



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCEL JAQUETO

**HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO, INFLAMAÇÃO E
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES RENAIIS
CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE**

Londrina
2013

MARCEL JAQUETO

**HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO, INFLAMAÇÃO E
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES RENAIIS
CRÔNICOS EM HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof^o Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

J36pT Jaqueto, Marcel.

Hiperparatireoidismo secundário, inflamação e estresse oxidativo em pacientes renais crônicos em hemodiálise / Marcel Jaqueto. – Londrina, 2013.
48 f. : il.

Orientador: Vinícius Daher Alvares Delfino
Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Hiperparatireoidismo – Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Inflamação –
Hemodiálise – Teses. 4. Doença renal crônica (DRC) – Teses. I. Delfino, Vinícius Daher
Alvares. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde.
Programa de Pós-Graduação em Saúde. III. Título.

CDU 616.61

MARCEL JAQUETO

**HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO, INFLAMAÇÃO E
ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS EM
HEMODIÁLISE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Luis Alberto Batista Peres
UNIOESTE – Toledo - PR

Prof. Dr. Alexandre J. F. Carrilho
UEL – Londrina - PR

Londrina, 27 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino, pelo conhecimento transmitido, pela paciência demonstrada e pelo estímulo contínuo à indagação e pesquisa.

A meus pais, que me geraram, criaram e deram todas as condições para que eu pudesse estar aqui hoje, em crescimento profissional e intelectual.

A minha esposa, que tanto me ajudou com apoios moral e laboral na realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, que mantém o afimco em estimular a pesquisa em nossa Universidade.

Às alunas de medicina da UEL e colegas colaboradoras na realização do trabalho – Fernanda Burle, Larissa Ferreira e Raquel Frange – que muito ajudaram para que o trabalho fosse concluído.

Às bioquímicas Chiara Bortolasci e Helena Morimitsu, que gastaram horas e horas nas dosagens laboratoriais, sem as quais este trabalho simplesmente não existiria.

Aos funcionários e pacientes do Instituto do Rim de Londrina e Histocom Atividades Médicas, pela ajuda incomensurável na realização deste projeto.

A Deus, mestre maior, por me dar saúde e força nas horas mais difíceis.

JAQUETO, Marcel. **Hiperparatireoidismo secundário, inflamação e estresse oxidativo em pacientes renais crônicos em hemodiálise**. 2013, 48 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências da Saúde) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A mortalidade cardiovascular conta para aproximadamente 50% dos óbitos em pacientes renais crônicos em diálise. Além dos fatores de risco tradicionais (hipertensão, *diabetes mellitus*, entre outros), os renais crônicos ainda são acometidos por fatores não tradicionais, como hiperparatireoidismo secundário, inflamação e estresse oxidativo. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar possível associação entre o nível do paratormônio (PTH) e alguns parâmetros bioquímicos de inflamação (interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral-alfa) e de estresse oxidativo (potencial antioxidante total plasmático, dialdeído malônico, hidroperoxidação lipídica, produtos de oxidação proteica avançada e quantificação de metabólitos do óxido nítrico). Para isto, realizou-se um estudo transversal onde foram coletadas amostras de sangue de 168 pacientes em hemodiálise. Pacientes com condições sabidamente geradoras de estresse oxidativo e inflamação foram excluídos. As análises estatísticas, colocando o nível de PTH como variável contínua, não demonstraram qualquer tipo de associação entre este hormônio e os parâmetros de inflamação/estresse oxidativo. Quando o PTH foi categorizado em tercís, maiores valores de hidroperoxidação lipídica foram observados no terceiro tercil quando comparados ao primeiro ($p=0,016$), não se observando diferenças significativas entre os tercís para os outros parâmetros de estresse oxidativo e de inflamação avaliados. Os resultados do presente estudo nos levam a concluir que a inflamação e o estresse oxidativo aumentados de pacientes renais crônicos em hemodiálise têm origem por outros mecanismos que não o hiperparatireoidismo secundário, ou que este contribui muito pouco para a gênese destes fenômenos.

Palavras-chave: Hiperparatireoidismo. Estresse oxidativo. Inflamação. Hemodiálise. Doença renal crônica (DRC)

JAQUETO, Marcel. **Secondary hyperparathyroidism, inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients.** 2013, 48 f. Master's Degree Dissertation. State University of Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Cardiovascular mortality accounts for approximately 50% of deaths in patients with chronic kidney disease (CKD) on dialysis. In addition to the traditional risk factors (hypertension, *diabetes mellitus*, among others), CKD patients are still affected by non-traditional factors, such as secondary hyperparathyroidism, inflammation and oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the possible association between parathyroid hormone (PTH) level and some biochemical parameters of inflammation (interleukins 1 and 6, tumor necrosis factor- α) and oxidative stress (total antioxidant capacity, malondialdehyde, lipid hydroperoxidation, advanced oxidation protein products, quantification of nitric oxide metabolites). For this purpose, a cross-sectional study was performed in which blood samples were collected from 168 patients on hemodialysis. Patients with conditions known to generate oxidative stress and inflammation were excluded. Statistical analyzes by placing the level of PTH as a continuous variable, did not show any association between this hormone and parameters of inflammation / oxidative stress. When PTH was categorized into tertiles, higher values of lipid hydroperoxidation were observed in the third tertile compared to the first ($p = 0.016$), while no significant differences were found between tertiles for the other parameters of oxidative stress and inflammation assessed. The results of this study lead us to conclude that the increased inflammation and oxidative stress of hemodialysis patients have origin by mechanisms other than secondary hyperparathyroidism, or that it contributes very little to the genesis of these phenomena.

Keywords: Hyperparathyroidism. Oxidative stress. Inflammation. Dialysis chronic kidney disease. (CKD)

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25 (OH)D	Calcitriol
25 (OH)D	Vitamina D
AOPP	Produtos de oxidação proteica avançada
CaSR	Receptores sensíveis ao cálcio (CaSR)
DCV	Doença cardiovascular
DMO-DRC	Desordens do metabolismo mineral e ósseo da doença renal crônica
DRC	Doença renal crônica
EPO	Eritropoetina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblasto 23
FOX	Hidroperoxidação lipídica por espectrofotometria
HPT	Hiperparatireoidismo
HPTS	Hiperparatireoidismo secundário
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
MDA	Dialdeído malônico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PTH	Paratormônio
PTHi	Paratormônio intacto
QL	Quimiluminescência
TEP	1,1,3,3-tetraetóxiopropano
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Capacidade antioxidante total plasmática
VDR	Receptores de vitamina D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisiopatologia do hiperparatireoidismo secundário a doença renal crônica	11
Figura 2 – Reações químicas envolvidas na análise de NOx.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	15
2a	GERAL	15
2b	ESPECÍFICO	15
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
3.a	DELINEAMENTO.....	16
3.b	POPULAÇÃO.....	16
3.c	AMOSTRAGEM	17
3.d	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	17
3.e	PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO	17
3.f	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
3.f.i	Hidroperóxidos por Espectrofotometria	18
3.f.ii	Metabólitos do Óxido Nítrico.....	18
3.f.iii	Potencial Antioxidante Total Plasmático	20
3.f.iv	Produtos Avançados de Oxidação Proteica.....	21
3.f.v	Dialdeído Malônico	22
3.g	Análise Estatística	22
	REFERÊNCIAS	23
4	ARTIGO - SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM, INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN HEMODIALYSIS PATIENTS	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	APÊNDICES	45
	APENDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	46
	APENDICE B - Termo de Aprovação de Pesquisa – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....	49

1 INTRODUÇÃO

Indivíduos portadores de doença renal crônica (DRC) em terapia dialítica apresentam mortalidade 20-100 vezes maior que a população controle, sendo as causas cardiovasculares as principais responsáveis por esta mortalidade excessiva (Parfrey e Foley, 1999). Fatores tradicionais de risco cardiovascular (hipertensão arterial, *diabetes mellitus*, tabagismo, dislipidemia, sedentarismo, dentre outros) concentram-se nesta população, mas não explicam completamente o porquê desta mortalidade tão elevada. Outros fatores, ditos não tradicionais, vem sendo implicados como causas adicionais da mortalidade cardiovascular aumentada destes pacientes. Dentre eles incluem-se: anemia, expansão volêmica crônica, hiperhomocisteinemia, estresse oxidativo, inflamação crônica e desordens do metabolismo mineral e ósseo da doença renal crônica (DMO-DRC) (Block et al., 2004, Locatelli et al., 2003).

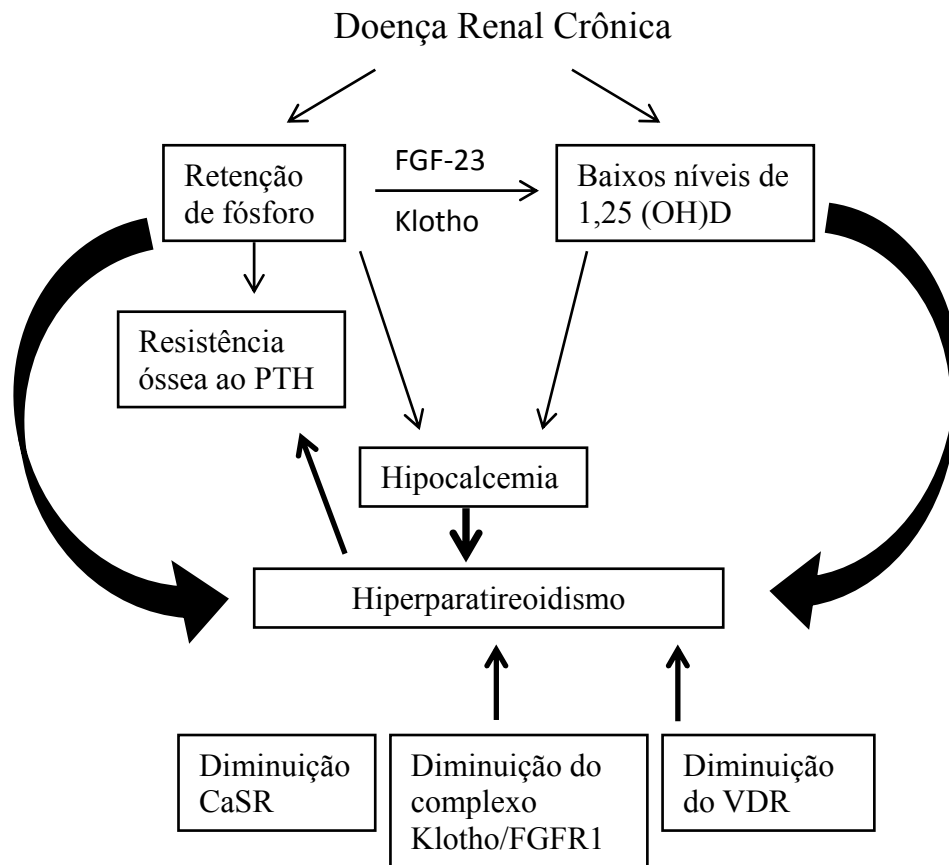
O termo DRC-DMO é recente e substitui a antiga denominação de osteodistrofia renal (hoje só utilizada para descrever as alterações histopatológicas do osso do paciente urêmico), e compreende as alterações clínicas, bioquímicas e ósseas, além das calcificações extra-ósseas, frequentemente observadas na DRC (Jorgetti, 2008). Há três tipos principais de doença óssea relacionada à DRC: o hiperparatireoidismo secundário (HPTS), caracterizado pelo alto remodelamento ósseo, níveis elevados de paratormônio (PTH) e pela osteíte fibrosa à biópsia óssea; a doença óssea adinâmica, marcada pelo baixo remodelamento ósseo, com baixa formação óssea e atividade celular, associado a níveis diminuídos de PTH; a osteomalácia, condição também caracterizada pelo baixo remodelamento, com defeito da mineralização do osteóide formado pelos osteoblastos. Há, ainda, uma quarta doença óssea relacionada à DRC denominada doença mista, geralmente associada a remodelamento ósseo aumentado, com achados histológicos variados. Nosso enfoque será sobre o HPTS.

