UEL | Universidade Estadual de Londrina |
| UVB | Radiação ultravioleta B |
| Vit D | Vitamina D |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| 1,25(OH) $_2$ D | 1,25-dihidroxitamina D |
| 25(OH)D | 25-hidroxitamina D |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | A DOENÇA RENAL CRÔNICA..... | 14 |
| 1.2 | O ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA | 16 |
| 1.3 | A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D NA DOENÇA RENAL CRÔNICA..... | 17 |
| 2 | OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 3 | METODOLOGIA | 22 |
| 3.1 | DESENHO DO ESTUDO | 22 |
| 3.2 | PACIENTES | 22 |
| 3.3 | COLETA DE DADOS..... | 23 |
| 3.4 | MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS | 23 |
| 3.5 | OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS | 23 |
| 3.6 | EXAMES DE ROTINA..... | 24 |
| 3.7 | AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO | 25 |
| 3.7.1 | Capacidade Antioxidante Total Plasmática | 25 |
| 3.7.2 | Determinação do Malondialdeído | 25 |
| 3.7.3 | Determinação do Óxido Nítrico..... | 26 |
| 3.7.4 | Quantificação dos Produtos Avançados da Oxidação de Proteínas..... | 26 |
| 3.7.5 | Quimiluminescência induzida por T-butil Hidroperóxido | 26 |
| 3.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 27 |
| 4 | RESULTADOS | 28 |
| Artigo: | Níveis Séricos de Vitamina D e de Marcadores de Estresse Oxidativo em pacientes com Doença Renal Crônica não Dialítica | 29 |
| 5 | CONCLUSÃO | 48 |
| 6 | PERSPECTIVAS FUTURAS | 49 |
| | REFERÊNCIAS | 50 |

| | |
|---|----|
| ANEXOS | 54 |
| ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética de pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina | 55 |
| ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética de pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina | 56 |
| ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido..... | 57 |
| ANEXO D - Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP) | 59 |
| ANEXO E - Determinação do Malondialdeído (MDA) | 62 |
| ANEXO F - Determinação do Óxido Nítrico (NO)..... | 64 |
| ANEXO G - Quantificação de produtos avançados da oxidação de proteínas | 70 |
| ANEXO H - Quimiluminescência (QL) Induzida por terc-butil hidroperóxidos | 71 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA RENAL CRÔNICA

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma síndrome clínica causada por inúmeras doenças que levam à redução progressiva e irreversível da filtração glomerular e culminam na incapacidade dos rins em manter o volume e a composição química dos líquidos corporais dentro dos limites adequados à vida das células (Ribeiro e colaboradores, 2008). A doença, em suas fases mais avançadas, determina importante aumento da uréia e de outras toxinas no sangue, as quais desencadeiam uma série de sinais e sintomas conhecidos como síndrome urêmica. (Queiroz e colaboradores, 2008), cujo tratamento requer diálise ou transplante renal (Sesso e colaboradores, 2008).

O crescimento da população idosa e da prevalência de obesidade levou a um aumento das doenças crônicas, com destaque para o *diabetes mellitus* e a hipertensão arterial, principais causas de falência renal crônica em todo o mundo (Atkins e colaboradores, 2005). Estima-se que mais de um milhão de pessoas façam algum tipo de diálise em todo o mundo, sendo um quarto desses pacientes da América Latina (Cusumano, 2008).

Atualmente, a DRC atinge proporções epidêmicas e constitui um problema emergente de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, a exemplo do que ocorre na maioria dos países em desenvolvimento, as prevalências relatadas de DRC não dialítica e dialítica são muito menores que as dos países desenvolvidos devido à escassez de informações (Hafez e colaboradores, 2006; Bakris & Ritz, 2009). Para Oliveira e colaboradores (2005) o baixo índice de diagnóstico da DRC, o acesso limitado à terapia renal substitutiva e, principalmente, a alta taxa de mortalidade dos pacientes diabéticos e hipertensos ainda nas fases pré-dialíticas explicam esta baixa prevalência da doença no Brasil.

O número de pacientes mantidos em diálise no Brasil vem aumentando gradativamente. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), em 2000, cerca de 42.000 pacientes eram mantidos nos programas de diálise, em 2006 este número passou para aproximadamente 65.000, aumentando para mais de 90.000 pacientes em 2011 (Sesso e colaboradores, 2011).

O melhor índice disponível para a avaliação da função renal global é a taxa de filtração glomerular (TFG), a qual pode ser estimada (TFGe) através de fórmulas matemáticas que incluem a dosagem de creatinina sérica e outros parâmetros. A equação simplificada do estudo MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*), recomendada pela NKF (*National Kidney Foundation*, Estados Unidos), é a equação mais frequentemente utilizada para a estimativa da TFG (Levey e colaboradores, 2000). Em 2002, a NKF estabeleceu critérios para o estadiamento e classificação da DRC, os quais foram, em seguida, adotados por várias outras sociedades internacionais de nefrologia, incluindo-se nestas a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) (Romão Jr, 2004). Estes critérios são apresentados na tabela 1.

Os estágios 1 e 2 da DRC são definidos pela evidência de dano renal (albuminúria, proteinúria, hematúria ou alteração da imagem renal) mas com TFGe maior que 90 mL/min/1,73 m² (estágio 1), ou pela evidência de dano renal com TFGe <90 mas ≥ 60 mL/min/1,73 m² (estágio 2). Considera-se DRC significativa quando a TFGe encontra-se persistentemente, por pelo menos 3 meses, menor que 60 mL/min/1,73 m², pois abaixo deste limiar há aumento da mortalidade cardiovascular e aparecimento de complicações próprias da DRC como, por exemplo, hiperparatireoidismo secundário (Schiffrin e colaboradores, 2007; Levin, 2007).

Tabela 1 - Estagiamento e Classificação da DRC.

| Estágio | Descrição | TFG(e) (mL/min/1,73 m²) |
|----------------|---|---|
| I | Lesão renal com TFGe normal ou aumentada | ≥90 |
| II | Lesão renal com leve diminuição da TFGe | 60 – 89 |
| III | Lesão renal com moderada diminuição da TFGe | 30 – 59 |
| IV | Lesão renal com acentuada diminuição do TFGe | 15 – 29 |
| V | Falência renal funcional ou em tratamento renal substitutivo (TRS)* | <15 |

TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; *TRS: diálise ou transplante renal

Deve ser ressaltado que nos pacientes com DRC 3-5, a mortalidade cardiovascular é tanto maior quanto menor for a TFGe apresentada, chegando a ser de 20 a 100 vezes maior nos pacientes em diálise que na população geral (Sarnak e

colaboradores, 2002; Sesso e colaboradores, 2008; Rucker & Tonelli, 2009). Os fatores de risco tradicionais para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo, *diabetes mellitus*, hipertensão arterial, dislipidemia e idade avançada concentram-se na população de renais crônicos, mas não explicam completamente esta mortalidade cardiovascular tão expressiva. Fatores de risco não tradicionais como toxinas urêmicas, inflamação e estresse oxidativo aumentados (desequilíbrio entre substâncias pró e antioxidantes presentes no organismo) e metabolismo do cálcio e fósforo alterados, aqui inclui-se a deficiência de vitamina D, são considerados fatores adicionais (Rucker & Tonelli, 2009).

1.2 O ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

O estresse oxidativo é uma condição biológica comum a diversas patologias, que ocorre quando há desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs e ERNs), conhecidas genericamente como radicais livres, e os sistemas antioxidantes presentes no corpo para combatê-las (Vasconcelos e colaboradores, 2007). A reação destas espécies com os ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas celulares, e nas lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que pode ser avaliado e utilizado como um indicador do estresse oxidativo celular. A LPO constitui o evento citotóxico primário que desencadeia sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (Lima & Abdalla, 2001).

Os hidroperóxidos são os primeiros (produtos da peroxidação lipídica) a serem formados a partir da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares e das lipoproteínas. Eles são produtos instáveis e se decompõem dando origem a uma série de compostos complexos que incluem compostos carbonílicos reativos, como o malondialdeído (MDA) (Yagi, 1998; Armstrong & Browne, 1994).

Por mecanismos diretos ou indiretos, intra e extracelulares, produtos do meio urêmico (próprios dos indivíduos com DRC) podem causar inflamação e

promover aumento do estresse oxidativo ao interagirem com vários componentes celulares (ácidos nucleicos, membranas e proteínas, por exemplo) promovendo alterações estáveis nestes componentes as quais podem ser utilizadas como marcadores de estresse oxidativo (Valli e colaboradores, 2007). Estudos mostram que marcadores de estresse oxidativo e de inflamação estão aumentados nos pacientes com DRC (Oberge e colaboradores, 2004; Yilmaz e colaboradores, 2006).

O estresse oxidativo está relacionado com o aumento da mortalidade cardiovascular, uma vez que está envolvido no processo da formação de placas de gorduras, na disfunção endotelial e na aterosclerose de pacientes com e sem DRC (Oberge e colaboradores, 2004; Annuk e colaboradores, 2005; Costa-Hong e colaboradores, 2009). A gênese da inflamação exagerada e do estresse oxidativo aumentado na DRC é, de certa forma, multifatorial, podendo a deficiência de vitamina D (vit D) vir a ser um fator importante neste processo.

1.3 A DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A vit D é a única vitamina que pode ser sintetizada pelo homem, através da radiação solar ultravioleta B (UVB) na pele, sendo esta a principal fonte da vitamina (Holick, 2006), o restante é proveniente da alimentação. Quando ingeridas, as formas inativas da vit D D₂ (ergocalciferol - de origem vegetal) ou D₃ (colecalciferol - de origem animal), são absorvidas no intestino, e então transportadas até o fígado, onde sofrem uma hidroxilação formando a 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], que é a forma circulante no sangue. Posteriormente, no rim, sofrem outra hidroxilação formando a 1,25-dihidroxivitamina D₃, que é a forma ativa da vitamina, responsável pela homeostase de minerais (principalmente cálcio e fósforo) e pela formação e manutenção dos ossos.

Apesar da 1,25(OH)₂D ser a forma ativa da vitamina, seus níveis não se correlacionam com o estado da vitamina no corpo, sendo, então, a 25(OH)D o marcador com maior relevância clínica (GMosekilde e colaboradores, 2008). A vitamina ativa, considerada então um hormônio, por ser produzida predominantemente por um órgão (o rim) e exercer efeitos de longo alcance em numerosos órgãos e tecidos como glândulas paratireoides, intestino, ossos, músculos endoteliais, células cardíacas, linfócitos e macrófagos (que apresentam

receptores da vitamina) (Holick, 2007) desempenhando um papel importante na saúde cardiovascular e na função imune.

O nível ótimo de vit D é considerado como aquele necessário para manter o paratormônio (PTH) em níveis adequados, visto que a deficiência da 1,25(OH)₂D leva à diminuição da absorção de cálcio e fósforo no intestino, o que, em consequência, estimula as glândulas paratireoides a liberarem o PTH, a fim de elevar a reabsorção renal e óssea de cálcio (hiperparatiroidismo secundário) (Llach e colaboradores, 1998; Levin e colaboradores, 2007).

Fatores físicos podem influenciar na concentração plasmática da vit D, pois atenuam a exposição à radiação UVB, como o uso de roupa ou protetor solar, reduzindo a foto-produção da vit D. O grau de pigmentação da pele também interfere na concentração dos níveis de vit D, uma vez que indivíduos de raça negra necessitam de uma maior exposição solar que indivíduos de raça branca para produzir a mesma quantidade de vit D (Mathieu e colaboradores, 2006). A tabela 2 apresenta uma lista de fatores de risco para o desenvolvimento da deficiência de vit D.

Tabela 2 - Principais fatores de risco para deficiência de vitamina D

PRINCIPAIS FATORES DE RISCO PARA DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D

Envelhecimento

Aumento da distância do Equador

Inverno rigoroso

Pele pigmentada

Uso de protetor solar ou cobrir-se de roupas

Poluição

Fumo

Obesidade

Inatividade física

Fatores genéticos

Má absorção

Doenças renais ou hepáticas

Uso de medicamentos como: corticóides, imunossupressores, etc

(Lavie e colaboradores, 2011).

Na prática clínica, a deficiência de vit D é avaliada pelos níveis plasmáticos de 25(OH) vit D. Não há consenso sobre os valores normais da vitamina, mas estima-se que para indivíduos com DRC, níveis plasmáticos adequados situem-se entre 30 e 50ng/mL, considerando valores entre 15 e 29ng/mL insuficientes e menores que 15ng/mL deficientes (Jean e colaboradores, 2009; K/DOQI, 2003). Além de apresentarem alta prevalência de deficiência e insuficiência de vit D, atingindo mais de 60% (Levin e colaboradores, 2007; Cuppari e colaboradores, 2008, Ravani e colaboradores, 2009) pacientes com DRC apresentam, também, redução na forma ativa da vit D (1,25 dihidroxivitamina D), uma vez que ela diminui progressivamente à medida que a doença renal se agrava (Llach e colaboradores, 1998; Levin e colaboradores 2007).