A gênese do HPTS do renal crônico é complexa e multifatorial. Podemos citar como contribuintes para seu aparecimento: alterações no metabolismo do cálcio e fósforo (hiperfosfatemia e hipocalcemia), diminuição dos níveis de 1-25 diidroxivitamina D (calcitriol), aumento dos níveis de fator de crescimento de fibroblasto-23 (FGF-23), diminuição da expressão da proteína transmembrana Klotho e resistência óssea ao PTH. Os rins cronicamente insuficientes não conseguem promover a hidroxilação da 25-hidroxivitamina D (calcidiol) à sua forma mais ativa, o calcitriol. Desta maneira, a absorção intestinal de cálcio é prejudicada, levando a um estado de hipocalcemia. Tanto os níveis diminuídos de cálcio quanto os de calcitriol são estímulos diretos para a produção de PTH

pelas paratireóides, cuja ação principal é a de mobilizar os estoques ósseos de cálcio para normalização da calcemia. Além disso, o fato de a taxa de filtração glomerular (TFG) estar bastante reduzida nesta população induz uma retenção de fósforo no organismo, já que este é um mineral de excreção essencialmente renal. A hiperfosfatemia resultante também é um estímulo direto para liberação de PTH, já que este hormônio tem ação fosfatúrica (Sampaio et al., 2008). Outra consequência da hiperfosfatemia é a indução da secreção do FGF-23, hormônio produzido pelos osteócitos e osteoblastos e que, além de também ter ação fosfatúrica, inibe a 1-alfa hidroxilase renal, o que acarreta menor conversão do calcidiol em calcitriol, ajudando a perpetuar a hipocalcemia. O aumento dos níveis de FGF-23 ocorre precocemente na doença renal crônica, precedendo inclusive o aumento dos níveis de PTH (Jüppner, 2011). A proteína transmembrana Klotho, essencial como cofator para ligação do FGF-23 às células do túbulo proximal dos rins, tem sua expressão diminuída com a piora progressiva da função renal, o que induz resistência à ação do FGF-23 e consequente aumento compensatório na secreção deste fator (Kuro-o, 2011).

Citam-se ainda como fatores envolvidos no HPTS do renal crônico a diminuição de receptores sensíveis ao cálcio (CaSR) e de vitamina D (VDR) na glândula paratireóide, com diminuição da sensibilidade do tecido paratireoidiano aos níveis séricos destes dois componentes e a resistência óssea à ação do PTH, advinda de fatores tais como diminuição da expressão e/ou dessensibilização de receptores ósseos do PTH, acidose metabólica, retenção de fósforo e níveis diminuídos de calcitriol (Sampaio et al., 2008). No paciente dialítico, a adequação da diálise também é importante no controle do HPTS. A figura 1 resume a interligação entre os principais fatores implicados no HPTS do paciente com DRC.

Figura 1 – Fisiopatologia do hiperparatireoidismo secundário à doença renal crônica



Fonte: Adaptado de Slatopolski E, *Kidney International* (2011).

A maioria destas alterações é adaptativa e surge precocemente quando da perda de função renal. Em biópsias ósseas de pacientes com DRC estágio 2 (lesão renal com TFG maior que 60mL/min), já se encontra expressão aumentada do FGF-23 (Pereira et al., 2009). À medida que a TFG declina, principalmente a partir da DRC estágio 3 (TFG entre 30 e 60 mL/min), as alterações acima descritas vão surgindo e de adaptativas passam a patológicas, à medida que a doença avança. Por exemplo, enquanto que o limite superior de PTH intacto em pacientes sem DRC gira em torno de 65 pg/mL, a depender do kit utilizado, em pacientes renais crônicos em estágio 5-D (TFG menor que 15 mL/min, já em terapia dialítica), os níveis recomendados de PTH pela National Kidney Foundation K/DOQI (Kidney Outcomes Dialysis Initiative) e Sociedade Brasileira de Nefrologia variam de 150 a 300 pg/mL (Ferreira, 2008). É comum os pacientes chegarem ao tratamento dialítico já com níveis bem mais elevados do que estes, devido à falta de tratamento em fases mais precoces.

A terapêutica do HPTS envolve, em todas as suas fases, o controle da hiperfosfatemia através da dieta e medicamentos (uso de quelantes de fósforo), a

normalização dos níveis séricos de cálcio e vitamina D e o uso de calcitriol ou análogos da vitamina D para diminuir os níveis de PTH. Mais recentemente, instituiu-se o uso de medicações sensibilizadoras dos receptores de cálcio na paratireóide (os calcimiméticos), que conseguem diminuir de forma eficaz a produção e a secreção de PTH (Gueiros et al., 2011). Quando a hiperestimulação crônica das glândulas paratireóides é mantida sem tratamento adequado, pode ocorrer proliferação de suas células, levando a uma hiperplasia difusa, progressiva e policlonal da paratireóide. Subsequentemente, este padrão de crescimento pode se transformar em um tipo monoclonal benigno, porém mais agressivo, ou policlonal; as glândulas tornam-se então muito aumentadas e exibem padrão nodular hiperplásico (Sampaio et al., 2008). Nesta fase, o HPTS apresenta pouca ou nenhuma resposta ao tratamento clínico, e o único tratamento eficaz para o quadro é a paratireoidectomia. De acordo com Sampaio e Moysés (2011), a cirurgia é indicada para pacientes com HPTS com nível sérico de PTH, persistentemente acima de 800 pg/mL, associado a uma ou mais das seguintes condições:

- Hipercalcemia e/ou hiperfosfatemia refratárias ao tratamento clínico;
- Hipercalcemia e/ou hiperfosfatemia durante pulsoterapia com calcitriol ou análogos da vitamina D, a despeito do uso de quelante de fósforo sem cálcio e da redução da concentração de cálcio do banho de diálise;
- Calcificações extraósseas (tecidos moles e/ou cardiovasculares) ou arteriopatía urêmica calcificante (calcifilaxia);
- Doença óssea avançada, progressiva e debilitante que não responde ao tratamento clínico;
- Presença de glândulas paratireóides volumosas ao ultrassom (volume > 1,0 cm³).

Em relação ao estresse oxidativo, este pode ser definido como o dano tecidual resultante de um desequilíbrio entre a geração excessiva de componentes oxidantes contra a produção insuficiente de mecanismos de defesa antioxidantes (Sies, 1997). Ainda que seja essencial em mecanismos de inflamação, cicatrização/reparação e combate a microrganismos e células malignas, o excesso de substâncias oxidativas é mal adaptativo (Handelman, 2000). Assim, estados de geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) levam subsequentemente a estados inflamatórios, já que EROs são liberadas dos monócitos e polimorfonucleares juntamente com citocinas pró-inflamatórias, as quais amplificam, por sua vez, a geração de oxidantes (Decamps-Latscha et al., 2001). Os pacientes renais crônicos representam uma população submetida constantemente a estados de inflamação e estresse oxidativo aumentados, seja por suas características próprias (alta

prevalência de *diabetes mellitus* e idade avançada), seja por características relacionadas à uremia (Himmelfarb e McMonagle, 2001) e à terapia dialítica, como tempo em diálise (Nguyen-Khoa et al., 2001), biocompatibilidade das membranas dialíticas (quanto menor a capacidade da membrana de ativar o sistema complemento quando em contato com o sangue, maior sua biocompatibilidade), exposição a endotoxinas e administração parenteral de ferro (Lim et al., 1999). As consequências deste estado inflamatório e de estresse oxidativo aumentados são bastante prejudiciais, e incluem a síndrome da aterosclerose-desnutrição-inflamação e maior suscetibilidade a infecções (Pecoits-Filho et al., 2002 e Gonçalves et al., 2013). Importante a observação de Locatelli et al., (2003), onde o autor diz que o endotélio talvez seja, ao mesmo tempo, a principal fonte e a principal vítima de EROs em nosso organismo.

A hipótese de uma possível associação entre o HPTS e o binômio estresse oxidativo/inflamação encontra fundamento. O PTH, em níveis elevados no sangue, preenche todos os critérios de uma toxina urêmica. Para que uma substância atenda todos os critérios de definição de toxina urêmica, esta deve: ser quimicamente identificada com dosagem quantitativa factível de ser realizada; ter conteúdo corporal maior em pacientes urêmicos do que em não urêmicos; com a redução de suas altas concentrações, diminuir ou cessar sintomas relacionados especificamente a tal substância; ter atividade biológica comprovada em estudos *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*; ter suas concentrações nestes estudos em conformidade com aquelas encontradas em fluidos corporais ou tecidos de pacientes urêmicos (Vanholder et al., 2003). O PTH participa ainda de processos patológicos que incluem perda da massa óssea, calcificações vasculares e valvares, anemia, fibrose miocárdica, hipertensão e intolerância à glicose (Schiepatti et al., 2005).

Adicionalmente, Natoli et al. (2013) demonstraram relação direta entre níveis de PTH e mortalidade em sua metanálise sobre estudos com pacientes renais crônicos, assim como Van Ballegooijen et al. (2013) em uma população geral. Um possível papel do hiperparatireoidismo na produção/exacerbação da inflamação/estresse oxidativo da uremia é sugerido pela demonstração de relação direta entre níveis de PTH e de marcadores inflamatórios em pacientes com hiperparatireoidismo primário (Grey et al., 1996 e Nakchbandi et al., 2002). Além disso, sabe-se que, em casos de aldosteronismo secundário como, por exemplo, o verificado em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, onde ocorre perda urinária excessiva de cálcio e magnésio, ocorre o desenvolvimento de hiperparatireoidismo secundário na tentativa de corrigir estas perdas. O HPTS encontrado nesta situação promove, a despeito de níveis normais ou reduzidos de cálcio sérico, grande

aumento da concentração intracelular de cálcio, acarretando aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, um fenômeno conhecido como paradoxo do cálcio (Vidal et al., 2005 e Chhokar et al., 2005).

No entanto, o sentido de uma possível correlação entre inflamação e níveis de PTH em pacientes em hemodiálise não se encontra definido na literatura, uma vez que outros estudos ou não demonstraram tal relação ou sugeriram que níveis muito baixos de PTH é que se associam à inflamação aumentada (Navarro-Gonzalez et al., 2009; Ogard et al., 2005).

O estudo de possíveis associações entre o grau de HPTS, inflamação e estresse oxidativo em pacientes renais crônicos em hemodiálise pode ajudar a elucidar uma possível participação do PTH, atuando como uma toxina urêmica, nestes fenômenos biológicos.

2 OBJETIVOS

2a OBJETIVO PRIMÁRIO

Verificar correlação entre os níveis séricos de PTH e os níveis séricos de alguns marcadores de estresse oxidativo (potencial antioxidante total plasmático, dialdeído malônico, hidroperoxidação lipídica, produtos de oxidação proteica avançada e quantificação de metabólitos do óxido nítrico) e de inflamação (interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral-alfa) em pacientes renais crônicos em hemodiálise.

2b OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar a correlação entre os níveis séricos de PTH e de alguns parâmetros laboratoriais e de adequação dialítica (cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, vitamina D, ferritina, hemoglobina, dose utilizada de eritropoietina e albumina) em pacientes renais crônicos em hemodiálise.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.a DELINEAMENTO

Estudo transversal

3.b POPULAÇÃO

Pacientes renais crônicos em tratamento hemodialítico em duas unidades de hemodiálise em Londrina (Instituto do Rim e Histocom Atividades Médicas)

3.c AMOSTRAGEM

Os pacientes convidados a participar do estudo, com idade maior que 18 anos, em hemodiálise por fistula arteriovenosa (nativa ou prótese) há pelo menos três meses, foram recrutados entre os meses de maio e julho de 2012. Foram excluídos pacientes em hemodiálise com cateter venoso temporário, portadores de neoplasias, infecção ativa ou que tenha motivado internação nos últimos quinze dias, além de portadores de hepatite B, C ou vírus da imunodeficiência humana. Foram alocados 180 pacientes. As diálises são realizadas em sessões de 210 a 240 minutos, com fluxo de sangue de 300 a 450 ml/min e dialisato de 500 ml/min, três vezes por semana. Os capilares utilizados são de triacetato de celulose com área de superfície de acordo com a superfície corpórea do paciente. A qualidade da água do centro de diálise atende todos os requisitos de água pura de acordo com a legislação nacional. A diálise tem como alvo de Kt/V não equilibrado de 1,2. O Kt/V é uma unidade adimensional que avalia a remoção da uréia em uma sessão de hemodiálise, e é utilizado como uma medida de adequação dialítica. Os participantes foram orientados sobre o estudo e todos que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado e registrado sob o nº 07791 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina. Utilizando-se de revisão de prontuários e entrevistas, foram coletados dados demográficos, antropométricos, tempo em diálise, doença de base, comorbidades, medicações em uso e histórico de paratireoidectomia. Em nosso serviço, realizamos paratireoidectomia total, sem realização de autoimplante. A dose considerada de eritropoietina foi baseada nos últimos 30 dias antes da coleta das amostras de sangue, em U/kg/semana. Os pacientes foram ainda questionados sobre tabagismo atual (sim ou não).

Dos 180 pacientes que atendiam aos critérios de inclusão, foram excluídos 12, sendo quatro por motivo de óbito, quatro por infecção ativa, dois por coleta inadequada, um por uso de introdução de cateter venoso para hemodiálise e um por melhora da função renal e saída da terapia dialítica.

3.d ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Para as análises bioquímicas, amostras de sangue dos pacientes (aproximadamente 20 mL) foram obtidas no momento da punção para o início da hemodiálise em tubos com vácuo (Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ USA) sem anticoagulante, após orientação de 8 horas de jejum. Todas as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm (830 g) durante 15 minutos. O soro obtido permaneceu armazenado a -70°C até a realização das análises. Para a coleta, todos os pacientes que utilizavam o ferro parenteral regularmente nas sessões de hemodiálise tiveram suspensa a administração desta medicação por pelo menos uma semana antes da coleta. Foram dosados níveis séricos de creatinina, ureia pré e pós-sessão (para cálculo da eficiência da diálise, ou Kt/V), ferro sérico, ferritina, saturação de transferrina, hematócrito/hemoglobina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, ácido úrico e albumina, segundo técnicas padrão no laboratório de rotina. O paratormônio intacto (PTHi) foi dosado por eletroquimioluminescência (Modular Analytics E170, Roche, Mannheim, GER). As dosagens laboratoriais de vitamina D foram feitas pelo método de quimioluminescência (QL) (Architect i2000, Abbot, IL, USA).

3.e MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS DE INFLAMAÇÃO

A mensuração de parâmetros de inflamação foi feita através da dosagem de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), todos por ELISA.

3.f MENSURAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para mensuração do estresse oxidativo, utilizamos o seguinte painel: Potencial Antioxidante Total Plasmático – TRAP, quantificação de hidroperóxidos lipídicos por espectrofotometria – FOX, dosagem de metabólitos do óxido nítrico – NOx , dosagem de

dialdeído malônico – MDA e quantificação dos produtos de oxidação proteica avançada – AOPP, com descrição das técnicas utilizadas feitas a seguir:

3.f.i Determinação de Hidroperóxidos Lipídicos

Para a quantificação da hidroxidação lipídica (FOX) foi utilizada uma adaptação da técnica descrita por Jiang et al. (1991). O método é baseado na oxidação de íons ferrosos para íons férricos sob condições ácidas pelos peróxidos, que reagem com o corante indicador (xylenol laranja) e produzem um complexo colorido. O reagente FOX foi preparado dissolvendo 10 mL ácido sulfúrico (H_2SO_4) 250 mM; 88 mg de BHT; 7,6 mg de xylenol laranja e 9,8 mg de sulfato ferroso amoniacal em 90 mL de metanol. Partindo de um padrão 1,1,3,3-tetraetóxiopropano (TEP) 4 mM realizou-se uma diluição seriada para obter as concentrações de 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 mM.

A curva de calibração foi preparada misturando-se 100 μ L de cada um dos padrões citados com 900 μ L do reagente FOX e para as amostras 100 μ L de plasma foram misturadas com 900 μ L do reagente FOX. Ambos foram incubados à temperatura ambiente durante 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos em centrífuga EVLAB[®] (Londrina, PR, Brasil) e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Helios α Thermo Spectronic[®] (Waltham, MA, USA) em comprimento de onda de 560 nm.

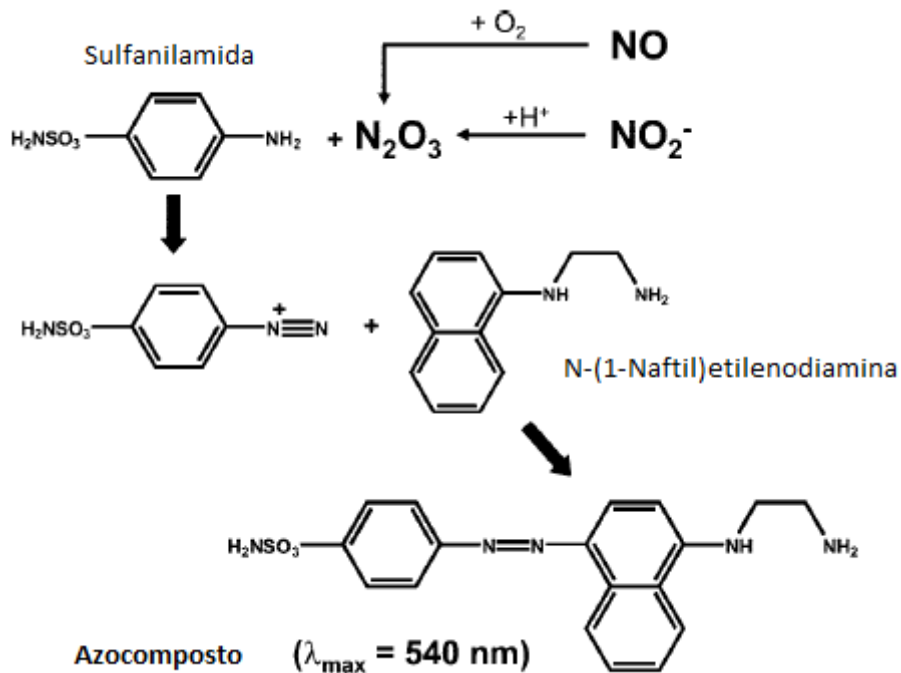
3.f.ii Determinação de Metabólitos do Óxido Nítrico

Os níveis de óxido nítrico foram avaliados indiretamente por meio da determinação da concentração de nitritos plasmáticos, utilizando uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzalez et al. (1998). O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de oxirredução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela complexação com o reagente de Griess no comprimento de onda de 550 nm (Figura 2).

A primeira etapa, realizada em microtubos, consistiu na desproteinização de 60 μ L de plasma adicionando 60 μ L de sulfato de zinco 75 mmol/L. Os tubos foram agitados durante 30 segundos em um agitador de tubos tipo vórtex. Em seguida foram centrifugados a 10000 rpm (9224 g) por 2 minutos à temperatura ambiente em uma centrífuga refrigerada Hettich Rotina 46R[®] (Tuttlingen, GER) e posteriormente adicionados 70 μ L de hidróxido de

sódio 55 mmol/L. Os tubos foram novamente agitados por 30 segundos e centrifugados a 10000 por 5 minutos. Logo após, 150 µL do sobrenadante foram recuperados em tubos de ensaio e diluídos com 50 µL de tampão glicina 45 g/L, pH 9,7.