Para facilitar o entendimento, a prevenção, o diagnóstico e o manejo da doença mineral e óssea no paciente com DRC, a National Kidney Foundation (dos Estados Unidos) por meio do KDOQI (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*, 2003) e uma fundação composta por especialistas internacionais, a KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*, 2009), publicaram nos últimos anos diretrizes sobre este tema. As diretrizes do KDOQI, sobre o metabolismo e doença óssea na DRC, sugerem que para os pacientes nos estágios 3 e 4 da DRC, a deficiência de vit D seja procurada e tratada naqueles indivíduos que apresentarem valores de PTHi acima dos valores determinados como alvo terapêutico (de acordo com o estágio da DRC – estágio 3, valor alvo de PTHi = 35-70pmol/L e no estágio 4 PTHi=70-110pmol/L). Para os pacientes com DRC estágio 5 ,dialíticos ou não, não há recomendação de se procurar a deficiência de vitamina e há orientação para que se use uma forma ativa de vit D (1,25[OH]D) nos pacientes com PTHi acima de 300 pmol/L. Por outro lado, o KDIGO recomenda avaliar a deficiência de 25(OH)D e corrigir os casos desta hipovitaminose de maneira semelhante à utilizada para a população geral em todos os pacientes com DRC estágios 3-5, inclusive os em tratamento dialítico.

Tarcin e colaboradores (2009) demonstraram que a falta de vit D está associada à disfunção endotelial e ao aumento da peroxidação lipídica e que a reposição desta vitamina melhora estes dois parâmetros em indivíduos com função renal normal e com deficiência assintomática desta vitamina; Schleithoff e colaboradores (2006), relataram que a suplementação de vitamina D para pacientes com insuficiência cardíaca congestiva reduziu os níveis da citocina pró-inflamatória

TNF α e aumentou os da citocina antiinflamatória IL-10. Outros estudos verificaram que baixos níveis de 25(OH)D estão associados com maior mortalidade geral e cardiovascular e com maior número de eventos cardiovasculares não fatais em pacientes com e sem doença renal crônica (Artaza e colaboradores, 2009; Rucker e colaboradores, 2009).

Estudos recentes têm associado deficiência de vit D com parâmetros antropométricos, doenças cardiovasculares e maiores riscos de mortalidade em pacientes com DRC (Figueiredo-Dias e colaboradores, 2012; Navaneethan e colaboradores, 2011; Lavie e colaboradores, 2011). McGill e colaboradores (2008) documentaram relação inversa entre os níveis plasmáticos de vit D com índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal, tanto em pacientes obesos quanto naqueles com sobrepeso.

O estudo da possível influência da vit D no estresse oxidativo em pacientes com DRC em fase ainda não dialítica pode ajudar no entendimento da geração exagerada do estresse oxidativo nesta condição e chamar a atenção para medidas terapêuticas destinadas à manutenção adequada dos estoques corporais de vit D neste grupo de pacientes.

2 OBJETIVO GERAL

Verificar associação entre níveis séricos de 25(OH)D e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com DRC estágios 3-5 (não dialíticos).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o estresse oxidativo por meio de metodologias diferentes, analisando marcadores de peroxidação lipídica (hidroperóxido lipídico e malondialdeído), oxidação proteica (produtos avançados da oxidação proteica), metabólitos do óxido nítrico (NOx), além das defesas antioxidantes (TRAP) em pacientes com DRC não dialítica;

- Determinar a prevalência de insuficiência e deficiência de vit D em uma amostra de pacientes com DRC não dialítica acompanhados no norte do estado do Paraná;

- Comparar o desempenho das diretrizes sugeridas pelo KDOQI 2003 (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, NKF) e pelo KDIGO 2009 (Kidney Disease Improving Global Outcome) para o manejo do metabolismo e da doença óssea na DRC em pacientes com DRC não dialítica acompanhados no nosso meio.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal envolvendo pacientes acompanhados no Ambulatório de Doenças Renais Crônicas da disciplina de Nefrologia da Universidade Estadual de Londrina e do Instituto do Rim de Londrina, Paraná, Brasil, em que os pacientes com Doença Renal Crônica da cidade de Londrina e macrorregião foram recrutados no período entre setembro de 2010 e dezembro de 2011.

3.2 PACIENTES

Para este estudo, DRC foi definida em conformidade com a classificação estabelecida pela NKF e aceita pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN).

O protocolo deste estudo foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina, nº 086/10 em julho de 2010 (anexos A e B). Todos pacientes que participaram do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo C) antes da realização de qualquer procedimento.

Os critérios de elegibilidade dos pacientes constituíram idade superior a 18 anos e TFG_e < 60mL/min/1,73 m². Ficaram excluídos os pacientes já em diálise ou receptores de transplante renal, com antecedente de cirurgia de *bypass* intestinal ou história de enterectomia prévia, história de doença intestinal de má absorção ou de cirrose hepática, presença de doença infecciosa ou maligna ativa, perda inexplicada de mais de 5% do peso corporal nos últimos 6 meses ou que faça uso de corticóides.

Inicialmente foram selecionados 180 pacientes que preencheram os critérios de inclusão e que não se enquadravam nos critérios de exclusão, porém 13 foram excluídos devido à variação intra-individual do clearance de creatinina (Eriksen e colaboradores, 2007 e Lamb e colaboradores, 2003), ficando a TFG_e > 60mL/min/1,73 m² no dia da coleta de sangue, 6 eram cadeirantes ou acamados, não permitindo a obtenção das medidas antropométricas necessárias para o estudo

e 3 tiveram a coleta de dados incompletas, restando 158 pacientes adequados para ingressar ao estudo.

3.3 COLETA DE DADOS

Os pacientes selecionados foram submetidos a questionários, levantamento dos medicamentos em uso e exame clínico e demográfico direcionados aos objetivos do estudo, tais como: sexo, idade, raça/cor (por auto definição), tabagismo, história de hipertensão e de diabetes. Os exames laboratoriais pertinentes ao estudo em questão, (25(OH)D e 1,25-(OH)₂D e marcadores de estresse oxidativo), foram adicionados aos exames rotineiramente solicitados pelo nefrologista responsável e coletados conjuntamente.

3.4 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Todos os pacientes foram avaliados mediante: peso (kg: Balança Mecânica Antropom), estatura (m) e a partir destes dados foram calculados os índices de massa corporal (IMC) em peso/altura² e assim, classificada a obesidade segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization - WHO, 1995*).

A circunferência abdominal foi medida com fita métrica disposta na altura da cicatriz umbilical.

3.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

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

As amostras de soro destinadas aos testes de estresse oxidativo foram centrifugadas a 3000 rpm (2100xg) durante 15 minutos em centrífuga (CELM[®],

Barueri, SP, Brasil), e os soros obtidos ficaram armazenados em freezer (Indrel[®] 70 R Londrina, Paraná, Brasil) a -80°C até a realização das análises.

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

3.6 EXAMES DE ROTINA

As análises de colesterol total, colesterol HDL, triacilglicerol, glicose, uréia, creatinina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e proteínas totais foram efetuadas em um auto-analisador bioquímico (Dade AR[®]), utilizando-se kits Dade Behring[®]. Quando possível, o colesterol LDL foi calculado. O colesterol total foi quantificado pela técnica da colesterol oxidase, colesterol HDL pelo método da precipitação seletiva através do reagente fosfotungüístico tamponado e os triacilgliceróis foram analisados por meio de técnica enzimática bicromática, utilizando lipase e glicerol desidrogenase.

O ácido úrico foi quantificado pelo método enzimático da uricase. A determinação da proteína C de alta sensibilidade foi efetuada por nefelometria, o fibrinogênio pelo método de Klauss e a hemoglobina foi quantificada pelo hemograma automatizado (ADVIA-120).

A quantificação plasmática do hormônio paratiroideano intacto (PTHi) foi feita por quimioluminescência (Architect – Abbott). A relação proteinúria/creatinúria foi analisada em uma amostra isolada de urina pelo método cinético (JAFE) do vermelho de pirogalol.

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

3.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

3.7.1 Capacidade Antioxidante Total Plasmática (TRAP)

A TRAP foi avaliada por quimiluminescência (QL) em uma adaptação da técnica descrita por Repetto e colaboradores. (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Ao meio da reação são acrescentados 2,2-azobis e luminol. Os radicais livres liberados pelo 2,2-azobis provocam oxidação de lipídios e proteínas. O luminol reage com esses radicais livres produzindo quimiluminescência. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (Ti) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP) até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema é calibrado com análogos da vitamina E (Trolox). Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permitem obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox. Os resultados foram expressos em μM de Trolox, sendo que os valores obtidos foram divididos pelo valor do ácido úrico plasmático de cada paciente para corrigir a influência do ácido úrico elevado sobre o TRAP. O experimento foi conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando um modelo de contagem não coincidente por 30 segundos, com uma faixa de resposta entre 300 e 620 nM. o TRAP utilizando o cintilador Beckman® (Fullerton, CA, EUA) modelo LS 6000. A técnica e os reagentes foram descritos no anexo D.

3.7.2 Determinação do Malondialdeído (MDA)

Para estimativa da peroxidação lipídica, foi dosado um de seus produtos, o malondialdeído no soro, utilizando a técnica descrita por Bastos e colaboradores. (2012). O princípio da técnica é baseado na complexação do MDA presente no soro com o TBA (ácido tiobarbitúrico) à temperatura de 90°C o que permite uma estimativa mais específica do MDA, com um produto estável, especialmente se combinado com a separação usando a CLAE Shimadzu, modelo LC10-AD, Kyoto, Japão; com válvula de injeção Rheodyne, loop 20 μL , Califórnia, EUA; detector UV-Vis Waters, modelo 2487 dual absorbance Miliford,

Massachusetts, EUA. A coluna utilizada foi a Microsorb MV 100-5 C18, Palo Alto, Califórnia, EUA. Os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína e a técnica e reagentes estão descritos no anexo E.

3.7.3 Determinação do Óxido Nítrico (NO)

A estimativa do NO foi avaliada através da determinação da concentração de metabólitos do óxido nítrico (NOx) sérico. Utilizou-se uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzálves e colaboradores. (1998) para microplacas. O princípio da técnica está baseado na redução dos íons nitratos em íons nitrito, os quais são quantificados ao formar um complexo colorido com o reagente de Griess. Os resultados foram expressos em μM utilizado espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Técnica e reagentes descritos no anexo F.

3.7.4 Quantificação de produtos avançados da oxidação de proteínas (Advanced Oxidation Protein Products: AOPP)

Para quantificação dos AOPP no plasma foi utilizada uma adaptação da técnica descrita por Witko-Sarsat e colaboradores. (1998). A técnica é baseada na formação de produtos de oxidação de proteínas por ação de agentes oxidantes e posterior reação destes produtos de oxidação com o iodeto de potássio em meio ácido. Os AOPP foram quantificados no soro e os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{L}$. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro termostaticado de duplo feixe (Thermo Spectronic[®] modelo Hélios- α , Waltham, MA, EUA). A técnica e os reagentes foram descritos no anexo G.

3.7.5 Quimiluminescência (QL) Induzida por t-Butil Hidroperóxido

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha e colaboradores. (1991). A QL estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no soro. Este teste baseia-se na premissa de que um

aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E e formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento da emissão de fótons (18-20). Foi utilizado um contador β marca Backman® (EUA) modelo LS 6000 contendo um modelo de contagem não coincidente por 30 segundos, com uma faixa de resposta entre 300 e 620 nM. As análises foram efetuadas em frascos de plástico para a cintilação e protegidos da luz. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm). Técnicas e reagentes descritos no anexo H.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis categóricas foram relatadas usando o número e porcentagem de observações e as variáveis contínuas foram expressas em medianas e intervalos interquartílicos (25%-75%), pois os dados não apresentaram distribuição gaussiana. Nas avaliações comparativas entre os grupos foram utilizados os testes do qui-quadrado (χ^2) para variáveis categóricas e os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para as variáveis contínuas. Correlações entre duas variáveis foram testadas pelos coeficientes de correlação de Spearman, pois a distribuição dos dados foram não-normais. Valores de P foram considerados significativos quando menores que 0,05. A análise estatística foi realizada pelo software SPSS versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos no artigo científico descrito a seguir.