Figura 2– Reações químicas envolvidas na análise de NOx.



Fonte: Adaptado de Tarpey, Wink, Grisham, 2003.

Para uma avaliação mais precisa, é necessário reduzir os íons nitrato presentes a íons nitrito. Esta transformação foi realizada por meio do tratamento da amostra com grânulos de cádmio. Os grânulos de cádmio, depois de lavados 3 vezes com água deionizada, foram colocados em contato com uma solução de sulfato de cobre 5mmol/L em tampão glicina (15 g/L, pH 9,7) por 5 min com agitação manual. Os grânulos ativados devem ser utilizados dentro de 10 minutos, de modo que grânulos de cádmio foram adicionados às amostras desproteïnizadas nos tubos de ensaio. Estes então foram deixados em agitação contínua por 10 minutos em agitadores de Kline.

Em seguida, 100 µL da solução foram transferidos para uma microplaca para a determinação dos nitritos e os grânulos foram lavados e armazenados em uma solução de H₂SO₄, pois eles podem ser regenerados para repetição destas etapas. Para a determinação de nitritos utiliza-se o reagente 1, preparado dissolvendo-se 2 g de sulfanilamida em 100 mL de ácido fosfórico 5%, e o reagente 2, preparado dissolvendo-se 200 mg de dicloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina em 100 mL de água destilada. Nos poços contendo as amostras foram

adicionado 50 μL do reagente 1 e 50 μL do reagente 2 e foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. O padrão estoque 100 mM foi preparado dissolvendo 69 mg de nitrito de sódio em 10 mL de água deionizada. A partir do padrão estoque realizou-se uma diluição seriada para obter as concentrações de 125; 62,5; 31,25; 15,625 e 7,8125 $\mu\text{mol/L}$. A curva de calibração recebeu o mesmo tratamento que as amostras. A quantificação de óxido nítrico foi feita em uma leitora de microplaca Asys Expert Plus Biochrom® (Holliston, MA, USA) em comprimento de onda de 540nm.

3.f.iii Determinação do Potencial Antioxidante Total Plasmático

O TRAP foi avaliada por QL em uma adaptação do método da técnica descrita por Repetto et al. (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no plasma.

Ao meio de reação (171 μL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6) foram acrescentados 9,5 μL de luminol em solução aquosa 200 μM , 5 μL de plasma diluído 1:20 em tampão glicina e 9,5 μL de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2-amidinopropano) 200 mM. O 2,2' azo-bis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular (Yokozawa, 2000). Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo QL. Esta reação é inibida pela superóxido dismutase, catalase e análogos da vitamina E.

A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução t_i) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes até que os radicais livres sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 9,5 μL na concentração de 20 μM em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma permite obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox.

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca (Victor X-3, Perkin Elmer, EUA), em um modo de contagem não coincidente por 25 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620nm. Os valores obtidos foram corrigidos para os níveis séricos de ácido úrico.

3.f.iv Determinação dos Produtos de Oxidação Proteica Avançada

Para a quantificação de AOPP no plasma foi utilizado o método descrito por Witko-Sarsat et al. (1998). O método baseia-se na reação das proteínas oxidadas com o iodeto de potássio em meio ácido. As amostras foram diluídas 1:5 em tampão fosfato salino (PBS) onde foram adicionados 100 μ L de ácido acético e 50 μ L de iodeto de potássio 1,16 M. A curva de calibração foi obtida a partir da solução estoque cloramina T 1 mM diluída com PBS e a diluição seriada foi realizada para obter-se as concentrações de 100; 50; 25; 12,5; e 6,25 μ M. Após isso, os padrões receberam o mesmo tratamento que as amostras.

A absorbância da reação foi imediatamente lida em espectrofotômetro Helios α Thermo Spectronic® (Waltham, MA, USA) a 340 nm contra um branco contendo 1000 μ L de PBS, 100 μ L de ácido acético e 50 μ L de iodeto de potássio. A concentração de AOPP foi expressa em μ moles/L de equivalente de cloramina T.

3.f.v Determinação dos níveis de Dialdeído Malônico plasmático (MDA)

Para avaliar os níveis de dialdeído malônico (MDA) no plasma foi utilizado a metodologia descrita por Bastos et al. (2012), com ligeiras modificações para medir o MDA no soro. A formação de MDA ocorre pela decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e tecidos. Este método consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. A quantificação do MDA será feita por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

3.g ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, de acordo com a normalidade ou não dos dados. Para testar as hipóteses nulas sobre as médias ou medianas foi aplicado teste “t” de Student e Mann Whitney, respectivamente, quando duas amostras independentes, e nos casos com mais de dois grupos, utilizou-se a análise de variância paramétrica (ANOVA) e não-paramétrica (Kruskal-Walis), de acordo com a distribuição dos dados. Como a maioria dos dados mostrou distribuição não-normal, a correlação entre os níveis de PTH e outras variáveis contínuas foi

medida pelo coeficiente de Spearman. Realizou-se também uma análise dos níveis do PTH dividido em tercis em relação aos parâmetros de inflamação e estresse oxidativo. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). A análise estatística foi realizada pelo programa SPSS versão 19 (SPSS, Chicago, IL, USA).

REFERÊNCIAS

- Bastos AS, Loureiro AP, de Oliveira TF, Corbi SC, Caminaga RM, Junior CR, Orrico SR. (2012) Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem.* 2012;423(1):141-6.
- Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality and morbidity in maintenance dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2208-18.
- Chhokar VS, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Myers LK, Xing Z, Smith RA, Gerling IC, Weber KT. Hyperparathyroidism and the calcium paradox of aldosteronism. *Circulation.* 2005;111(7):871-8.
- Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences and therapy. *Semin Dial.* 2001;14:193-9.
- Ferreira A. Diagnóstico Clínico e Laboratorial do Hiperparatireoidismo Secundário. *J Bras Nefrol.* 2008;30(Supl 1):11-7.
- Gonçalves MS, Fabris BA, Brinholi FF, Bortolaschi CC, Watanabe MA, Oliveira KB, Delfino VD, Lavado EL, Barbosa DS. Increased oxidative stress in foam cells obtained from hemodialysis patients. *Hemodial Int.* 2013;17(2):266-74.
- Grey A, Mitnick MA, Shapses S, Ellison A, Gundberg C, Insogna K. Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption – a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3450-4.
- Gueiros JEB, Hernandez FR, Karohl C, Jorgetti V. Prevenção e tratamento do hiperparatireoidismo secundário na DRC. *J Bras Nefrol.* 2011;33 (Supl1):7-14.
- Handelman GJ. Evaluation of oxidant stress in dialysis patients. *Blood Purif.* 2000;18: 343-49.
- Himmelfarb J, McMonagle E. Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif.* 2001;19(2):200-5.
- Jiang, Z., Woollard, A.C.S. & Wolff, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an idometric method. *Lipids.* 1991;26:853-56.
- Jorgetti, V. Visão geral da doença óssea na doença renal crônica (DRC) e nova classificação. *J Bras Nefrol.* 2008;30(Supl 1):4-5.
- Jüppner H. Phosphate and FGF-23. *Kidney Int Suppl.* 2011;(121):24-7.
- Kuro-O M. Phosphate and Klotho. *Kidney Int Suppl.* 2011;(121):20-3.

- Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B. Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:2680-87.
- Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:1272-80.
- Nakchbandi IA, Mitnick MA, Lang R, Gundberg C, Kinder B, Insogna K. Circulating levels of interleukin-6 soluble receptor predict rates of bone loss in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:4946-51.
- Näppi S, Saha H, Virtanen V, Limnell V, Sand J, Salmi J, Pasternack A. Left ventricular structure and function in primary hyperparathyroidism before and after parathyroidectomy. *Cardiology*. 2000;93:229-33.
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(Suppl 3):70-7.
- Natoli JL, Boer R, Nathanson BH, Miller RM, Chirolu S, Goodman WG, Belozeroff V. Is there an association between elevated or low serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and mortality in patients with end stage renal disease? A meta-analysis. *BMC Nephrol*. 2013;14(1):88.
- Navarro-González, J.A., García-Benayas, C. & Arenas, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem*. 1998;44:679-81.
- Navarro-González JF, Mora-Fernandez C, Muros M, Herrera H, Garcia J. Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4:1646-54.
- Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:335-40.
- Ogard CG, Engelmann MD, Kistorp C, Nielsen SL, Vestergaard H. Increased plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and markers of inflammation related to atherosclerosis in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol. (Oxf)*. 2005;63(5):493-8.
- Parfrey PS, Foley RN. The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10:1606-15.
- Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; Suppl 11:28-31.
- Pereira RC, Jüppner H, Azucena-Serrano CE et al. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone*. 2009;45:1161-8.
- Repetto, M., Reides, C. & Carretero, M.L.G. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta*. 1996;255:107-17.
- Sampaio EA, Lugon JR, Barreto FC. Fisiopatologia do hiperparatireoidismo secundário. *J Bras Nefrol*. 2008;30 (1-Supl.1):6-10.

Sampaio EA, Moysés RMA. Paratireoidectomia na DRC. *J Bras Nefrol.* 2011;33 Supl1:31-34.

Schiepatti A, Pisoni R, Remuzzi G. Pathophysiology and management of chronic kidney disease. In: Greenberg A, Cheung Ak, Coffman TM, Falk RJ, Jennette JC, editors. *Primer on Kidney Diseases - NKF*; 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. P.444-54.

Sies H. Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82:291-5.

Slatopolsky E. The intact nephron hypothesis: the concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder. *Kidney Int.* 2011;79 (Suppl 121):3-8.

van Ballegooijen AJ, Reinders I, Visser M, Dekker JM, Nijpels G, Stehouwer CD, Pilz S, Brouwer IA et al. Serum parathyroid hormone in relation to all-cause and cardiovascular mortality: the Hoorn study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):638-45.

Vanholder R, Glorieux G, De Smet R, Lameire N; European Uremic Toxin Work Group. New insights in uremic toxins. *Kidney Int Suppl.* 2003;(84):6-10.

Vidal A, Sun Y, Bhattacharya SK. Calcium paradox of aldosteronism and the role of parathyroid glands. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;290:286-94.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drueke T, Descamps-Latscha B. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol.* 1998;161:2524-32.