Níveis séricos de vitamina D e de marcadores de estresse oxidativo em pacientes com doença renal crônica não dialítica

Paula Godeny¹, Abel Esteves Soares², Vinicius Daher Alvares Delfino^{3*}, Décio Sabbatini Barbosa⁴

RESUMO

A vitamina D deixou de ser vista apenas como importante para o metabolismo ósseo normal e a sua deficiência, atualmente, é considerada estar associada a outras condições clínicas, incluindo-se nestas, aumento do risco cardiovascular e aumento do estresse oxidativo. Pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentam prevalência elevada de hipovitaminose D e índices de mortalidade cardiovascular maiores que os da população geral. O objetivo deste estudo foi verificar possível associação entre a deficiência de vitamina D -25(OH)D- e de alguns marcadores de estresse oxidativo em pacientes com DRC nos estágios 3, 4 e 5 (não dialítico). Estudo transversal envolvendo 158 pacientes com DRC nos quais foram avaliados os níveis da vitamina D e os marcadores de estresse oxidativo (MDA, hidroperóxido, AOPP, NOx e TRAP). Os pacientes foram separados em grupos conforme os níveis da vitamina D (deficiente: <15ng/mL; insuficiente: entre 15 e 30ng/mL e adequado: >30ng/mL) Não foram encontradas diferenças em relação aos marcadores de estresse oxidativo utilizados, PCR, fibrinogênio, IMC e circunferência abdominal entre os 3 grupos analisados. Também não foi encontrada correlação entre os valores de vitamina D e marcadores de estresse oxidativo, de inflamação (PCR e fibrinogênio) e com medidas antropométricas. Mais estudos são necessários para verificar se baixos níveis de vitamina D desempenham um papel significativo na gênese multifatorial do estresse oxidativo do paciente renal crônico.

Palavras-chave: Insuficiência renal crônica. Vitamina D. Deficiência de vitamina D. Estresse oxidativo.

¹ Programa de Pós-graduação, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina

² Professor, Mestre, Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Nefrologia, Universidade Estadual de Londrina

³ Professor Doutor, Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Nefrologia, Universidade Estadual de Londrina

⁴ Professor Doutor, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina.

* Autor Correspondente: Vinicius Daher Alvares Delfino

Endereço: Departamento de Clínica Médica. Rua Robert Koch, 60 Bairro Cervejaria, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86038-440

E-mail: vddelfino@sercomtel.com.br

ABSTRACT

Vitamin D is no longer seen as important only for normal bone metabolism and its deficiency is currently considered to be associated with other medical conditions, including increased cardiovascular risk and increased oxidative stress. Patients with chronic kidney disease (CKD) have a high prevalence of hypovitaminosis D and have cardiovascular mortality rates that are higher than the seen in general population. The objective of this study was to investigate a possible association between vitamin D -25 (OH) D- deficiency and some markers of oxidative stress in patients with CKD stages 3, 4 and 5 (not dialysis). It was a cross-sectional study involving 158 patients with CKD in which the levels vitamin D and markers of oxidative stress (MDA, hydroperoxide, AOPP, NOx and TRAP) were evaluated. Patients were divided into groups according to levels of vitamin D (deficient: <15ng/mL; insufficient: between 15 and 30ng/mL and appropriate: > 30ng/mL). No differences were found in relation to oxidative stress markers used, CRP, fibrinogen, BMI and waist circumference among the three groups. There was also no correlation between the amounts of vitamin D and markers of oxidative stress, inflammation (CRP and fibrinogen), and anthropometric measurements. More studies are needed to determine whether low levels of vitamin D play a significant role in the multifactorial genesis of oxidative stress in chronic renal patients.

Keywords: Chronic renal insufficiency . Vitamin D. Vitamin D deficiency. Oxidative stress.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a vitamina D (vit D) deixou de ser vista apenas como um hormônio essencial no metabolismo ósseo, cuja deficiência promove aparecimento de raquitismo em crianças e osteopenia, osteoporose e osteomalácia em adultos (Holick, 2007), passando a ser associada a diversas condições clínicas como, por exemplo, hiperparatireoidismo secundário, doenças autoimunes (Cantorna e colaboradores, 2000), alguns tipos de cânceres (Grant, 2012), diabetes mellitus (Hypponen e colaboradores, 2001), risco cardiovascular aumentado (Kilkinen e colaboradores, 2009; Judd & Tangpricha, 2009) e progressão mais rápida da doença renal crônica (Ravani e colaboradores, 2009; Melamed e colaboradores, 2009).

A prevalência de deficiência de vit D é bastante elevada em indivíduos com doença renal crônica (DRC). Além disto, pacientes renais crônicos apresentam redução dos níveis séricos da forma mais ativa da vit D, a 1,25(OH)₂D,

uma vez que a ativação final desta vitamina ocorre no parênquima renal e se reduz à medida que a DRC progride (Levin e colaboradores, 2007).

Na prática médica, os níveis séricos de 25(OH)D são utilizados para definir deficiência de vit D. Embora não haja consenso sobre quais valores séricos definem insuficiência e deficiência de vit D na população geral, no paciente renal crônico as diretrizes sobre manejo do metabolismo e doença óssea na DRC do *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI, 2003) consideram que valores maiores que 30ng/mL são adequados, entre 15 e 30ng/mL insuficientes e menores que 15ng/mL deficientes. Existem diferenças entre as diretrizes sugeridas pelo *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) e pelo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) com relação ao metabolismo mineral e ósseo na DRC.

Pacientes com DRC apresentam mortalidade cardiovascular muitas vezes elevada quando comparados à população geral (Sesso e colaboradores, 2008; Rucker & Tonelli, 2009). Obviamente a razão desta alta mortalidade cardiovascular é de natureza multifatorial, incluindo concentração de fatores de risco cardiovascular tradicionais e os próprios da uremia (não tradicionais). Dentre os fatores de risco cardiovascular próprios da uremia incluem-se: inflamação sistêmica, estresse oxidativo aumentado e alterações do metabolismo mineral (cálcio e fósforo) e ósseo.

Evidências recentes sugerem que a deficiência de vit D pode contribuir para a inflamação sistêmica e para o aumento do estresse oxidativo, e que a sua reposição agiria de forma a atenuar estes dois parâmetros. Schleithoff e colaboradores (2006) demonstraram que a suplementação de vit D diminuiu níveis de biomarcadores inflamatórios como o TNF- α e aumentou a concentração de citocinas antiinflamatórias (IL-10) em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. Tarcin e colaboradores. (2009) demonstraram que a suplementação de vit D melhorou a disfunção endotelial e reduziu os níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), marcador da peroxidação lipídica, em indivíduos assintomáticos.

O objetivo deste estudo foi verificar possível associação entre a deficiência da 25-hidroxivitamina D e alguns marcadores de estresse oxidativo em pacientes com DRC nos estágios 3, 4 e 5 (não dialítico).

PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aceito pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina. Todos os pacientes que participaram dele assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido antes da realização de qualquer procedimento.

O estudo foi de natureza transversal e envolveu pacientes com DRC estágios 3, 4 e 5 (não-dialítico), como definidos pela *National Kidney Foundation* (NKF; Estados Unidos) e Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN - Romão, 2004), acompanhados nos Ambulatórios de DRC da disciplina de Nefrologia da Universidade Estadual de Londrina e do Instituto do Rim de Londrina, Paraná, Brasil. Por esta classificação, o estágio 3 compreende pacientes com Taxa de Filtração Glomerular estimada (TFGe) ≥ 30 e < 60 mL/min/1,73 m², o estágio 4 pacientes com TFGe ≥ 15 e < 30 mL/min/1,73 m² e estágio 5 pacientes com TFG < 15 mL/min/1,73 m².

Os critérios de elegibilidade dos pacientes ao estudo foram idade superior a 18 anos e TFGe < 60 mL/min/1,73 m². Utilizou-se a equação simplificada do estudo MDRD, com anotação de etnia afrodescendente para os que assim se autodenominaram, para a obtenção da TFGe (Levey e colaboradores, 2000). Constituíram-se critérios de exclusão: pacientes já em diálise ou receptores de transplante renal, com antecedente de cirurgia de *bypass* intestinal ou história de enterectomia prévia, com história de doença intestinal de má absorção ou de cirrose, com doença infecciosa ou maligna ativas, apresentando perda inexplicada de mais de 5% do peso corporal nos últimos 6 meses, uso de corticosteroides, de medicações que interferissem com o metabolismo de vit D ou qualquer forma de suplementação de vit D.

Foram incluídos no estudo 158 pacientes, os quais foram submetidos à consulta médica que consistiu de história pregressa, exame físico e coleta de dados pertinentes aos objetivos do estudo, tais como sexo, idade, raça/cor (por auto-definição), tabagismo, presença de hipertensão, de diabetes e medicamentos em uso. Na ocasião da consulta médica foram aferidos os pesos (Kg) em balança digital (Filizola), as estaturas (m) e a partir destes dados calculados os Índices de Massa Corporal (IMC: peso/altura²), sendo a obesidade classificada segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1995). A circunferência abdominal

foi medida com fita métrica não extensível ao nível da cicatriz umbilical, com os pacientes usando roupas leves, em pé, com os braços ao lado do corpo e ao final da expiração, sendo os resultados aproximados para o centímetro mais próximo.

Os exames laboratoriais pertinentes ao estudo em questão [25(OH)D e 1,25-(OH)₂D, marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo] foram adicionados aos exames rotineiramente solicitados pelo nefrologista responsável, dentre eles creatinina, albumina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, PTHi, glicemia, hemoglobina, ácido úrico, colesterol total, LDL, HDL e triglicérides. As amostras de sangue dos pacientes, aproximadamente 40 mL, foram obtidas por punção venosa, em tubos a vácuo (Vacutainer[®], Franklin Lakes, NJ USA), após 12 horas de jejum, sendo estes destinados à obtenção de plasma e soro, conforme a necessidade do exame a ser realizado. Os exames de rotina foram feitos logo após a coleta do sangue, enquanto que as amostras destinadas aos testes de estresse oxidativo foram centrifugadas a 3000 rpm (2100 x g) por 15 minutos (centrífuga CELM[®], Barueri, SP, Brasil), e os soros obtidos armazenados em freezer a -80°C (Indrel[®] 70 R Londrina, Paraná, Brasil) até a sua realização. Para a determinação da relação proteinúria/creatinúria (mg de proteína dividido por g de creatinina) foram utilizadas amostras isoladas de urina coletadas no período da manhã.

Para a dosagem da vit D, as amostras de soro foram encaminhadas ao Laboratório Álvaro na cidade de Cascavel, Paraná, onde a 25(OH)D foi dosada por Quimioluminescência (QL) e a 1,25(OH)₂D por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Marcadores de Defesa Antioxidante e de Estresse Oxidativo

TRAP: a Capacidade Antioxidante Total Plasmática foi avaliada por quimiluminescência (QL) em uma adaptação da técnica descrita por Repetto e colaboradores. (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Os radicais livres liberados pelo 2,2-azobis provocam oxidação de lipídios e proteínas e o luminol reage com esses radicais livres produzindo quimiluminescência. O sistema é calibrado com um análogo da vitamina E (TROLOX). Os valores da TRAP foram expressos em µM de trolox e corrigidos pelos valores do ácido úrico desses pacientes.

Malondialdeído (MDA): O MDA foi mensurado no soro utilizando a técnica descrita por Bastos, e colaboradores, (2012), em que o MDA se complexa com o TBA (ácido tiobarbitúrico) formando um complexo estável que é separado pela CLAE (Shimadzu, modelo LC10-AD, Kyoto, Japão). A coluna utilizada foi a Microsorb MV 100-5 C18, Palo Alto, Califórnia, EUA, e os resultados foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína.

Hidroperóxidos lipídicos (CL-LOOH): A dosagem de lipoperóxidos foi feita por uma adaptação da técnica descrita por Flecha e colaboradores (1991) em que a QL estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no soro. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (cpm).

NOx (metabólitos do óxido nítrico): A estimativa do NO foi avaliada através da determinação da concentração de NOx sérico. Foi utilizada uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzálves e colaboradores (1998) para microplacas. A concentração de nitritos foi determinada pela reação de Griess em $\mu\text{mol}/\text{L}$.

AOPP: Para quantificar os produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP) foi utilizada uma adaptação da técnica descrita por Witko-Sarsat e colaboradores (1998). A concentração de AOPP foi expressa em $\mu\text{moles}/\text{L}$ de equivalente de cloramina T.