Yokozawa T, Cho EJ, Hara Y, et al. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J Agric Food Chem.* 2000;48:5068-73.

4 ARTIGO

SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM, INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN HEMODIALYSIS PATIENTS.

(Submetido ao Journal of Bone and Mineral Metabolism)

Vinicius Daher Alvares Delfino¹¹; Chiara Cristina Bortolasci²²; Décio Sabatini Barbosa³³; Helena Kaminami Morimoto³; Larissa Ferreira⁴⁴; Fernanda Burle dos Santos Guimarães⁴; Raquel Nassar Frange⁴; Altair Jacob Mocelin^{*}; Marcel Jaqueto¹

All affiliated to State University of Londrina, Paraná, Brazil

Corresponding Author

Marcel Jaqueto

Adress: Bandeirantes Avenue, 804 – Zip Code 86010-020 – Londrina – PR – Brazil

Phone number and Fax: 55-43-3376-9100

Email: mjaqueto@gmail.com

Abstract: Cardiovascular mortality accounts for approximately 50% of deaths in patients with chronic kidney disease (CKD) on dialysis. In addition to the traditional risk factors (hypertension, *diabetes mellitus*, among others), CKD patients are affected by non-traditional factors, such as secondary hyperparathyroidism, inflammation and oxidative stress. The aim of this study was to evaluate the possible association between parathyroid hormone (PTH) levels and biochemical parameters of inflammation (interleukins 1 and 6, tumor necrosis factor-alpha) and oxidative stress (total plasma antioxidant capacity, malonic dialdehyde, lipid hydroperoxidation, advanced oxidation protein products, quantification of nitric oxide metabolites). A cross-sectional study was performed in which blood samples were analyzed from 168 patients of two hemodialysis centers in Londrina, Paraná, Brazil. Patients with conditions known to generate oxidative stress and inflammation were excluded. Statistical analyzes by placing the level of PTH as the continuous variable did not show any association between this hormone and parameters of inflammation/oxidative stress. When PTH was

¹ 1 – Division of Nephrology; Department of Internal Medicine

² 2 – Research and Postgraduate Laboratory

³ 3 - Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analyses

⁴ 4 – Medicine Undergraduates

* - *in memorian*

categorized into tertiles, higher values of lipid hydroperoxidation were observed in the third tertile compared to the first ($p = 0.016$), while no significant differences were found between tertiles for the other parameters of oxidative stress and inflammation assessed. The results of this study lead us to conclude that the increased inflammation and oxidative stress of hemodialysis patients probably arise from mechanisms other than secondary hyperparathyroidism, or that it contributes very little to the genesis of these phenomena.

Keywords: Hyperparathyroidism. Oxidative stress. Inflammation. Hemodialysis. Chronic kidney disease (CKD).

INTRODUCTION

Individuals with chronic kidney disease (CKD) undergoing dialysis have a mortality rate that is 20-100 times higher than that of the normal population, with cardiovascular disease being the major contributor to this excess mortality [1]. Traditional cardiovascular risk factors (e.g., hypertension, diabetes mellitus, smoking, dyslipidemia, and sedentary lifestyle, among others) are high in this population, but these factors do not fully explain this high mortality. Other nontraditional factors contribute to the increased risk of cardiovascular mortality in these patients, including disorders of bone and mineral metabolism in CKD (CKD-MBD), oxidative stress, and chronic inflammation [2,3]. The generation of reactive oxygen species (ROS) also increases inflammation. ROS are released from monocytes and polymorphonuclear cells with proinflammatory cytokines, which amplify, in turn, the generation of oxidants [4]. CKD patients experience augmented inflammation and oxidative stress, either because of the high prevalence of diabetes mellitus and advanced age, or because of uremia [5] and dialysis therapy [6,7]. This chronic inflammation also leads to increased levels of atherosclerosis [8].

Secondary hyperparathyroidism (SHPT) is part of CKD-MBD and is characterized by high levels of parathyroid hormone (PTH) associated with high-turnover bone disease and vascular calcification. In high levels, PTH acts as a uremic toxin and contributes to bone loss, vascular and valvular calcification, anemia, cardiomyopathy, hypertension and glucose intolerance [9]. PTH levels also correlate with inflammatory markers in patients with primary hyperparathyroidism (HPT) [10,11,12] and SHPT from hyperaldosteronism [13,14,15]. However, these findings are controversial, and other studies found that very low levels of PTH are associated with increased inflammation [16,17].

The purpose of this study was to evaluate the association between SHPT, inflammation and oxidative stress in uremic patients. The goal was to understand the role of

SHPT in the genesis of these biological phenomena in chronic hemodialysis patients. We also evaluated the relationship between PTH and laboratory parameters (i.e., calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, vitamin D, ferritin, hemoglobin, erythropoietin [EPO] dose, and albumin) to characterize PTH activity in these patients.

MATERIALS AND METHODS

Design and Population

A cross-sectional study was performed in 2 hemodialysis units in the city of Londrina, Parana state, Brazil. Patients were recruited between May and July, 2012. Inclusion criteria were as follows: age 18 years or older and on hemodialysis with arteriovenous fistula (native or graft) for at least 3 months. Exclusion criteria were as follows: hemodialysis with temporary central venous catheter, neoplasm, active infection that caused hospitalization in the 15 days before blood collection, hepatitis B or C and human immunodeficiency virus. Of the 180 selected patients who met the inclusion criteria, 12 patients were removed from the final analysis, due to death (4), active infection during blood collection (4), inadequate blood collection (2), introduction of a venous catheter for hemodialysis (1), improved renal function leading to discharge from the dialysis center (1).

Dialysis sessions took between 210 to 240 minutes, with a blood flow of 300 to 450 ml/min and dialysate at 500 ml/min, three times per week. The dialyzers were hollow fiber cellulose triacetate (surface area depended on the patient's body surface), with pure water in the dialysate. The dialysis target was an unbalanced Kt/V of 1.2. The Kt/V is a dimensionless unit that evaluates urea removal in a hemodialysis session. It is used as a measure of hemodialysis adequacy. Participants provided written informed consent prior to participation. The study was approved and registered (No. 07791) by the Ethics Committee of the Londrina State University.

Data Collection

Through chart review and interviews, we collected demographic data and information regarding time on dialysis, underlying disease, comorbidities, medication use, and history of parathyroidectomy from all patients. We performed total parathyroidectomy without autoimplantation. The mean dose of EPO (in U/kg/week) was based on the last 30 days before blood sample collection. Patients were asked about their current smoking status (yes or no).

Biochemical Analysis

Blood samples of patients (~20 mL) were obtained at the time of puncture for initiation of hemodialysis, after 8 hours of fasting. Samples were collected in vacuum tubes (Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, USA) without anticoagulant, and centrifuged at 830 g for 15 minutes. The resulting serum was stored at -70 °C until analysis. All patients with regular parenteral iron use during hemodialysis had suspended use of this medication for at least 1 week before the collection procedure.

Laboratory parameters

Serum creatinine, urea before and after the session (for calculation of efficiency of dialysis or Kt/V), ferritin, hematocrit/hemoglobin, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, uric acid, and albumin were measured according to standard techniques. Intact parathyroid hormone (iPTH) was measured by electrochemiluminescence (Modular Analytics E170, Roche, Mannheim, Germany). To avoid variation in nomenclature throughout this paper, we have chosen the use of the acronym PTH, even though the performed dosage was of the intact molecule. The laboratory levels of vitamin D (25 (OH) D) were made by chemiluminescence (Architect i2000, Abbott, IL, USA).

Inflammation parameters

Levels of interleukin (IL)-1, IL-6, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were measured by ELISA.

Oxidative stress

Oxidative stress was analyzed through the levels of the total plasma antioxidant capacity (TRAP), lipid hydroperoxidation (FOX), nitric oxide metabolites (NO_x), malonic dialdehyde (MDA), and advanced oxidation protein products (AOPPs). The FOX level was quantified using the spectrophotometric technique described by Jiang et al., based on the oxidation of ferrous to ferric ions under acidic conditions by peroxides [18]. Peroxide reacts with the indicator dye (xylenol orange) to produce a colored complex that is read by spectrophotometry (Helios α ThermoSpectronic®, Waltham, MA, USA) at 560 nm.

NO_x levels were assessed indirectly by determining the concentration of plasma nitrites, using an adaptation of the method described by Navarro-Gonzalez et al. [19]. The method is based on the reduction of nitrate to nitrite, mediated by redox reactions between nitrate in the sample and system with copper-cadmium reagents, resulting in diazotization. The compound formed by complexation with Griess reagent is detected

colorimetrically at 550 nm. TRAP was measured by chemiluminescence based on an adaptation of the method described by Repetto et al. [20]. The 2,2' azo-bis rapidly generates peroxy radicals via interaction with carbon-centered radicals and molecular oxygen. These free radicals react with luminol (which acts as an amplifier), producing chemiluminescence. The addition of plasma reduces the baseline levels of chemiluminescence for a period of time (induction time) proportional to the concentration of plasma antioxidants. Once the free radicals regenerate, chemiluminescence returns to its initial levels. The system was calibrated with a vitamin E analogue (Trolox). A comparison of the induction time after the additions of Trolox and plasma gives TRAP values of Trolox equivalents. The obtained values were corrected for serum uric acid.

To quantify AOPPs, we used the method described by Witko-Sarsat et al., based on the reaction of oxidized proteins with potassium iodide under acidic conditions [21]. The absorbance of the reaction was immediately read in a spectrophotometer (Helios α ThermoSpectronic $\text{\textcircled{R}}$) at 340 nm. To assess levels of serum MDA, we modified the method described by Bastos et al. [22]. The formation of MDA occurs by decomposition of lipid hydroperoxides. Its concentration has been used to estimate the intensity of lipid peroxidation in cells and tissues. This method consists of measuring a pink chromogen formed by the reaction of MDA with 2 molecules of thiobarbituric acid under acidic conditions and at high temperatures, with quantification by high performance liquid chromatography (HPLC).