Análise Estatística

Variáveis categóricas foram relatadas usando o número e porcentagem de observações e as variáveis contínuas foram expressas em medianas e intervalos interquartílicos (25%-75%), pois os dados não apresentaram distribuição gaussiana. Nas avaliações comparativas entre os grupos foram utilizados os testes do qui-quadrado (χ^2) para variáveis categóricas e teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Walis, para as variáveis contínuas. Correlações entre duas variáveis foram testadas pelos coeficientes de correlação de Spearman, pois a

distribuição dos dados não apresentou distribuição normal. Valores de P foram considerados significativos quando menores que 0,05. A análise estatística foi realizada pelo software SPSS versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

As características gerais analisadas dos pacientes com DRC participantes do estudo estão representadas na tabela 1. Foram avaliados 158 pacientes, 104 (58,82%) do sexo masculino, com idades entre 21 e 91 anos, sendo que dezesseis (10,1%) eram da raça negra. Dentre os pacientes, 149 (94,3%) eram hipertensos e 58 (36,7%) tinham diabetes. De acordo com a classificação do KDOQI para o estágio da DRC, 114 (72,15%) pacientes estavam no estágio 3, 38 (24,05%) no estágio 4 e 6 (3,8%) no estágio 5 não dialítico. Cento e cinco pacientes (67,3%) apresentavam IMC > 30 e foram considerados obesos. Quanto à estação do ano em que foram coletadas as amostras de sangue, 94 indivíduos foram durante o inverno ou primavera e 64 durante o verão ou outono.

A tabela 2. apresenta as diferenças relativas ao gênero, nos exames laboratoriais realizados e nas TFGs entre os participantes do estudo. As frequências dos níveis séricos de 25(OH) dos pacientes estudados encontram-se representadas no gráfico 1. O gráfico 2 apresenta a prevalência de deficiência/insuficiência de vit D de acordo com as diretrizes do KDOQI (2003).

As medidas antropométricas dos pacientes, em função dos níveis séricos de vit D categorizados de acordo com as diretrizes do KDOQI (2003), são apresentadas na tabela 3. Nenhuma das medidas antropométricas analisadas (peso, altura, IMC e CA) diferiram entre os grupos categorizados segundo os valores da vit D.

Os valores obtidos dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, categorizados em conformidade com as diretrizes do KDOQI (2003), foram descritos na tabela 4. Os resultados obtidos tanto para os marcadores inflamatórios (PCR e fibrinogênio) quanto para os de estresse oxidativo (TRAP, MDA, NO, AOPP e hidroperóxido) não diferiram entre os grupos separados pelos níveis de vit D.

A tabela 5 apresenta os coeficientes de correlação de Spearman entre os valores séricos de 25(OH)D, de 1,25(OH)₂D e as variáveis testadas cujos resultados mostraram-se estatisticamente significativos. Foram ainda verificadas

possíveis correlações entre os níveis séricos de vit D e medidas antropométricas masculinas e femininas (IMC e circunferência abdominal), marcadores de estresse oxidativo (MDA, hidroperóxidos, AOPP, Nox e TRAP) e de inflamação (PCR e fibrinogênio), mas não foram encontradas correlações estatisticamente significativas.

Na figura 3 estão apresentadas a percentagem de pacientes com níveis de PTHi acima, dentro e abaixo dos valores sugeridos pelo KDOQI (2003) nos estágios 3, 4 e 5 (não dialítico), e como se encontravam distribuídos os níveis séricos de vit D frente a esses valores de PTHi. Aproximadamente 80% dos pacientes no estágio 3 da DRC e 85% dos pacientes no estágio 4 da DRC apresentavam PTHi acima dos valores-alvo sugeridos. A vit D encontrava-se insuficiente/deficiente em aproximadamente 50% e 80% dos pacientes com DRC 3 e 4, respectivamente, onde o nível de PTHi encontrava-se acima do proposto pelo KDOQI 2003. Dos pacientes com PTHi dentro do alvo proposto, a vit D encontrava-se insuficiente/deficiente em 35% dos pacientes com DRC 3 e 60% daqueles com DRC 4. Dos 5 pacientes onde o PTHi encontrava-se abaixo do alvo proposto, 4 estavam no estágio 3 da doença e 1 no estágio 4, e destes, 1 de cada estágio tinham níveis inadequados de vit D. Referente aos 6 pacientes com DRC 5, três deles encontravam-se com o PTHi dentro do alvo e os outros 3 com PTHi acima do alvo. A vit D estava insuficiente/deficiente nestes 6 pacientes.

Tabela 1 - Características gerais (clínicas e demográficas) dos pacientes estudados.

| | Total (n=158) | Feminino (n=54) | Masculino (n=104) | P= |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------|
| Gênero (%) | | 34,2 | 65,8 | <0,001 |
| Idade (anos) (mediana, IIQ*) | 68,0 (61,25 – 77) | 66 (58 – 75) | 69,5 (62 – 77,5) | 0,115 |
| Raça, n, (%) | | | | |
| negra | 16 (10,1) | 7 (43,8) | 9 (56,3) | 0,394 |
| Não negra | 142 (89,9) | 47 (33,1) | 95 (66,9) | |
| Estágio DRC, n, (%) | | | | |
| 3 (60 < TFG > 30) | 114 (72,15) | 34 (29,8) | 80 (70,2) | 0,089 |
| 4 (30 < TFG > 15) | 38 (24,05) | 16 (42,1) | 22 (57,9) | |
| 5 (TFG < 15) | 6 (3,8) | 4 (66,7) | 2 (33,3) | |
| Diabéticos, n, (%) | | | | |
| Sim | 58 (36,7) | 23 (39,7) | 35 (60,3) | 0,269 |
| Não | 100 (63,3) | 31 (31) | 69 (69) | |
| Hipertensos, n, (%) | | | | |
| Sim | 149 (94,3) | 50 (33,6) | 99 (66,4) | 0,504 |
| Não | 9 (5,7%) | 4 (44,4) | 5 (55,6) | |
| Uso IECA, n, (%) | | | | |
| Sim | 39 (24,7) | 17 (43,6) | 22 (56,4) | 0,153 |
| Não | 119 (75,3) | 37 (31,1) | 82 (68,9) | |
| Uso BRA, n, (%) | | | | |
| Sim | 19 (12) | 7 (36,8) | 12 (63,2) | 0,794 |
| Não | 139 (88) | 47 (33,8) | 92 (66,2) | |
| Obesos, n, (%) | | | | |
| Sim | 105 (67,3%) | 33 (31,4) | 72 (63,2) | 0,563 |
| Não | 51 (32,7%) | 20 (39,2) | 3 (60,8) | |
| Tabagistas, n, (%) | | | | |
| Sim | 20 (12,7) | 4 (20) | 16 (80) | 0,147 |
| Não | 138 (87,3) | 50 (36,5) | 88 (64,5) | |
| Uso Estatina, n, (%) | | | | |
| Sim | 96 (60,8) | 39 (40,6) | 57 (59,4) | 0,033 |
| Não | 62 (39,2) | 15 (24,2) | 47 (75,8) | |
| Coleta sangue, n, (%) | | | | |
| Inverno/primavera | 94 (59,5) | 26 (40,6) | 38 (59,4) | |
| Verão/outono | 64 (40,5) | 28 (29,8) | 66 (70,2) | 0,159 |

*IIQ: intervalo interquartilico; DRC: Doença Renal Crônica; BRA: Medicamentos bloqueadores dos receptores da angiotensina II; IECA: medicamentos inibidores da enzima conversora de angiotensina.

Tabela 2 -Diferenças relativas ao gênero nos exames laboratoriais realizados e nas TFGe entre os participantes do estudo

| | Total (n=158) | Feminino (n=54) | Masculino (n=104) | P= |
|---|-------------------------|------------------------|--------------------------|-----------|
| 25(OH)D (ng/mL) | 26,25 (18,55 – 35,10) | 23,65 (17,2 – 32,5) | 27,55 (19,55 – 35,55) | 0,081 |
| 1,25(OH)₂D (pg/mL) | 26,35 (22,37 – 29,80) | 24,85 (21,8 – 29,1) | 26,885 (22,95 – 30,0) | 0,117 |
| Creatinina (mg/dL) | 1,81 (1,52 – 2,30) | 1,67 (1,37 – 2,31) | 1,89 (1,62 – 2,27) | 0,026 |
| TFGe (mL/min/1,73 m²) | 37,11 (28,83 – 45,88) | 32,56 (22,25 – 45,01) | 39,33 (32,15 – 46,0) | 0,074 |
| Albumina (g/dL) | 4,03 (3,81 – 4,29) | 3,980 (3,730 – 4,190) | 4,050 (3,865 – 4,340) | 0,038 |
| Cálcio (mg/dL) | 8,5 (8,08 – 8,80) | 8,49 (8,08 – 8,77) | 8,51 (8,09 – 8,82) | 0,833 |
| Fósforo (mg/dL) | 3,7 (3,2 – 4,16) | 4 (3,4 – 4,5) | 3,5 (3,1 – 3,9) | <0,001 |
| Fosfatase Alcalina (U/L) | 98,50 (79 – 117) | 106,5 (91 – 131) | 90 (74,5 – 110) | 0,001 |
| PTHi (pg/mL) | 138,55 (88,22 – 192,42) | 162,4 (96,6 – 249) | 126,9 (86,45 – 176,1) | 0,050 |
| Glicemia (mg/dL) | 102,5 (94-115) | 103 (90 – 121,5) | 102,5 (95,25 – 113,75) | 0,561 |
| Hemoglobina (g/dL) | 13,7 (12,8 – 14,9) | 13,2 (12,2 – 13,7) | 14,35 (12,95 – 15,15) | <0,001 |
| Ácido úrico (mg/dL) | 6,83 (5,82 – 7,99) | 6,53 (5,43 – 7,25) | 7,05 (6,02 – 8,03) | 0,038 |
| Colesterol total (mg/dL) | 179,5 (148 – 211) | 178,5 (160,5 – 217,5) | 175 (141 – 202) | 0,129 |
| LDL (mg/dL) | 100 (81 – 131) | 102,5 (86 – 137) | 98,5 (76,5 – 129,5) | 0,239 |
| HDL (mg/dL) | 42,0 (35,0 – 49,0) | 45,5 (40 – 50,5) | 41 (32,5 – 48) | 0,006 |
| Triglicérides (mg/dL) | 131,5 (96,0 – 198,5) | 134 (101,5 – 198,5) | 130 (91,5 – 183,5) | 0,802 |
| Relação Proteinúria/creatinúria (mg/g) | 0,25 (0,12 – 0,81) | 0,26 (0,14 – 0,81) | 0,25 (0,11 – 0,88) | 0,554 |

25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; 1,25(OH)₂D: 1,25-dihidroxivitamina D; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; PTH: paratormônio; LDL: lipoproteína de baixa densidade, HDL: lipoproteína de alta densidade. (Intervalos interquartílicos)

Tabela 3 -Medidas antropométricas dos pacientes, em função dos níveis séricos de vitamina D.

| Variáveis | Total (n=158) | Vit D≥30 (n=65) | 30<Vit D≤15 (n=73) | Vit D<15 (n=20) | P= |
|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| Peso (Kg) | 75 (67,5 – 87,9) | 74,4 (66,65 – 89,07) | 76,5 (68,9 – 88,2) | 73 (68 – 84) | 0,812 |
| Altura (m) | 1,65 (1,58 – 1,71) | 1,67 (1,62 – 1,73) | 1,65 (1,56 – 1,72) | 1,63 (1,54 – 1,68) | 0,108 |
| IMC (kg/m²) | 27,5 (24,74 – 31,47) | 26,93 (24,04 (31,40) | 27,64 (25,31 – 31,31) | 27,17 (25,59 – 32,24) | 0,803 |
| CA (cm) | 103 (95 – 111) | 102 (94 – 111,5) | 102,5 (95 - 111) | 103 (95 - 108) | 0,935 |

IMC: Índice de massa corporal; CA: circunferência abdominal (Intervalos interquartílicos)

Tabela 4 -Valores séricos dos marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo entre os grupos classificados pelo valor da 25(OH)D (intervalos interquartílicos).

| Variáveis | TOTAL (n=158) | Vit D≥30 (n=65) | 30 < Vit D ≥ 15 (n=73) | Vit D <15 (n=20) | P= |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| PCR (mg/L) | 3,36 (1,35 – 7,0) | 2,47 (1,23 – 6,90) | 3,38 (1,32 – 6,73) | 4,19 (2,53 – 8,74) | 0,121 |
| Fibrinogênio (mg/dL) | 389 (345 – 443) | 385 (336 – 430) | 400,5 (353 – 457) | 397 (345 – 495) | 0,437 |
| TRAP (µM de trolox) | 131,93 (111,47 – 150,30) | 131,45 (108,80 – 149,11) | 131,80 (111,47 – 152,85) | 134,66 (111,67 – 156,25) | 0,961 |
| MDA (µM/g de proteína) | 52,33 (46,25 – 60,97) | 54,37 (47,26 – 61,49) | 51,72 (46,34 – 59,25) | 48,51 (42,65 – 59,92) | 0,323 |
| NOx (µmol/L) | 7,36 (5,19 – 10,8) | 7,44 (5,58 – 11,33) | 7,05 (5,05 – 10,65) | 7,76 (5,51 – 9,88) | 0,709 |
| AOPP (µmol/L) | 97,5 (84 – 122) | 95,49 (85 – 120) | 98,4 (83,58 – 122) | 107,25 (89,4 – 157,8) | 0,490 |
| Hidroperóxidos (cpm) | 36009 (25422 – 54717) | 36845 (26779 - 58075) | 33969 (23846 – 53777) | 39708 (24714 – 54717) | 0,623 |

PCR: Proteína C Reativa; TRAP corrigido: TRAP: Capacidade antioxidante Total Plasmática dividida pelo valor do ácido úrico sérico ; MDA: Malondialdeído; NO: Óxido Nítrico; AOPP: Produto da Oxidação Avançada de Proteínas. (Intervalos interquartílicos)

Tabela 5 -Correlações de Spearman estatisticamente significativas entre as variáveis analisadas no estudo e os valores de 25(OH)D ou 1,25(OH)₂D.

| Variáveis | Correlação (r) | Valor de p |
|--|----------------|------------|
| 25(OH)D x 1,25(OH) ₂ D | 0,518 | <0,0001 |
| 25(OH)D x TFGe | 0,263 | 0,0001 |
| 1,25(OH) ₂ D x TFGe | 0,253 | 0,0001 |
| 25(OH)D x PTHi | -0,214 | 0,007 |
| 25(OH)D x Relação proteinúria/creatinúria | -0,223 | 0,005 |
| 25(OH)D x Albumina | 0,265 | 0,001 |

25(OH)D: 25-hidroxivitamina D; 1,25(OH)₂D: 1,25-dihidroxivitamina D; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; PTH: paratormônio

Gráfico 1 - Frequências dos níveis séricos de 25(OH)D, em ng/mL, nos pacientes estudados.

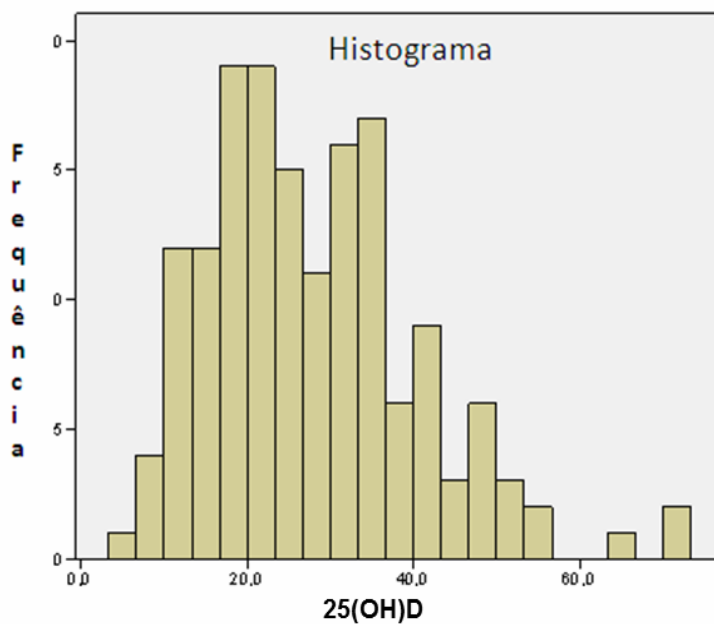


Gráfico 2 - Prevalência de deficiência/insuficiência de vitamina D de acordo com as diretrizes do KDOQI 2003. Deficiente: 25(OH)D<15ng/mL; Insuficiente: Vit D 15-30ng/mL; Suficiente: 25(OH)D>30ng/dL.

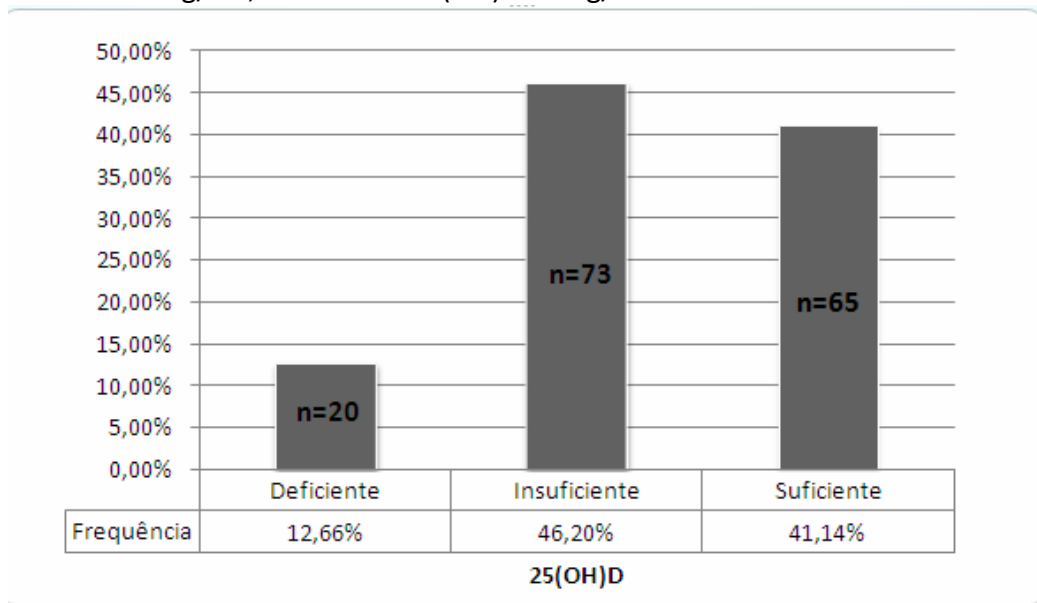
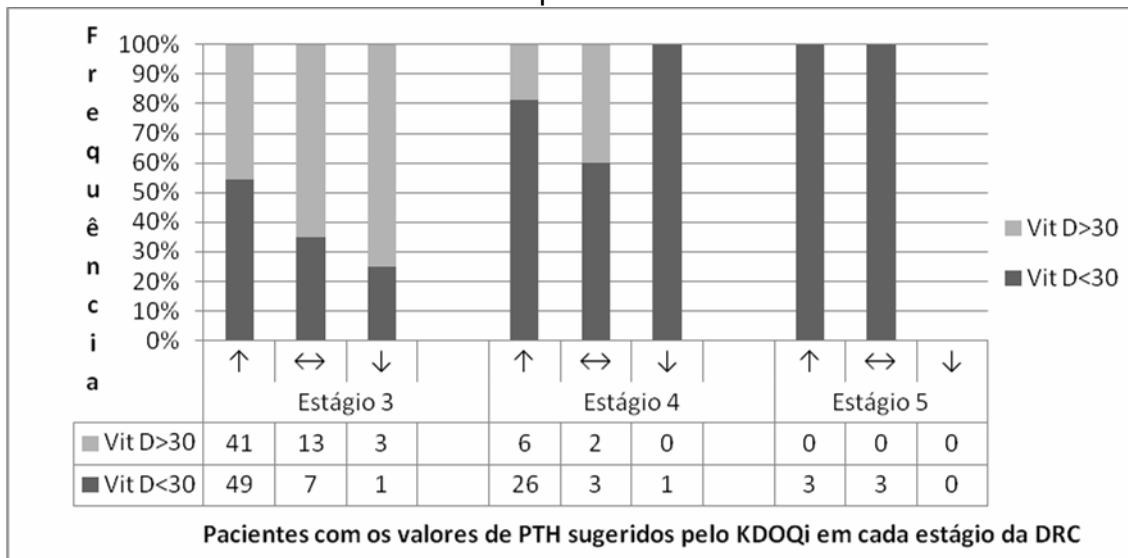


Gráfico 3 - Percentagem de pacientes com valores de PTHi (pg/mL) sérico acima, dentro e abaixo dos níveis sugeridos pelo KDOQI (2003) e percentagem de vitamina D sérica adequada



(25(OH)D>30ng/mL) e inadequada (25(OH)D <30ng/mL) dentro dos 3 grupos de PTHi, nos estágios 3-5 (não dialítico) da DRC. Alvos de PTHi: Estágio 3: 35<PTHi<70 pg/mL; Estágio 4: 70<PTHi<110 pg/mL; Estágio 5: 200<PTHi<300 pg/mL.

↑ acima do alvo de PTHi; ↔ no alvo sugerido; ↓ abaixo do alvo.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi encontrada uma alta prevalência de hipovitaminose D entre indivíduos renais crônicos não dialíticos (58,90% dos pacientes estudados encontravam-se com os níveis séricos de vit D insuficientes ou deficientes, gráfico 2). O principal objetivo deste estudo foi avaliar uma possível relação entre níveis reduzidos de vit D e estresse oxidativo aumentado em pacientes com DRC estágios 3-5 (não dialítico). Para tal, foram utilizados biomarcadores do estresse oxidativo direcionados contra membranas lipídicas (MDA e hidroperóxidos), contra óxido nítrico (NOx) e contra proteínas (AOPP). A determinação da TRAP foi utilizada para estimar a capacidade antioxidante do plasma.

Neste estudo, não houve associação significativa entre os níveis séricos de vit D e os biomarcadores de estresse oxidativo utilizados nos pacientes. No melhor do nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho a avaliar a existência de correlação entre níveis baixos de vit D e marcadores de estresse oxidativo aumentados em pacientes renais crônicos não dialíticos.

Referente ao possível papel da deficiência da vit D sobre o estresse oxidativo, Jablonski e colaboradores (2010), verificando a relação entre deficiência de vit D e disfunção endotelial em indivíduos de meia-idade e idosos, também não encontraram diferença no marcador de modificação oxidativa dos lipídios (LDL oxidada) nem na defesa antioxidante total (TAS, *total antioxidant status*) entre indivíduos nos diferentes estágios de vit D: suficiente (≥ 30 ng/mL), insuficiente (20-29 ng/mL) e deficiente (< 20 ng/mL). Em outro estudo, Tarcin e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da vit D sobre a disfunção endotelial de indivíduos assintomáticos, e não encontraram diferença nos níveis séricos basais de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – sendo o MDA um deles), marcador de peroxidação lipídica, entre o grupo de pacientes assintomáticos (com disfunção endotelial) e seus controles, mas observaram que após a suplementação de vit D, os níveis de TBARS reduziram-se significativamente. De maneira semelhante, Tanaka e colaboradores (2011) e Wu e colaboradores (2011) documentaram que o tratamento com calcitriol reduziu a inflamação e o estresse oxidativo em pacientes renais crônicos tratados por hemodiálise.

Foi observado que os níveis de vit D correlacionaram-se, de maneira estatisticamente significativa, positivamente com a TFGe e com a albumina sérica e

negativamente com os níveis de PTHi e relação proteinúria/creatinúria. A correlação positiva entre vit D e TFG_e pode indicar que ocorra redução nos níveis séricos de vit D com a progressão da DRC. A correlação positiva entre níveis séricos de vit D e albumina sérica pode sugerir que exista uma deficiência nutricional comum para estas duas substâncias. Como o estudo, no entanto, não avaliou outros parâmetros nutricionais, esta possibilidade não pode ser verificada. Uma explicação alternativa para menores níveis de albumina nos indivíduos com menores níveis séricos de vit D seria a presença de inflamação aumentada nos mesmos, funcionando a albumina como uma proteína negativa de fase aguda.

No presente estudo não encontramos correlação entre níveis de vit D e os valores de fibrinogênio, porém, houve uma tendência de maiores medianas de PCR nos grupos insuficientes e deficientes de vit D. A correlação inversa verificada entre vit D e relação proteinúria/creatinúria, mesmo que pequena, pode refletir perda urinária da vit D, uma vez que ela circula no plasma ligada à proteínas transportadoras de vit D e à albumina. A correlação inversa observada entre vit D e PTHi implica que a vit D contribui para o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário nos pacientes estudados.

Na população geral, a obesidade é uma condição associada a baixos níveis de vit D circulante. Dentre as explicações para este achado incluem-se: deposição da vit D nos adipócitos (Worstman e colaboradores, 2000); deficiência alimentar (Rajakumar, 2003) e aumento da conversão de 25(OH)D para 1,25(OH)D (Parikh, 2004). Em renais crônicos não dialíticos há pouca informação sobre esta associação, Figueredo-Dias e colaboradores (2012) mostraram que a prevalência de deficiência de vit D é maior entre pacientes com DRC que apresentem IMC > 30 Kg/m² e Diniz e colaboradores (2012) encontraram correlação inversa entre circunferência abdominal e níveis de vit D, também em renais crônicos não dialíticos. No presente estudo, não foram encontradas correlações entre níveis séricos de vit D e IMC e nem entre os valores de vit D e circunferência abdominal (uma estimativa da obesidade visceral), quer entre homens, quer entre mulheres. Uma limitação neste estudo seria que a DEXA (*dual energy x-ray absorptiometry*) não foi utilizada para a avaliação da gordura visceral.