Statistical Analysis

Quantitative variables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR), depending on the normality of the data. To test the null hypotheses over the means and medians, we applied Student's *t* test and the Mann Whitney test, respectively, for two independent samples. For more than two groups, we used the parametric analysis of variance (ANOVA) and nonparametric analysis (Kruskal-Wallis) according to the distribution of data. Because most data did not follow a normal distribution, the correlation between PTH and other continuous variables was measured by the Spearman correlation coefficient. We also performed a correlation analysis of the PTH divided into tertiles with parameters of inflammation and oxidative stress. The level of significance was 5% ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed using SPSS version 19 (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Of the 180 patients selected for the study, 168 were included in the statistical analysis. Measurement of oxidative stress parameters was performed in all patients. Vitamin D was measured in 166 patients. Levels of IL-1, IL-6, and TNF- α were measured in 154 patients due to lack of material collected in 14 patients. General patient characteristics are shown in Tables 1 and 2. The patient population contained a high prevalence of male, Caucasian patients. The median time on dialysis was 47 months. The prevalence of diabetes mellitus was 28%. The most common baseline renal disease was hypertensive nephrosclerosis, followed by chronic glomerulonephritis and diabetic nephropathy. The median total PTH was 281.5 pg/mL.

Twenty-six patients (15.4%) underwent parathyroidectomy. These patients had a median PTH of 7.5 pg/mL, compared to 333 pg/mL in non-parathyroidectomized patients. Only 10 of the 26 patients who underwent parathyroidectomy had hypoparathyroidism (PTH <15 pg/mL), 4 had normal serum PTH (1565 pg/mL), and 6 had returned to the SHPT state (PTH > 65 pg/mL). The overall median vitamin D level was 24.7 ng/mL.

The Spearman correlation between PTH levels and inflammatory markers (IL-1, IL-6 and TNF- α) or oxidative stress (NO_x, MDA, FOX, AOPP and TRAP) was not statistically significant (Table 3). The Kruskal-Wallis test showed a positive association between FOX levels and the first and third tertiles of PTH levels ($p = 0.016$, Graphic 1). No other parameters of oxidative stress or inflammation were significantly associated with PTH tertiles. A subgroup analysis of non-parathyroidectomized ($n = 142$) versus parathyroidectomized patients who persisted with hypoparathyroidism (PTH <15 pg/mL, $n = 16$), along with the exclusion of patients with parathyroidectomy and PTH ≥ 15 pg/mL ($n = 10$), showed no significant differences in oxidative stress and inflammation (Table 4). We found a negative correlation between PTH and TRAP in the subgroup of diabetic patients ($p = 0.02$). Correlation analysis of PTH (as the continuous variable) and hemoglobin, ferritin, EPO dose, calcium, phosphorus, vitamin D, serum albumin, or alkaline phosphatase showed a positive correlation for PTH levels and alkaline phosphatase ($p = 0.000$, Table 5).

Given their antioxidant and anti-inflammatory effects, we used PTH as the continuous variable and performed a dichotomized analysis between patients receiving inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin receptor blockers (ARBs), statins, and calcitriol. No significant statistic association was found.

DISCUSSION

This study aimed to correlate the presence of high levels of PTH, resulting from SHPT in CKD, with parameters of inflammation and oxidative stress in chronic renal failure patients on hemodialysis. HPT is implicated in increased cardiovascular risk in the general population and in CKD patients, in part because of its relationship to inflammation and ROS generation [23,24]. The explanation for this exacerbated inflammatory state in HPT (primary or secondary to aldosteronism, for example) is based on the increase in intracellular and mitochondrial free calcium - the calcium paradox - which favors the production and release of ROS. In subjects undergoing states of aldosteronism (found, for example, in patients with congestive heart failure), excessive urinary loss of divalent cations such as calcium and magnesium occurs. This loss leads to the development of SHPT in an attempt to correct these losses. The HPT found in this situation promotes, despite normal or low serum calcium, large increase in intracellular calcium and increased ROS levels [14,15]. Increased intracellular calcium and ROS open mitochondrial channels (called permeability transition pore [PTP]), causing swelling and mitochondrial dysfunction, with subsequent evolution to cellular necrosis. The repair process of this cardiomyocyte necrosis evolves with areas of myocardial fibrosis, thus increasing the risk of heart disease (left ventricular hypertrophy, arrhythmias, and heart failure) [25].

Vidal et al. demonstrated that parathyroidectomy in rats with induced aldosteronism prevented the increase in oxidative (H_2O_2 production by monocytes) and nitrosative ($\alpha 1$ -antiproteinase activity in plasma) stress. Although several studies have demonstrated increased tissue and serum ROS associated with binomial calcium paradox/HPT, in general these studies included only cases of experimental aldosteronism or aldosteronism secondary to congestive heart failure [14,15,26]. In patients with primary HPT, there are reports of improvement [27], deterioration [28], or unchanged [17] inflammatory markers after parathyroidectomy.

We found that parathyroidectomized patients with PTH persistently below 15 pg/mL showed similar levels of oxidative stress and inflammation compared to non-parathyroidectomized patients. This lack of relationship between PTH and inflammation/oxidative stress may be because both kidney dysfunction and renal replacement therapy in CKD patients regulate ROS and inflammation more than other factors, such as SHPT [29,30]. Parenteral iron and EPO agents, as well as temporary vascular access and infections, may exacerbate the inflammatory state [31]. To minimize these biases, we

performed blood sampling immediately before the start of the session, suspended the administration of parenteral iron 1 week before collection, and excluded patients with venous central catheters or recent infections. We did not identify any correlations between EPO dose and biomarkers.

In our study, analysis with PTH as a continuous variable did not correlate with parameters of inflammation or oxidative stress. Noyan et al., in a recent study with 50 hemodialysis patients and 20 control subjects, found similar results [32]. In that study, dialysis patients were categorized into 2 groups according to PTH levels >300 pg/mL and <300 pg/mL. They evaluated with a panel for oxidized compounds (AOPP, MDA, myeloperoxidase) and antioxidants (catalase, ascorbic acid). They found a decrease in catalase activity in patients with PTH >300 pg/mL. We found a significant association of the highest tertile of PTH with FOX levels compared to the first tertile, but no other significant differences.

We found a negative correlation between PTH and TRAP in patients with diabetes mellitus, consistent with literature reports of reduced antioxidant defenses in diabetic patients and correlations with diabetic complications and severity [33,34,35]. However, the role of PTH in the imbalance of oxidation and antioxidant activity is unclear. PTH levels did not correlate with the common laboratory variables measured in dialysis patients, such as hemoglobin, EPO dose, ferritin, calcium, phosphorus, 25 (OH) D, or albumin, but did positively correlate with alkaline phosphatase, a marker of bone remodeling related to SHPT severity [36]. PTH levels did not correlate negatively with hemoglobin or positively with EPO dose. This result is somewhat surprising, as primary [37,38] and secondary [39,40] HPT is classically associated with anemia. PTH may directly inhibit erythropoiesis or red cell progenitors or induce bone marrow fibrosis [41]. Tatal et al. showed that inflammation may act synergistically, as patients undergoing hemodialysis with PTH > 350 pg/mL and increased C-reactive protein levels showed greater resistance to EPO [42].

Pro-inflammatory cytokines such as IL-1 and TNF- α can inhibit erythropoiesis, but we did not find a correlation between levels of these cytokines and hemoglobin or EPO dose (data not shown). Ferritin, a biochemical marker classically linked to inflammation, did not correlate with PTH or the assessed biomarkers of inflammation and oxidative stress (data not shown). Reducing parenteral iron supplementation for 1 week may have been sufficient, although others reported the same lack of association in dialysis patients regardless of whether they received intravenous iron or not [43]. PTH levels did not correlate with albumin, an indicator of nutritional status and a negative marker of inflammation, which

is consistent with other results of this study. PTH levels also did not correlate with calcium or phosphorus levels. In a study of CKD patients not on dialysis, Navarro-Gonzalez et al. found an association between levels of inflammation (IL-6 and TNF- α) with serum phosphorus, but not with PTH [44]. PTH levels did not correlate with vitamin D. Two other studies have shown no or only weak correlations in CKD patients and the general population [45,46]. In the same line, some clinical trials showed only a slight reduction in PTH levels with replacement therapy with ergocalciferol in CKD [47,48]. In contrast, Gracia-Iguacel et al., in a population of dialysis patients (hemodialysis, hemodiafiltration, and peritoneal dialysis) found, in univariate analysis, a negative correlation between PTH and 25 (OH) D [49].

We found a high prevalence of decreased vitamin D levels in this dialysis population, with a median of 24.5 ng/mL. The percentage of patients with inadequate levels (defined by the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) as <30 ng/mL) [50] reached nearly 80%, with 69.3% of patients with insufficiency (15-30 ng/mL) and 9.6% with deficient levels of 25(OH)D (<15 ng/mL), consistent with other studies [49,51]. There was no correlation of vitamin D levels with parameters of inflammation or oxidative stress (data not shown).

The relationship between inflammation, oxidative stress, and SHPT is of great scientific interest. Although this study was not the first to examine this relationship in dialysis patients, it is the largest reported. For evaluation of ROS, we used, as recommended, a panel of biomarkers rather than a specific marker, using well established measurement techniques and seeking to exclude from the analysis patients or conditions that could interfere with ROS generation or the inflammatory state. One limitation of the study is its cross-sectional nature, which prevents the determination of the relationship between cause and effect. Other limitations are the fact that hemoglobin adequacy was determined by the assistant nephrologist, and the limited breadth of the panel of oxidative stress biomarkers, as other markers of oxidative stress may have been more informative in hemodialysis patients [43].

In conclusion, despite the evidence of a relationship between hyperparathyroidism, the calcium paradox, and ROS/inflammation, this study did not identify a correlation among PTH levels and most biomarkers in chronic hemodialysis patients; only PTH tertiles correlated with FOX. The subgroup of patients with surgical hypoparathyroidism (despite a small number of subjects) showed similar levels of oxidative stress and inflammation as patients without parathyroidectomy, suggesting that, in dialysis patients, inflammation and oxidative stress are regulated via mechanisms other than HPTS severity.

Additional studies are needed to establish the role of PTH as a uremic toxin that contributes to inflammation and/or oxidative stress in chronic renal patients on hemodialysis therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to acknowledge all the people who really helped in our task: nurses, biochemicals, patients and relatives. We also must acknowledge the effort of our Research and Postgraduate laboratory in the execution of this paper. Very thank you.