Os resultados deste trabalho indicam que o rastreamento da deficiência de vit D em pacientes com DRC 3 e 4, como sugerido pelo KDOQI 2003, deixa de fora o diagnóstico de insuficiência/deficiência de vit D em um número

considerável de pacientes uma vez que em 7 (35%) dos 20 pacientes com DRC 3 e três (60%) dos 5 pacientes com DRC 4 com níveis de PTHi considerados adequados apresentavam níveis inadequadamente baixos de vit D. Mesmo entre os pacientes com níveis de PTHi abaixo dos sugeridos, em 1 (dos 4) com DRC 3, e no paciente com DRC 4 os níveis de vit D estavam baixos. O KDOQI 2003 não recomenda a pesquisa de deficiência de vit D em pacientes no estágio 5 da DRC mas todos os 6 pacientes neste estágio da doença apresentavam níveis inadequadamente baixos de vit D (3 destes com PTHi dentro do alvo terapêutico; outros 3 com PTHi acima do alvo terapêutico). Os dados do presente estudo sugerem que a abordagem sugerida pelo KDIGO (2009) de rastrear e tratar a deficiência de vit D em todos os pacientes com DRC estágios 3-5 parece ser uma abordagem mais adequada.

No melhor do nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que explorou a possibilidade da existência de associação entre níveis de séricos de vitamina D e estresse oxidativo em pacientes com DRC não dialítica. Os resultados negativos deste estudo devem ser vistos à luz das limitações metodológicas nele existentes como, por exemplo, um número relativamente pequeno de pacientes e de marcadores de estresse oxidativo avaliados. Novos estudos são necessários para se verificar um possível papel da deficiência de vit D na gênese multifatorial do estresse oxidativo do paciente renal crônico.

Em resumo, embora avaliando um número relativamente pequeno de pacientes com DRC 3-5 (não dialítico), a maioria destes no estágio 3 da DRC, o presente estudo não mostrou associação entre baixos níveis de vit D e estresse oxidativo aumentado, mas mostrou uma elevada prevalência de deficiência de vit D entre pacientes com DRC não dialítica (numa região subtropical do Brasil, em que quase 60% dos pacientes estudados apresentavam-se com insuficiência/deficiência de vit D). Os resultados estão em concordância com estudos avaliando prevalência de hipovitaminose D em pacientes renais crônicos pré-dialíticos, tanto em nível nacional (Cuppari e colaboradores, 2008 ; Figueiredo-Dias e colaboradores, 2012 e Diniz, 2012), quanto internacional (Levin e colaboradores, 2007; Melamed, 2009 e Ravani e colaboradores, 2009) e reforçam a necessidade de se avaliar a deficiência desta vitamina neste grupo de pacientes. Esses resultados sugerem que a abordagem de rastreamento e tratamento da hipovitaminose D como sugerida pelo *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO) seja uma estratégia apropriada para estes pacientes.

AGRADECIMENTOS

Apoio Financeiro da CAPES e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná – PPSUS.

REFERÊNCIAS

BASTOS AD, LOUREIRO AP, OLIVEIRA TF, et al. Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method. *Analytical Biochemistry* 2012; 423: 141–146.

CANTORNA MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc Soc Exp Biol Med* 2000; 223:230-233.

CUPPARI L, CARVALHO AB, DRAIBE SA. Vitamin D status of chronic kidney disease in patients living in a sunny country. *J Ren Nutr* 2008;18:408-414.

Diniz HF, Romão MF, Elias RM, Júnior JER. Insuficiência e deficiência de vitamina D em pacientes portadores de doença renal crônica. *J. Bras. Nefrol* 2012;34(1):58-63.

FLECHA BG, LLESUY S, BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. *Free Radical Biology & Medicine* 1991;10:93-100.

FIGUIREDO-DIAS V, CUPPARI L, GARCIA-LOPES MG, et al. Risk factors for hypovitaminosis D in nondialyzed chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr.* 2012 Jan;22(1):4-11.

GRANT WB. An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation. *Cancer* 2002;94:1867- 1875.

HOLICK MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357 (3):266-281.

HYPONEN E, LAARA E, REUNANEN A, et al. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358:1500-1503.

JABLONSKI KL, CHONCHOL M, PIERCE GL, et al. 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with inflammation-related endothelial dysfunction in middle-aged and older adults. *Hypertension.* 2011;57:63–69.

JUDD SE, TANGPRICHA V. Vitamin D deficiency and risk for cardiovascular disease. *Am J Med Sci.* 2009; 338(1):40-44.

KDIGO. Clinical practice guidelines for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009; 76:S1-S113.

KDOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2003;42:S1-S201.

- KILKKINEN A, KNEKT P, ARO A, et al. Vitamin D status and the risk of cardiovascular disease death. *Am J Epidemiol*. 2009; 170(8):1032-1039.
- LEVEY AS, GREENE T, KUSEK JW *et al*. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 155 A.
- LEVIN A, BAKRIS GL, MOLITCH M, LA *et al*. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007; 71: 31- 38.
- MELAMED ML, ASTOR B, MICHOS ED, *et al*. 25-hydroxyvitamin D levels, race, and the progression of kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2631-2639.
- MOYSÉS RM, CANCELA AL, GUEIROS JE *et al*. KDIGO CKD-MBD Discussion forum: the Brazilian perspective. *J Bras Nefrol* 2010; 32(3):229-236.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl 2): S1-S266.
- NAVARRO-GONZÁLVIZ JA, GARCÍA-BENAYAS C, ARENAS J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem*. 1998;44(3):679-681.
- PARIKH SJ, EDELMAN M, UWAIFO GI, et al. The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1196-1199.
- RAJAKUMAR K, FERNSTROM JD, HOLICK MF, et al. Vitamin D status and response to Vitamin D(3) in obese vs. non-obese African American children. *Obesity* 2003; 16:90–95.
- RAVANI P, MALBERTI F, TRIPEPIG, et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 88-95.
- REPETTO M, REIDES C, CARRETERO MLG, et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta* 1996;255:107-117.
- ROMÃO JR JE. Doença Renal Crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nefrol* 2004; 26 (Suppl1): 1-3.
- RUCKER D, TONELLI M. Cardiovascular risk and management in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 287-296.
- SESSO R, LOPES AA, THOMÉ FS, et al. Relatório do censo brasileiro de diálise, 2008. *J Bras Nefrol* 2008; 30: 233-238.
- SCHLEITHOFF SS, ZITTERMANN A, TENDERICH G, et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 754 –759.
- TANAKA M, TOKUNAGA K, KOMABA H, et al. Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial*. 2011, Apr;15(2):161-168.
- TARCIN O, YAVUZ DG, OZBEN B, et al. Effect of Vitamin D Deficiency and Replacement on Endothelial Function in Asymptomatic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4023 – 4030.

WHO: Expert Committee on Physical Status. The Use and Interpretation of Anthropometry: Report of a WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1995. World Health Organization Technical Report Series 854.

WITKO-SARSAT V, FRIEDLANDER M, NUGYEN-KHOA T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*. 1998;161:2524-2532.

WORSTMAN J, MATSUOKA LY, CHEN TC, LU Z, HOLICK MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72:690–693.

WU CC, CHANG JH, CHEN CC, et al. Calcitriol treatment attenuates inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Tohoku J Exp Med*. 2011; 223:153–159.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que:

Pacientes com DRC estágios 3-5 não dialíticos de uma região subtropical apresentaram alta frequência (58%) de valores inadequados (insuficiência + deficiência) de vitamina D, cujas causas são de origem multivariada, reforçando, então, a necessidade de se avaliar a deficiência da vitamina neste grupo.

Não houve correlação entre os diversos marcadores de estresse oxidativo analisados, como o MDA, hidroperóxido, NO, AOPP e TRAP e os níveis séricos de vitamina D nos pacientes com DRC estágios 3-5 não dialíticos. Mais estudos são necessários para desvendar o verdadeiro papel da vitamina D na gênese do estresse oxidativo na DRC.

A abordagem sugerida pelas diretrizes do KDIGO de rastrear e tratar a hipovitaminose D em todos os pacientes com DRC nos estágios de 3 a 5 mostrou-se mais adequada do que a sugerida pelo KDOQI.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudos transversais cumprem bem a sua função de documentar associações entre as variáveis de interesse, mas não permitem concluir se há causalidade nas associações encontradas. No presente estudo, não foi possível encontrar associação entre os níveis de vitamina D e os marcadores de estresse oxidativo avaliados nos pacientes renais crônicos que ainda não se encontram em tratamento dialítico. Para explorar um pouco mais a hipótese de que a deficiência de vitamina D possa estar associada com o estresse oxidativo aumentado neste grupo de pacientes, um estudo com um número maior de participantes utilizando outros biomarcadores de estresse oxidativo certamente seria uma possibilidade. No entanto, esta hipótese pode ser mais bem explorada pela verificação do efeito da suplementação efetiva de vitamina D sobre um painel variado de biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes renais crônicos nos estágios não dialítico, com deficiência/insuficiência desta vitamina. O estudo com este desenho já se encontra sendo realizado pelo presente grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ANNUK M, SOVERI I, ZILMER M, LIND L, HULTHE J, FELLSTROM B. Endothelial function, CRP and oxidative stress in chronic kidney disease. *J Nephrol*. 2005; 18: 721-726.
- ARMSTRONG D, BROWNE R. The analysis of the free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 366:43-58.
- ARTAZA JN, MEHROTRA R, NORRIS KC. Vitamin D and the cardiovascular system. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1515-1522.
- ATKINS RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney International* 2005; 67 (94), 14-18.
- BAKRIS GL, HITZ E. Hypertension and Kidney Disease, A Marriage that Should Be Prevented. *Kidney International* 2009; 75: 449-452.
- BASTOS AD, LOUREIRO AP, OLIVEIRA TF, et al. Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method. *Analytical Biochemistry* 2012; 423: 141–146.
- COSTA-HONG V, BORTOLOTTI LP, JORGETTI V, CONSOLIM-COLOMBOI F, KRIEGER EM, LIMA JJ. Estresse oxidativo e disfunção endotelial na doença renal crônica. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(5):413-418.
- CUPPARI L, CARVALHO AB, DRAIBE SA. Vitamin D status of chronic kidney disease in patients living in a sunny country. *J Ren Nutr* 2008;18:408-414.
- CUSUMANO AM, ROMAO JE, POBLETE BADAL H *et al*. Latin-american dialysis and kidney transplantation registry: data on the treatment of end-stage renal disease in Latin America. *G Ital Nefrol*. 2008; 25:547-553.
- ERIKSEN BO, INGEBRETSEN OC. In chronic kidney disease staging the use of the chronicity criterion affects prognosis and the rate of progression. *Kidney Int* 2007; 72: 1242-1248.
- FIGUIREDO-DIAS V, CUPPARI L, GARCIA-LOPES MG, et al. Risk factors for hypovitaminosis D in nondialyzed chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr*. 2012 Jan;22(1):4-11.
- FLECHA BG, LLESUY S, BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. *Free Radical Biology & Medicine* 1991;10:93-100.
- GMOSEKILDE L. Vitamin D requirement and setting recommendation levels: long-term perspectives *Nutr Rev* 2008;66(Suppl 2):170–177.
- HAFEZ MH, ABDELLATIF DA, ELKHATIB MM. Prevention of Renal Disease Progression and Renal Replacement Therapy in Emerging Countries. *Artif Organs* 2006; 30:501-509.
- HOLICK MF. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health. *Mayo Clin Proc*. 2006; 81: 353-373.

HOLICK MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357 (3):266-281.

JEAN G, SOUBERBIELLE JC, CHAZOT C. *Monthly cholecalciferol* administration in haemodialysis patients: a simple and efficient strategy for vitamin D supplementation. *Nephrol Dial Transplant* 2009, 39; 24(12):3799-3805.

KDIGO. Clinical practice guidelines for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009; 76:S1-S113.

KDOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;42:S1-S201.

KIDNEY DISEASE: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease–mineral and bone disorder (CKD–MBD). *Kidney International* 2009; 76 (Suppl 113): S1–S130.

LAMB EJ, WEBB MC, SIMPSON DE, COAKLEY AJ, NEWMAN DJ, O'RIORDAN SE. Estimation of glomerular filtration rate in older patients with chronic insufficiency: is the modification of diet in renal disease formula an improvement? *JAGS* 2003; 51: 1012-1017.

LAVIE CJ, LEE JH, MILANI RV. Vitamin D and cardiovascular disease: will it live up to its hype? *J Am Coll Cardio* . 2011;58(15):1547–1556.

LEVEY AS, GREENE T, KUSEK JW *et al*. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 155 A.