CONFLICT OF INTEREST

All authors have no conflicts of interest

REFERENCES

1. Parfrey PS, Foley RN (1999) The clinical epidemiology of cardiac disease in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 10:1606-1615
2. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM (2004) Mineral metabolism, mortality and morbidity in maintenance dialysis. *J Am Soc Nephrol* 15: 2208-2218
3. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zocalli C (2003) Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant* 18:1272-1280
4. Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V (2001) Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences and therapy. *Semin Dial* 14:193-9
5. Himmelfarb J, McMonagle E (2001) Manifestations of oxidant stress in uremia. *Blood Purif.* 19(2):200-5.
6. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Witko-Sarsat V, Druke TB, Lacour B, Thévenin M (2001) Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 16:335-340
7. Lim PS, Wei YH, Yu YL, Kho B (1999) Enhanced oxidative stress in haemodialysis patients receiving intravenous iron therapy. *Nephrol Dial Transplant* 14:2680-7
8. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P (2002) The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 11:28-31.
9. Schieppati A, Pisoni R, Remuzzi G (2005) Pathophysiology and management of chronic kidney disease. In: Greenberg A, Cheung Ak, Coffman TM, Falk RJ, Jennette JC (eds) *Primer on Kidney Diseases - NKF*; 4th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, p.444-454

10. Grey A, Mitnick MA, Shapses S, Ellison A, Gundberg C, Insogna K (1996) Circulating levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are elevated in primary hyperparathyroidism and correlate with markers of bone resorption – a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3450-4.
11. Nakchbandi IA, Mitnick MA, Lang R, Gundberg C, Kinder B, Insogna K (2002) Circulating levels of interleukin-6 soluble receptor predict rates of bone loss in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4946-51.
12. Emam AA, Mousa SG, Ahmed KY, Al-Azab AA (2012) Inflammatory biomarkers in patients with asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Med Princ Pract* 21(3):249 - 253.
13. Tomaschitz A, Ritz E, Pieske B, Fahrleitner-Pammer A, Kienreich K, Horina JH, Drechsler C, März W, Ofner M, Pieber TR, Pilz S (2012) Aldosterone and parathyroid hormone: a precarious couple for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 94(1):10-9
14. Chhokar VS, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Myers LK, Xing Z, Smith RA, Gerling IC, Weber KT (2005) Hyperparathyroidism and the calcium paradox of aldosteronism. *Circulation* 111(7):871-8.
15. Vidal A, Sun Y, Bhattacharya SK (2005) Calcium paradox of aldosteronism and the role of parathyroid glands. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:286-294
16. Navarro-González JF, Mora-Fernandez C, Muros M, Herrera H, Garcia J (2009) Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1646-54.
17. Ogard CG, Engelmann MD, Kistorp C, Nielsen SL, Vestergaard H (2005) Increased plasma N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and markers of inflammation related to atherosclerosis in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63(5):493-8.
18. Jiang Z, Woollard ACS, Wolff SP (1991) Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ in the Presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. *Lipids* 26:853-856.
19. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679-681.
20. Repetto M, Reides C, Carretero MLG (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255:107-117.
21. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B (1998) Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol* 161:2524-32.
22. Bastos AS, Loureiro AP, de Oliveira TF, Corbi SC, Caminaga RM, Junior CR, Orrico SR (2012) Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem* 423(1):141-6.
23. Natoli JL, Boer R, Nathanson BH, Miller RM, Chirolu S, Goodman WG, Belozeroff V (2013) Is there an association between elevated or low serum levels of phosphorus, parathyroid hormone, and calcium and mortality in patients with end stage renal disease? A meta-analysis. *BMC Nephrol* 14(1):88.

24. Van Ballegooijen AJ, Reinders I, Visser M, Dekker JM, Nijpels G, Stehouwer CD, Pilz S, Brouwer IA (2013) Serum parathyroid hormone in relation to all-cause and cardiovascular mortality: the Hoorn study. *J Clin Endocrinol Metab* 98(4):638-45.
25. Rutledge MR, Farah V, Adeboye AA, Seawell MR, Bhattacharya SK, Weber K (2013) Parathyroid hormone, a crucial mediator of pathologic cardiac remodeling in aldosteronism. *Cardiovasc Drugs Ther* (2):161-70.
26. Gandhi MS, Kamalov G, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Sun Y, Gerling IC, Weber KT (2011) Cellular and molecular pathways to myocardial necrosis and replacement fibrosis. *Heart Fail Rev* 16(1):23-4.
27. Tanaka M, Tokunaga K, Maruyama T, Otagiri M, Tominaga Y, Itoh K, Matsushita K, Komaba H, Fukugawa M (2011) Parathyroidectomy markedly reduces oxidative stress in a patient with primary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial* 15 Suppl 1:38-41.
28. Almqvist EG, Bondeson AG, Bondeson L, Svensson J (2011) Increased markers of inflammation and endothelial dysfunction in patients with mild primary hyperparathyroidism. *Scand J Clin Lab Invest* 71:139-144.
29. Popolo A, Autore G, Pinto A, Marzocco S (2013) Oxidative stress in patients with cardiovascular disease and chronic kidney failure. *Free Radic Res* 47(5):346-56.
30. Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drüeke T, Santangelo F, Descamps-Latscha B (2003) AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 64(1):82-91.
31. Morena M, Cristol JP, Canaud B (2000) Why hemodialysis patients are in a prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. *Blood Purif* 18(3):191-9.
32. Noyan T, Avci G, Şekeroglu MR, Erkoç R (2009) The investigation of relationship between secondary hyperparathyroidism and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Turkish Nephrology, Dialysis and Transplantation Journal* 18(2):69-75.
33. Aslan M, Sabuncu T, Kocyigit A, Celik H, Selek S (2007) Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17(10):734-40.
34. Rodríguez-Carrizalez AD, Castellanos-González JA, Martínez-Romero EC, Miller-Arrebillaga G, Villa-Hernández D, Hernández-Godínez PP, Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Cardona-Muñoz EG, Miranda-Díaz AG (2013) Oxidants, antioxidants and mitochondrial function in non-proliferative diabetic retinopathy. *J Diabetes* Jul 22 (Epub ahead of print).
35. Shao N, Kuang HY, Wang N, Gao XY, Hao M, Zou W, Yin HQ (2013) Relationship between Oxidant/Antioxidant Markers and Severity of Microalbuminuria in the Early Stage of Nephropathy in Type 2 Diabetic Patients. *J Diabetes Res* Feb 26. (Epub ahead of print).
36. Ureña P, Hruby M, Ferreira A, Ang KS, de Vernejoul MC (1996) Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 7(3):506.
37. Falko JM, Guy JT, Smith RE, Mazzaferri EL (1976) Primary hyperparathyroidism and anemia. *Arch Intern Med* 136(8):887-9.

38. Boxer M, Ellman L, Geller R, Wang CA (1977) Anemia in primary hyperparathyroidism. *Arch Intern Med* 137(5):588-93.
39. Gallieni M, Corsi C, Brancaccio D (2000) Hyperparathyroidism and anemia in renal failure. *Am J Nephrol* 20(2):89-96.
40. Drüeke TB (1995) R-HuEPO hyporesponsiveness--who and why? *Nephrol Dial Transplant* 10 [Suppl 2]:62-8.
41. Drüeke TB (2001) Hyporesponsiveness to recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant* 16 [Suppl 7]:25-8
42. Total E, Sezer S, Afsar B, Arat Z, Ozdemir FN, Haberal M (2006) Additional effect of hyperparathyroidism on inflammatory status and rHuEPO requirements in hemodialysis patients. *Transplant Proc* 38(9):2807-12.
43. Senol E, Ersoy A, Erdine S, Sarandol E, Yurtkuran M (2008) Oxidative stress and ferritin levels in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 23:665-72.
44. Navarro-González JF, Mora-Fernandez C, Muros M, Herrera H, Garcia J (2009) Mineral metabolism and inflammation in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Clin J Am Soc Nephrol* 4:1646-54.
45. Petchey WG, Johnson DW, Hawley CM, Isbel NM (2012) Predictors of vitamin D status in predialysis chronic kidney patients: a cross-over sectional analysis in a high ultraviolet climate. *J Ren Nutr* 22(4):400-8.
46. Anderson JL, Vanwoerkom RC, Horne BD, Bair TL, May HT, Lappé DL, Muhlestein JB (2011) Parathyroid hormone, vitamin D, renal dysfunction, and cardiovascular disease: dependent or independent risk factors? *Am Heart J* 162(2):331-9.
47. Al Aly Z, Qazi RA, Gonzalez EA, Zeringue A, Martin KJ (2007) Changes in serum 25-hydroxyvitamin D and plasma intact PTH levels following treatment with ergocalciferol in patients with CKD. *Am J Kidney Dis* 50:59-68.
48. Zisman AL, Hristova M, Tammy Ho L, Sprague SM (2007) Impact of ergocalciferol treatment of vitamin D deficiency on serum parathyroid hormone concentrations in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 27:36-43.
49. Gracia-Iguacel C, Gallar P, Qureshi AR, Ortega O, Mon C, Ortiz M, Villarreal I, Garcia-Lacalle C, Olieta A, Sánchez M, Herrero JC, Vigil A, Lindholm B, Carrero JJ (2010) Vitamin D deficiency in dialysis patients: effect of dialysis modality and implications on outcome. *J Ren Nutr* 20(6):359-67.
50. CKD-MBD Work Group. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (2009). KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 113:1-130.
51. Del Valle, E, Negri, AL, Aguirre C, Fradinger E, Zanchetta JR (2007) Prevalence of 25 (OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis. *Hemodial Int* 11:315-321.