LEVIN A, BAKRIS GL, MOLITCH M, SMULDERS M, TIAN J, WILLIAMS LA *et al*. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007; 71: 31- 38.

LIMA ES, ABDALLA DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm* 2001; 37(3): 293-303.

LLACH F, YUDD M. Pathogenic, clinical, and therapeutic aspects of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1998;32 2 Suppl 2):S3- S12.

MATHIEU C, GYSEMANS C, GIULIETTI A, BOUILLON R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2006; 49: 217-218.

MCGILL AT, STEWART JM, LITHANDER FE, STRIK CM, POPPITT SD. Relationships of low serum vitamin D3 with anthropometry and markers of the metabolic syndrome and diabetes in overweight and obesity. *Nutr J* 2008;7- 4.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39 (Suppl 2): S1-S266.

NAVANEETHAN SD, SCHOLD JD, ARRIGAIN S, JOLLY SE, JAIN A, SCHREIBER MJ, *et al*. Low 25-hydroxyvitamin D levels and mortality in non-dialysis-dependent CKD. *Am J Kidney Dis* 2011; 58:536-543.

NAVARRO-GONZÁLVEZ JA, GARCÍA-BENAYAS C, ARENAS J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem*. 1998;44(3):679-681.

- OBERG BP, MCMENAMIN E, LUCAS FL, MCMONAGLE E, MORROW J, IKIZLER TA, HIMMELEARB J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 65:1009-1016.
- OLIVEIRA MB, JE ROMAO JR, R ZATZ. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney Int Suppl* 2005: S82-86.
- QUEIROZ MVO; DANTAS M CQ; RAMOS IC. Tecnologia do cuidado ao paciente renal crônico: enfoque educativo-terapêutico a partir das necessidades dos sujeitos. *Texto contexto - enferm.* [online]. 2008, vol.17, n.1, p. 55-63.
- RAVANI P, MALBERTI F, TRIPEPIG, PECHINI P, CUTRUPI S, PIZZINI P, MALLAMACI F, ZOCALLI C. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 88-95.
- REPETTO M, REIDES C, CARRETERO MLG, COSTA M, GRIEMBERG G, LLESUY S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta* 1996;255:107-117.
- RIBEIRO RCHM, OLIVEIRA GASA, RIBEIRO DF, BERTOLIN DC, CESARINO LCEQL, OLIVEIRA SM. Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. *Acta Paul Enferm.* 2008;21(n. esp):207-211.
- ROMÃO JE. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. *J Bras Nefrol* 2004; 26: 1-3.
- RUCKER D, TONELLI M. Cardiovascular risk and management in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 287-296.
- SARNAK MJ, CORONADO BE, GREENE T, et al. Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 2002; 57: 327–356.
- SESSO R, LOPES AA, THOMÉ FS, BEVILACQUA JL, ROMÃO JUNIOR JE, LUGON J. Relatório do censo brasileiro de diálise, 2008. *J Bras Nefrol* 2008; 30: 233-238.
- SESSO R, LOPES AA, THOMÉ FS, LUGON J, SANTOS DR. Censo Brasileiro de diálise, 2010. *J Bras Nefrol* 2011, v.33, n.4: 442-447.
- SCHIFFRIN EL, LIPMAN ML, MANN JFE. Chronic kidney disease: Effect on cardiovascular system. *Circulation* 2007; 116: 85-97.
- SCHLEITHOFF SS, ZITTERMANN A, TENDERICH G, et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 754 –759.
- TARCIN O, YAVUZ DG, OZBEN B, TELLI A, OGUNC AV, YUKSEL M, et al. Effect of Vitamin D Deficiency and Replacement on Endothelial Function in Asymptomatic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 4023 – 4030.
- VALLI A, SULIMAN ME, MEERT N, VANHOLDER R, LINDHOLM B, et al. Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to the presence of triglycerides and others endogenous factors. *Clin Chim Acta.* 2007;379:87-94.
- VASCONCELOS SML, GOULART MOF, MOURA JBF et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007;30(5):1323-1338.

WHO Expert Committee on Physical Status. The Use and Interpretation of Anthropometry: Report of a WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1995. World Health Organization Technical Report Series 854.

WITKO-SARSAT V, FRIEDLANDER M, NUGYEN-KHOA T, CAPELLERE-BLANDIN C, NUGYEN T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998;161:2524-2532.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol.* 1998; 108:101-106.

YILMAZ MI, SAGLAM M, CAGLAR K, et al: The determinants of endothelial dysfunction in CKD: Oxidative stress and asymmetric dimethylarginine. *Am J Kidney Dis* 2006; 47:42-50.


ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética de pesquisa em seres humanos da UEL



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
 Registro CONEP 268

| | |
|---|--------------------------------|
| Parecer de Aprovação Nº 086/10 CAAE Nº 0083.0.268.000-10 FOLHA DE ROSTO Nº 326324 | Londrina, 08 de julho de 2010. |
| PESQUISADOR: VINICIUS DAHER ALVARES DELFINO CCS/DEPTO DE CLINICA MÉDICA | |
| <p>Prezado Senhor:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">“DEFICIÊNCIA DE VITAMINA D, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NÃO DIALÍTICA”</p> | |
| <p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p> | |
| <p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center">  Prof.ª. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL </p> | |

ANEXO B

Parecer do Comitê de Ética de pesquisa em seres humanos da UEL



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
 Universidade Estadual de Londrina
 Registro CONEP 268

| | | |
|---|--|-------------------------------|
| Parecer de Aprovação de Emenda | 086/2010 | Londrina, 12 de maio de 2011. |
| CAAE | 0083.0.268.000-10 | |
| Processo | 6549/2011 | |
| Folha de Rosto | 326324 | |
| PESQUISADOR(A): | Vinícius Daher Álvares Delfino CCS – Departamento de Clínica Médica | |
| <p>Prezado(a) Senhor(a):</p> <p>O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina” (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p align="center">“Deficiência de Vitamina D, Inflamação e Estresse Oxidativo em Pacientes com Doença Renal Crônica Não Dialítica”.</p> | | |
| <p>Emenda: Alteração do número de pacientes de 60 para 200 e autorização para convidar os pacientes em acompanhamento no Centro de Referência em Nefrologia para participar do referido Projeto de Pesquisa.</p> | | |
| <p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p> | | |
| <p align="center">Atenciosamente,</p> <p align="center"></p> <p align="center">Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina</p> | | |

ANEXO C

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

Caro participante:

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

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

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

Gostaríamos de deixar claro que sua participação é voluntária e que você poderá recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento, ou ainda descontinuar sua participação se assim o preferir, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

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

Eu, _____(nome e número do documento de identidade do participante), confirmo que _____(nome do pesquisador) explicou-me os objetivos desta pesquisa, bem como a forma de minha participação. Eu li e compreendi este Termo de Conhecimento e concordo em dar meu consentimento para participar como voluntário desta pesquisa. Tel para contato: 33769100 ou 91618730.

Londrina, _____(data),

_____(assinatura do sujeito da pesquisa)

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

(assinatura do membro da equipe que apresentou o TCLE)

(Identificação e assinatura do pesquisador responsável pelo projeto)

ANEXO D

Potencial antioxidante total plasmático (TRAP)

REAGENTES

1 - ABAP (azobis, PM = 271,2) 200 mM (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA)

54,24 mg _____ 1 mL H₂O destilada

Agitar no agitador de tubos e preparar no dia de uso

2 - Luminol (PM = 199,1) – SOLUÇÃO MÃE (Acros[®], New Jersey, EUA)

3,98 mg _____ 10 mL H₂O destilada

Agitar em agitador de tubos

Forma corpo de fundo

3 - Luminol – SOLUÇÃO DE TRABALHO

100 µL LUMINOL – SOL. MÃE + 900 µL de H₂O destilada (proteger da luz)

Agitar em agitador de tubos

4 - Trolox (PM = 250,29) (Acros[®], New Jersey, EUA)

SOLUÇÃO MÃE (20 µM) – 5 mg _____ 10 mL Tampão Glicina pH=8,6

SOLUÇÃO DE TRABALHO – PREPARO NO DIA

4 µL TROLOX SOL. MÃE + 796 µL de Tampão Glicina pH = 8,6

5 – Tampão Glicina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA)

3,75 g de glicina _____ 500 mL H₂O destilada

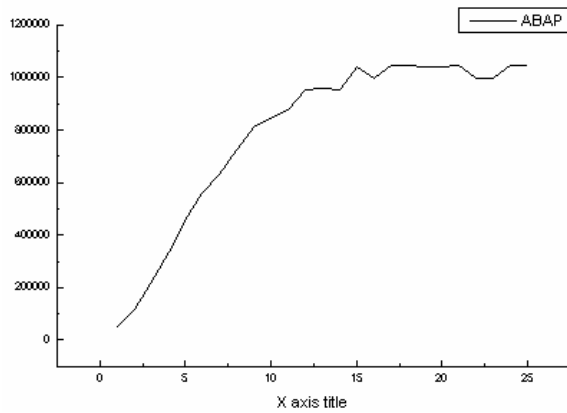
Acertar pH em 8,6 com KOH 1M

PROCEDIMENTO

Antes de iniciar as reações com soro, fazer as curvas ABAP e com TROLOX

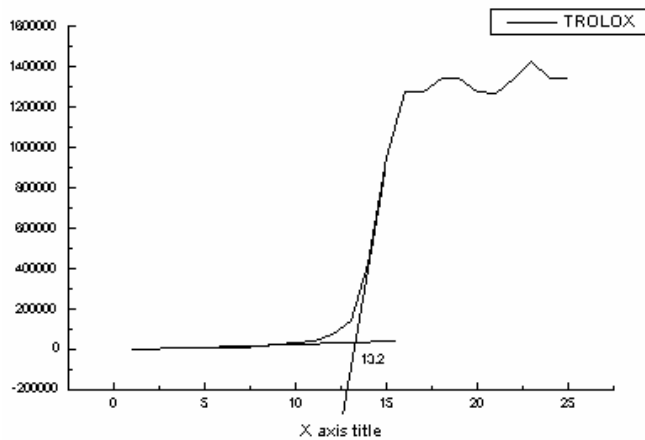
- Curva ABAP
 - Tampão Glicina _____ 1,8mL

- Luminol _____ 0,1mL
- ABAP _____ 0,1mL



- Curva Trolox

- Tampão Glicina _____ 1,8mL
- Luminol _____ 0,1mL
- Trolox _____ 0,1 mL
- ABAP _____ 0,1mL



- Reação com Soro

- Tampão Glicina _____ 1,8mL
- Luminol _____ 0,1mL
- Soro diluido 1 :2 com H₂O ____ 5 μ L
- ABAP _____ 0,1mL

PROGRAMAÇÃO DO APARELHO

- Main Menu – sel review and edit user program
- Review/Edit – sel luminescencia
- Review/Edit – sel counting time:25min

- Edit Other Parameters
- Edit Other Parameters – sel data calculation
- Data calculation – sel number of data points: 25
 - sel count time/data point: 0,10
 - sel count sample set: 1
 - sel factor: 0,01
- Voltar ao menu principal: sel count single rack
- Count single rack: sel select user program
- User selection: sel luminescencia
- Count single rack: sel count with program user: 1
- Count single rack: sel [START]

Selecionar previamente os passos acima e deixar a tela start até que a rack contendo o frasco esteja na posição

CÁLCULO

$$\text{TRAP} = 802 \times \frac{\text{Tempo da amostra}}{\text{Tempo de trolox}} = \text{cpm por equivalente de trolox}$$

ANEXO E
Dosagem de MDA#

REAGENTES

1- Hidróxido de Sódio (NaOH) 6 M - (Nuclear[®], Diadema, SP, Brasil)

2,4 g NaOH + 10 mL água miliQ

2- Ácido Perclórico 35% (v/v) - (Quimespar[®], Curitiba, PR, Brasil)

1,0 mL água miliQ + 1,0 mL ác. Perclórico 70%

3- Ácido Clorídrico (HCl) 2 M - (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA)

1,66 mL HCl + 8,34 mL água miliQ

4- 2,4- dinitrophenylhidrazine 5 mM (DNPH) – (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA)

9,91 mg DNPH + 10mL HCl 2M

5- Fase Móvel 50:50 – acetonitrila (J.T. Baker[®], Phillipsburg, NJ, EUA): água miliQ

- Antes de filtrar a fase móvel, molhar o filtro com um pouco de acetonitrila pura (se ficar seco não vai filtrar a fase)

- Adicionar 0,2% ácido acético à água miliQ (o pico no gráfico fica melhor)

0,4 mL ác. Acético em 200 mL de água miliQ

200 mL água miliQ + 200 mL acetonitrila (50:50)

6- Solução Estoque de MDA 1 mM - (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA)

25 µL TEP + 100 mL água miliQ

- Validade 4 meses a 4°C

7- Solução Padrão para USO de MDA – 20nmol/mL – P1

1mL sol. Estoque MDA 1mM + 50mL ácido sulfúrico 1%(v/v)

- Incubação por 2 horas a temperatura ambiente

- Validade de 4 semanas a 4°C

8- Ácido Sulfúrico 1% - (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA)

2mL ácido sulfúrico (pureza ≥ 95%) + 200mL água miliQ

9- Diluições para a curva referência

P1 – 20,0 nmol/mL

P2 – 10,0 nmol/mL – 1 mL P1 + 1 mL ácido sulfúrico 1%

P3 – 5,00 nmol/mL – 1 mL P2 + 1 mL ácido sulfúrico 1%

P4 – 2,50 nmol/mL – 1 mL P3 + 1 mL ácido sulfúrico 1%

P5 – 1,25 nmol/mL – 1 mL P4 + 1 mL ácido sulfúrico 1%

P6 – 0,625 nmol/mL – 1 mL P5 + 1 mL ácido sulfúrico 1%

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- 250 µL de plasma ou padrão
- Adicionar 50 µL de NaOH 6 M
- Incubar a 60°C por 30 min
- Adicionar 100 µL Ác perclórico 35% (v/v)
- Agitar por 30 segundos e centrifugar a 16800 x g por 10 minutos
- Retirar 250 µL do sobrenadante
- Adicionar 25 µL DNPH
- Incubar 30 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz
- Injetar amostra

SISTEMA:

- $\lambda = 310 \text{ nm}$
- AUFS = 0,0025
- fluxo = 0,6 mL/min
- tempo de corrida = 13 min
- temperatura da coluna = 30°C

ANEXO F

Determinação de MDA – HPLC

Programação do equipamento – Waters

- ✓ Ligar detector
- ✓ Checar o volume das fases – se estiver baixo, completar.

Sempre que o equipamento está ligado tem um fluxo baixo de água correndo. Para completar a água, reduzir o fluxo para 0.00, acrescentar água e aumentar o fluxo novamente. Usar água Milli-Q e deixar no ultrassom por 10 minutos.

- ✓ Colocar as amostras no carrossel
- ✓ Abrir Empower
- ✓ LOGIN: lapa / SENHA: lapadia
- ✓ *Para ver os dados de análises realizadas: BROWSE*
Para fazer novas análises: RUN SAMPLE
- ✓ Run Sample → MDA (Método) + HPLC_PAD (Sistema) → Ok
- ✓ Load sample → Ok
- Abrir o protocolo
- Precisa SEMPRE conter:
 - Wet prime
 - Purge inject
 - Equilibrate
- Deletar as corridas do dia anterior
- Adicionar as corridas do dia
 - **VIAL:** Posição correta do vial no carrossel
 - **µL INJ VOL:** 20 µL
 - **SAMPLE NAME:** identificação da amostra
 - **FUNCTION:** inject standard (padrão) ou inject sample (amostras)
 - **RUN TIME:** 8 minutos
 - **LABEL e LEVEL:** para padrões só. Colocar 1, 2, 3***
- Depois de adicionar padrão/amostra, colocar o método LIMPEZA_MS (Equilibrate)
- RUN
- Save (salva o sample set method que acabou de ser criado)

***** Para fazer o cálculo da curva de calibração utilizando o Empower:** Quando colocar os padrões precisa clicar em Amounts e preencher a tabela:

COMPONENT: colocar um nome (ex. MDA)

VALUE (STANDARD): concentração do ponto...

VALUE (STANDARD): concentração do próximo ponto e assim pra todos os pontos

UNITS: µM<

Save preference

- ✓ Para alterar a sequencia de corridas quando as análises já começaram: *alter running sample* (botão direito) → faz as alterações desejadas → Clica em Run
- ✓ Para abortar todas as leituras → Clica no botão vermelho

Tratamento da curva/amostras**Curva (Pode ser feito no excel também)**

- ✓ Browse Project → Abrir método (MDA) → Abrir a pasta

Na aba CHANNEL, tem as leituras em varredura (utilizado para tratar as amostras) e tem as leituras no λ determinado (utilizado para visualizar todos os pontos da curva juntos)

- Selecciona todos os pontos da curva (na opção de varredura)
- Clica com o botão direito → Review
- Extrair em 532nm → Extract Chromatogram
- Clicar em Processing Method Wizard
 - Create → Ok
 - Nessa tela, mantém essa tela do jeito que está → Ok
 - Selecciona o pico de interesse pela base → Avançar
 - Threshold: Selecciona uma parte da linha de base (onde não tem pico) → Avançar
 - Nessa tela, selecciona o trecho que quer q integre os picos → avançar
 - Nessa tela, mantém essa tela do jeito que está → Ok
 - Sim
 - Coloca nome no pico (ex. MDA) → avançar
 - Avançar até chegar na tela PDA SPECTRAL CONTRAST → Tira a seleção do Max Plot e selecciona o pico → Avançar
 - Dá um nome pra curva (ex. curva 27/01) → Concluir
- Confere todos os pontos da curva → Quando aparecer 2 picos → delete um e clica em Calibrate
- Clica em Calibrate Curve → Mostra curva de calibração com o r e a equação da reta
- Save all
-

Amostras

- ✓ Ainda em CHANNEL
 - Selecciona as amostras na varredura
 - Clica em Review (botão direito)
 - Extrai em 532nm
 - Clica em File → Open → Processing method
 - Selecciona a curva anterior, que acabou de ser tratada (ex. Curva 27/01)
 - Nas amostras, o programa não integra sozinho (como faz na curva), então clica em INTEGRATE → QUANTITATE

Se a curva estiver nas mesmas condições da amostra, o resultado já sai na própria tabela. Caso contrário, é só calcular utilizando a equação da reta

 - Save
- ✓ Na aba RESULTS (Para exportar resultados)
 - Abrir a amostra de interesse → Já aparecerá tratada
 - Selecciona o que deseja exportar (Gráfico, cromatograma, resultados) → Clica em Report Publisher → Mantem na opção Use a report preview → Save → Sai um laudo em PDF

Preparo dos Reagentes

***** Para todas as soluções, usar água Milli-Q!**

BHT 0,2% (sol. Etanol)

Pesar 0,1g de BHT e diluir em 50mL de etanol. Armazenar em um tubo falcon a temperatura ambiente

TCA 7,2% + KI 1% (sol. Água)

Pesar 1g de KI e 7,2g de TCA e diluir em 100mL de água. Armazenar ao abrigo da luz e na geladeira.

TBA 0,6% (sol. Água)

Pesar 0,6g de TBA e diluir em 100mL de água. Esquentar para dissolução!!! 60°C + peixinho no agitador.

NaOH 10N

Pesar 1,2g de NaOH e diluir em 3 mL de Água MiliQ – validade de 1 semana. Armazenar na geladeira.

H₂SO₄ 1%

2 ml Ác. Conc. + 198 mL de Água MiliQ

Tampão fosfato (Fase móvel)

Pesar 5,3g de KH₂PO₄ e 10,62 de K₂HPO₄, dissolver em 2 L de Água Milli-Q.

Acertar o pH = 7,0.

Filtrar o tampão.

Colocar no ultrassom por 10 min. Armazenar em geladeira.

Preparo da Curva de Calibração**Solução padrão de MDA:**

Diluir 22µL de MDA em 10mL de H₂SO₄ 1% em um balão de 10 mL.

Deixar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas.

Após, armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

Solução de MDA diluída (300x):

Em um eppendorf, diluir 5 µL da solução diluída de MDA em 1495 µL de H₂SO₄ 1%.
Armazenar ao abrigo da luz, em geladeira.

Leitura da solução diluída em espectrofotômetro:

Fazer a leitura da solução diluída em 245nm com cubeta de quartzo. Usar H₂SO₄ 1% como branco.

A D.O. da solução deve estar entre 0,6-0,7

(Variação aceitável de um dia para outro → 15%)

Utilizar a D.O. obtida para calcular a concentração real de MDA na solução:

$$C = A / \xi \quad (\text{sendo } C = [\text{M}], A = \text{absorbância e } \xi = 13700)$$

Obtida a concentração real da solução diluída de MDA, calcular as diluições necessárias para obter as concentrações de 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 1,5; 2,00. Manter o volume final de 250µL.

Os pontos da curva de calibração devem ser preparados a partir da SOLUÇÃO DILUÍDA DE MDA e devem ser diluídos em um pool de plasma de 6 indivíduos saudáveis.

Fazer um branco contendo 250µL de pool de plasma.

Seguir os passos para o preparo de amostras também para a curva de calibração e para o branco.

Preparo das Amostras/Curva de Calibração

****Para não ocorrer interferência devido à presença de fibrina, é preciso centrifugar as amostras antes de qualquer etapa! (10000 rpm/5 min)*

****As amostras podem ser preparadas no dia anterior à injeção no HPLC (armazenar em geladeira)*

**Eppendorfs de 2mL:
250 µl amostra/curva/branco + 36 µl BHT + 12,5 µl NaOH 10 N**



Banho de 60°C/30 min com agitação leve



Banho de gelo por 10 minutos



1500 µl TCA / KI



**Vórtex
Centrifugar 3300 rpm/ 10 min**



**Retirar 1000 µl sobrenadante, colocar no criotubo com *tampa de rosca!*
+ 500 µl TBA**



**Vórtex
Banho de 90°C/ 45 min
Esperar esfriar! Abrir aos poucos.**



Injetar HPLC (20 µl)

Preparo da Fase Móvel**Tampão fosfato 50 nM pH 7,0 (65%) + metanol grau HPLC (35%)**na coluna de HPLC: 1,0 ml de fase móvel por minuto (**1 ml/min**)

$$1,0 \text{ ml/min} \times 10 \text{ min/amostra} \times 50 \text{ amostras} = 500 \text{ ml} \times 2 = 1 \text{ L}$$

*(x2 p/ contar o necessário para a coluna antes e depois das amostras)***Coluna: C18 com 250mm de comprimento****Temperatura da coluna: 30°C****Tempo de corrida: 10 minutos**

ANEXO G

Produtos avançados da oxidação protéica (AOPP)

REAGENTES

1- Iodeto de Potássio (KI) 1,16 M (Merck[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil) – preparar diariamente

0,962 g _____ 5 mL de H₂O destilada

2- Padrão Estoque Cloramina T – 1 mM (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA) – validade: 3 meses a 4°C

28,17 mg _____ 100 mL H₂O destilada

3- Ácido Acético PA (Quimespar[®], Curitiba, PR, Brasil)

AMOSTRAS

- Plasma: diluído 1:5 com PBS

PROCEDIMENTO

- Diluição Padrão:

P1 - 500µL Padrão Estoque + 4,5mL PBS

P2 – 1mL P1 + 1mL PBS

P3 – 1mL P2 + 1mL PBS

P4 – 1mL P3 + 1mL PBS

P5 – 1mL P4 + 1mL PBS

| | BRANCO | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | AMOSTRA |
|---------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------|
| [] µM | | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | |
| PBS (µL) | 1000 | | | | | | |
| PADRÃO (µL) | | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | |
| AMOSTRA (µL) | | | | | | | 1000 |
| Ác Acético PA (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| KI (µL) | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

- Leitura em 340 nm

- Ler imediatamente

Concentração de AOPP – µmoles/L de equivalente de cloramina T

ANEXO H

Hidroperóxidos lipídicos – quimiluminescência

Programação do aparelho

- ✓ Main Menu – sel Review and Edit User Program
- ✓ Review/Edit – sel Luminescencia
- ✓ Review/Edit – sel Counting time: 0,5min
 - Edit Other Parameters
- ✓ Edit Other Parameters – sel Data Calculation
- ✓ Data Calculation – sel number of data points: 5
 - sel count time/data point: 0,10
 - sel count sample set: 1
 - sel factor: 1
- ✓ Voltar ao menu principal
- ✓ Automatic start (quando a rack já estiver dentro do aparelho)

Técnica

- 1) Programar o aparelho
- 2) Pegar papel alumínio e cortar no tamanho das tampas dos frascos de cintilação
- 3) Colocar o papel nas tampas (pode deixar pronto antes de começar)
- 4) Colocar os tubos na rack (vazios) para fazer a pré-leitura e escolher os melhores frascos (12) – aqueles com leituras basais parecidas

Obs.: Manipular os frascos no escuro!

Reação

- ➔ 6 primeiros frascos : Estimulados
 - ✓ 1730 µL de tampão fosfato KCl
 - ✓ 250 µL de plasma
 - ✓ 20 µL de T-butil (diluído)
- ➔ 6 últimos frascos : Brancos
 - ✓ 1730 µL de tampão fosfato KCl
 - ✓ 250 µL de plasma