Table 1 – General patients characteristics

VARIABLE	RESULTS
Male	110 (65,5%)
Age (years)	54,3 ± 14,3
Time on dialysis (months)	47 (20-90)
Race	
White	113 (67,3%)
Afroamericans	25 (14,9%)
Others	30 (17,9%)
CKD etiology	
HN	57 (33,9%)
CGN	44 (26,2%)
DN	39 (23,2%)
ADPKD	9 (5,4%)
Others	19 (19,3%)
MBP (mmHg)	97,1 ± 9,3
BMI	23,7 (21-28)
Current smoking	24 (14,3%)
Diabetic patients	47 (28%)
Parathyroidectomy	26 (15,4%)
Parathyroidectomy with hypoparathyroidism	10 (5,9%)
Patients on statins	39 (23,2%)
ACEI/ARB	90 (53,6%)
Calcitriol	63 (37,5%)
EPO dose (U/kg/sem)	122 (44-186)

Results expressed as mean ± SD or median and interquartile range. CKD = Chronic Kidney Disease; HN = Hypertensive Nephrosclerosis; DN = Diabetic Nephropaty; CGN = Chronic Glomerulonephritis; ADPKD = Autosomic Dominant Polycistic Kidney Disease; MBP = Mean Blood Pressure; BMI = Body Mass Index; ACEI – Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor; ARB = Angiotensin Receptor Blocker; EPO = Erythropoietin;

Table 2 - Patients laboratorial data

VARIABLE	RESULTS
Hemoglobin (g/dL)	11,4 (10-12,5)
Hematocrit (%)	34,9 (30,7-38,6)
Creatinine (mg/dL)	9,4 ± 3
PTH (pg/mL)	281,5 (86,9-656,7)
Kt/V	1,29 (1,13-1,5)
Calcium (mg/dL)	8,6 (8,4-9,2)
Phosphorus (mg/dL)	5,6 (4,3-7)
Alkaline Phosphatase (U/L)	116 (91,2-172)
Ferritin (ng/mL)	818,4 (498,9-1116,8)
25(OH)D (ng/mL)	24,7 (19,8-28,5)
Albumin (g/dL)	4,2 (3,9-4,4)
IL-1 (pg/mL)	2 (2-2)
IL-6 (pg/mL)	3,8 (1,6-7,2)
TNF (pg/mL)	2 (2-49,3)
MDA (nM/mg protein)	78,4 (62,1-95,7)
TRAP/URCA (trolox)	171,8 ± 30
NOx (µM)	12 (9,1-16,6)
AOPP (µmol/L)	155,3 (125,6-206,6)
FOX (mM)	0,81 (0,65-0,95)

Results expressed as mean ± SD or median and interquartile range. Kt/V = Dialytic adequacy; 25(OH)D = Vitamin D; IL-1 and 6 = Interleukin 1 and 6; TNF-α = Tumor Necrosis Factor alpha; MDA = Malonic Dialdehyde; TRAP = Total Plasma Antioxidant Capacity; URCA = Uric Acid; NOx = Nitric Oxide metabolites; AOPP = Advanced Oxidation Protein Products; FOX = Lipid Hydroperoxidation

Table 3 – Spearman coefficient correlation between PTH and oxidative stress/inflammation biomarkers.

		IL-1	IL-6	TNF- α	MDA	TRAP	NOx	AOPP	FOX
PTH	Correlation coefficient	0,086	-0,120	0,143	0,022	-0,060	0,003	0,047	0,025
	Significancy	0,287	0,139	0,078	0,776	0,443	0,966	0,548	0,749

PTH = Parathyroid Hormone; IL-1 and 6 = Interleukin 1 and 6; TNF- α = Tumor Necrosis Factor alpha; MDA = Malonic Dialdehyde; TRAP = Total Plasma Antioxidant Capacity; URCA = Uric Acid; NOx = Nitric Oxide metabolites; AOPP = Advanced Oxidation Protein Products; FOX = Lipid Hydroperoxidation

Table 4 - Mann Whitney test comparing oxidative stress and inflammatory biomarkers between parathyroidectomized patients with PTH < 15pg/ml and non-parathyroidectomized patients

	IL-1	IL-6	TNF- α	MDA	TRAP	NOx	AOPP	FOX
P value	0,345	0,423	0,267	0,237	0,653	0,282	0,142	0,933

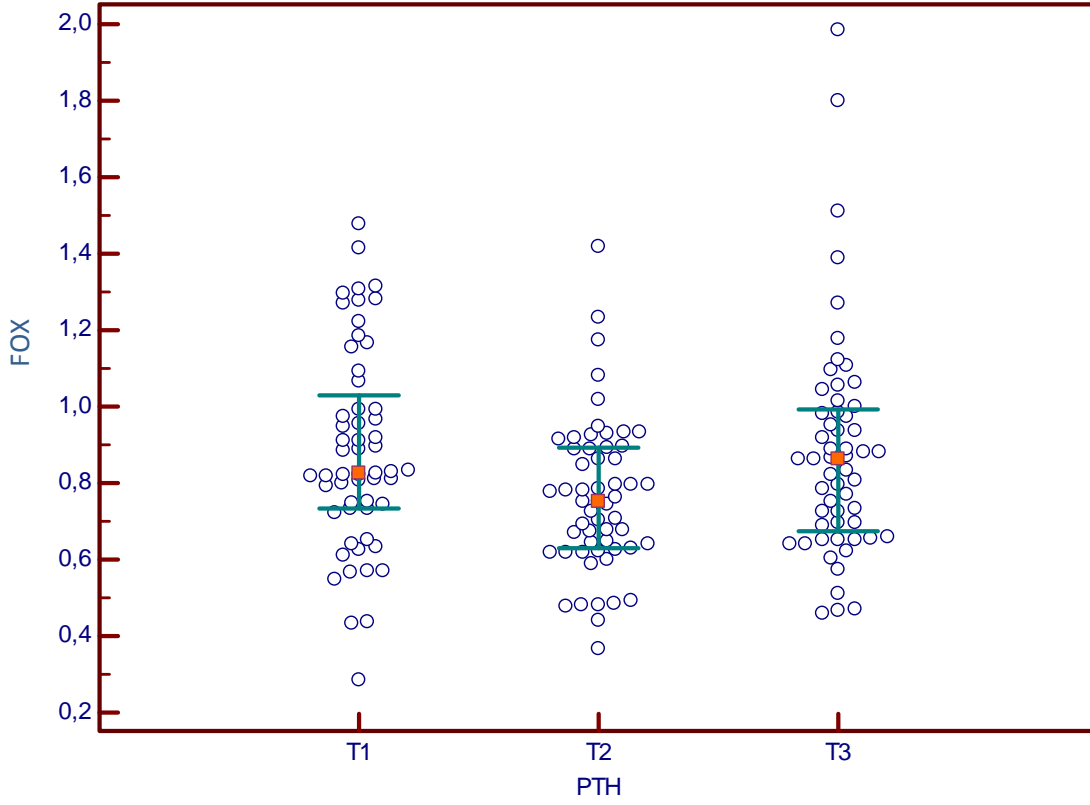
IL-1 and 6 = Interleukin 1 and 6; TNF- α = Tumor Necrosis Factor alpha; MDA = Malonic Dialdehyde; TRAP = Total Plasma Antioxidant Capacity; URCA = Uric Acid; NOx = Nitric Oxide metabolites; AOPP = Advanced Oxidation Protein Products; FOX = Lipid Hydroperoxidation

Table 5 – Spearman coefficient correlation between PTH levels and laboratorial data assessed in the study population

		Hb	EPO	Ca	P	Ferrit	Alb	Vit D	AP
PTH	Correlation coefficient	0,008	0,077	0,044	0,141	0,031	0,024	-0,057	0,485
	Significancy	0,923	0,324	0,571	0,069	0,689	0,757	0,467	0,000

Hb – hemoglobinn EPO – erythropoetin dose in U/kg/sem; Ca = calcium; P = phosphorus; Ferrit = Ferritin; Alb = albumin; Vit D = vitamin D; AP = Alkaline Phosphatasis.

Graphic 1 – Plot graphic of serum FOX levels in the PTH tertiles. P = 0,016 (Kruskal-Wallis), between first and third tertiles of serum PTH



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos pelo presente estudo demonstram não haver uma relação definida entre os níveis de PTH e a geração aumentada de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação em uma população de pacientes renais crônicos em hemodiálise. Devido às evidências presentes na literatura de que estes pacientes possuem níveis maiores de inflamação e estresse oxidativo em relação à população geral, os mecanismos que justificam este aumento possivelmente sofrem pouca influência do PTH.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de consentimento livre e esclarecido

Titulo da pesquisa:

“Está o hiperparatireoidismo secundário associado ao aumento do estresse oxidativo e inflamação em pacientes renais crônicos em hemodiálise?”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa **“Está o hiperparatireoidismo secundário associado ao aumento do estresse oxidativo e inflamação em pacientes renais crônicos em hemodiálise?”**, realizada nos serviços de hemodiálise do Instituto do Rim de Londrina, da Histocom Atividades Médicas, e do Hospital Universitário de Londrina. O objetivo da pesquisa é avaliar possível correlação entre os níveis de paratormônio (PTH), secundários à Doença Renal Crônica e os níveis de estresse oxidativo e de inflamação, tipicamente aumentados nesta população. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: 1) pesquisa em prontuário sobre dados clínicos (anemia, hipertensão e dose de medicamentos); 2) fornecimento de cerca de 20 mL de sangue que serão removidos durante coleta de exames rotineiros mensais, na hemodiálise, para que possamos fazer as análises laboratoriais; e 3) nos pacientes candidatos a remoção cirúrgica das glândulas paratireóides por doença avançada e intratável do ponto de vista clínico, é nosso desejo avaliar, além destes mesmos níveis de inflamação e de estresse oxidativo, a função cardíaca, através da realização de ecocardiografia (ultrassom do coração), antes da cirurgia e com seis meses de pós-operatório. Todos os procedimentos serão feitos sem nenhum custo e de modo algum influenciarão quaisquer medidas terapêuticas. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Importante dizer que após a realização dos exames, as amostras de sangue serão descartadas.

Os resultados contribuirão para elucidar o eventual papel do hiperparatireoidismo secundário à Doença Renal Crônica na gênese da inflamação e do estresse oxidativo, ambos marcadores

de risco cardiovascular dos pacientes em hemodiálise. Além disto, permitirá avaliar se ocorre a redução destes fatores de risco após a retirada das glândulas paratireóides, naqueles pacientes que tiverem indicação inequívoca do procedimento cirúrgico. Os riscos de sua participação são mínimos, restritos à retirada adicional de 20 mL de sangue em uma de suas avaliações mensais laboratoriais rotineiras nos serviços de hemodiálise

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contactar (Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino ou Prof. Marcel Jaqueto) na Avenida Bandeirantes 804 – telefone 3376-9100, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, 30 de Abril de 2012.

Pesquisador Responsável

Prof Dr Vinicius Daher Alvares Delfino

RG: 1.480.175

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em
participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

APÊNDICE B

Termo de aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

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

Parecer CEP/UEL:	215/2011
CAAE:	0088.0.268.000-11
Processo:	12322/2011.86
Folha de Rosto:	422807
Pesquisador(a):	Vinícios Daher Alvares Delfino
Unidade/Órgão:	CCS – Programa de Mestrado em Ciências da Saúde

Prezado(a) Senhor(a):

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:

“Está o Hiperparatireoidismo Secundário Associado ao Aumento do Estresse Oxidativo e Inflamação em Pacientes Renais Crônicos em Hemodiálise?”

Situação do Projeto: **Aprovado**

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

Londrina, 14 de outubro de 2011.

Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina