



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FABIO ROSTON

**HIPERTENSÃO PULMONAR E BIOMARCADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS EM HEMODIÁLISE**

---

Londrina  
2017

FABIO ROSTON

**HIPERTENSÃO PULMONAR E BIOMARCADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS EM HEMODIÁLISE**

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

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

ROSTON, FABIO.

HIPERTENSÃO PULMONAR E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS EM HEMODIÁLISE / FABIO ROSTON. - Londrina, 2017.  
55 f. : il.

Orientador: VINICIUS Daher Alvares Delfino.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Inclui bibliografia.

1. MEDICINA - Tese. I. Daher Alvares Delfino, VINICIUS . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

FABIO ROSTON

**HIPERTENSÃO PULMONAR E BIOMARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM INDIVÍDUOS EM HEMODIÁLISE**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Cintia Magalhães Carvalho Grion  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Sergio Seiji Yamada  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 26 de abril de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, de crescimento pessoal e intelectual.

A meu Pai Dalton (*In Memoriam*) por me mostrar o amor incondicional a medicina, me fazer apaixonar por essa profissão, seguir seu caminho e me tornar o melhor que posso ser.

Minha Avó Helena (*In Memoriam*), por todo amor dedicado a mim ao longo de sua vida. Por acreditar e sempre me fazer enxergar a luz das possibilidades mesmo nos dias mais escuros. Por me ensinar o que é o amor, dedicação e resiliência. A quem eu devo tudo que sou e serei.

Meu Avô Adibe (*In Memoriam*), com inúmeros trabalhos publicados e prêmios recebidos em seus estudos, com certeza a pessoa mais inteligente que já tive o prazer de conversar. Quem me deu toda base de educação e incentivo para a vida acadêmica.

Minha Mãe Heloisa, meu irmão Dalton e a toda família Roston , Manzano e Guimarães Garcia, por estarem ao meu lado em todas as fases da minha vida.

A toda família Carrilho e Boer, em especial ao Mauro e Dona Angelina (*In Memoriam*), estrelas no céu que nos guiam aqui na terra.

A minha sogra Farli, a mão estendida que sempre posso contar.

A minha esposa (meu amor maior) Marcela, por todo amor, carinho e dedicação. Por me ajudar e me dar toda tranquilidade possível para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Meus filhos Caio e Julia (Meu coração que bate fora mim e a quem dedico todo meu amor) e meu sobrinho e afilhado Pedro, anjos de Deus na terra. Os abraços e beijos revigorantes que me fazem seguir e ir além.

Meus alunos e agora amigos de profissão, Maísa, Pedro, Marília e Carol, por toda ajuda e dedicação neste projeto.

A todo pessoal do Instituto do Rim e HISTOCOM (Médicos, Enfermeiros e Funcionários) por toda ajuda e acolhimento, em especial, a enfermeira Natalina, a quem eu devo toda organização deste trabalho.

Ao amigo Vitor Obara e a Professora Karen Parron, a quem eu devo toda análise estatística.

Ao professor Décio e toda equipe do laboratório da UEL por toda ajuda e análises dos exames.

Ao amigo Dr José Roberto de Almeida, meu incentivador maior a ingressar na vida acadêmica, por acreditar no meu trabalho e por me ajudar a enxergar os objetivos que eu gostaria de conquistar mas ainda não sabia.

Ao meu orientador e amigo Dr. Vinicius, a quem cabe uma lista infinita de agradecimentos. Por me aceitar como orientando. Por toda paciência e compreensão nos momentos difíceis (que não foram poucos). Por toda dedicação e ajuda. A quem a proximidade somente aumentou a admiração e respeito. Minha eterna gratidão.

Aos meus mestres Luis Carlos Miguita Junior e Fernando Garcia, por me ensinarem com muita dedicação a Ecocardiografia e por ter confiado a mim a primeira vaga de residência de ecocardiografia da ECOCARDIO de Londrina. Minha eterna gratidão.

ROSTON, Fabio. **Hipertensão pulmonar e biomarcadores de estresse oxidativo em indivíduos em hemodíalise**. 2017. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A Hipertensão Pulmonar (HP) é uma desordem patofisiológica que pode envolver múltiplas condições. É caracterizada pela elevação sustentada da pressão arterial pulmonar maior ou igual a 25 mmHg, aferida de modo direto por cateterismo direito. O ecocardiograma, por ser um método indireto e seguro, é frequentemente usado como meio de triagem, sendo o achado da pressão arterial sistólica pulmonar (PSAP) maior ou igual a 35 mmHg indicativo de HP. Estudos mostram a presença de estresse oxidativo elevado em pacientes renais crônicos submetidos à diálise e estresse oxidativo elevado em pacientes com HP, porém não há dados na literatura que avaliem associação de estresse oxidativo elevado em paciente em HD com HP. Nosso estudo teve como objetivo primário avaliar a possível associação entre hipertensão pulmonar e estresse oxidativo elevado em paciente com doença renal crônica (DRC) em hemodíalise (HD). **MÉTODOS:** Estudo transversal, com oitenta e nove pacientes provenientes de duas clínicas de hemodíalise. A coleta de dados e análise dos exames ecocardiográficos ocorreram entre os meses de maio e junho de 2015 e os exames foram realizados na segunda sessão semanal de HD (às quartas e quintas feiras) para evitar intervalos interdialíticos maiores. As amostras de sangue foram coletadas após a punção da fístula artériovenosa, pouco antes de iniciar a diálise. Após o seu término, foram realizados os ecocardiograma para determinação da PSAP e assim, dividir os pacientes em 2 grupos: com e sem hipertensão pulmonar, sendo considerado presença de HP valores iguais ou superiores a 35 mmHg. Ocorreram treze perdas no decorrer do estudo, restando setenta e seis pacientes para a análise. **RESULTADO:** A prevalência de HP no presente estudo foi de 50%. Não foram observadas diferenças entre os grupos quando comparados os marcadores de estresse oxidativo e de inflamação. Os grupos com e sem HP foram homogêneos, sem diferença em relação à idade, sexo, índice de massa corpórea (IMC), uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), uso de bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA) ou estatinas, assim como tabagismo e diabetes melitus, porém, foi observado maior tempo em diálise nos pacientes com HP (57, DP 40-108 meses) em relação aos sem HP (36, DP 24-72 meses),  $P = 0,026$ . **CONCLUSÃO:** Não encontramos associação entre HP e estresse oxidativo em pacientes em HD na população estudada. O tempo em diálise esteve associado à HP, sugerindo que fatores relacionados a maior tempo em hemodíalise possam ter participação da gênese da HP em indivíduos renais crônicos em HD.

**Palavras-chave:** Hipertensão pulmonar. Doença renal crônica. Hemodíalise. Estresse oxidativo. Inflamação.

ROSTON, Fabio. **Pulmonary hypertension and oxidative stress biomarkers in hemodialysis patient**. 2017. 55 p. Thesis (Master's Degree Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Pulmonary Hypertension (HP) is a pathophysiological disorder that may enrolled a lot of conditions. It is defined as a sustained elevation of mean pulmonary artery pressure (PAPm) of at least 25 mmHg at rest with right heart catheterization study. PSAP is also measured non-invasively by Doppler echocardiography and the find of PSAP at least 35 mmHg is high indicative of HP. Some study demonstrate high oxidative stress in end of stage chronic kidney disease (CKD) in hemodialytic treatment and high oxidative stress in PH patients but there is no finding of high oxidative stress in CKD in dialytic treatment and HP patients. This study has the meaning search for a relationship between HP and high oxidative stress in CKD hemodialytic treatment patient. **METHODS:** Cross sectional study with 89 patient in hemodialytic treatment of two hemodialysis center. Data collect and trans thoracic echocardiogram was performed from may to june 2015, on wednesday and Thursday to avoid greater interdialytic interval. Blood sample were collect just after venulos fistula puncture to start hemodyalisis (HD). The echocardiogram was performed right after HD and the pulmonary pressure was taken. The patient was shared in two groups, with and without HP. HP was defined as PSAP equal or greater than 35 mmHg. There was 13 loss and at the end, 76 patient stayed in the study. **RESULTS:** The prevalence of HP was 50% in the population There was no difference between the two groups when compered oxidtive stress paterns as well as inflamatory factors.. The groups were homogeneous and without difference when compared age, sex, body mass index, tobacco use, diabetes Melitus, ACE inhibitor or AT1 receptor blocker and statin use. The study showed more time in month in HP patient (57, DP 24- 72 month) compared without HP patient (36, DP 24-72 month),  $p = 0,026$ . **CONCLUSION:** There is no association between PH and oxidative stress and inflamatory paterns in HD patient in this population. The time measured in months in HD was associated with HP and it suggest that the time in HD may play a role in HP patient.

**Keywords:** Pulmonary hypertension. Chronic kidney disease. Hemodyalisis. Oxidative stress. Inflammation.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1-** Potenciais mecanismos contributivos para desenvolvimento de hipertensão pulmonar em pacientes com doença renal crônica..... 16
- Tabela 1-** Características gerais dos pacientes .....36
- Tabela 2-** Comparação dos resultados dos exames laboratoriais de estresse oxidativo e de inflamação nos grupos de pacientes com e sem hipertensão pulmonar .....37
- Tabela 3-** Comparação dos resultados dos exames laboratoriais de rotina nos grupos de pacientes com e sem hipertensão pulmonar.....38

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADMA	dimetilarginina assimétrica
AOPP	Produtos de oxidação proteica avançada
ASE	Sociedade Americana de Ecocardiografia
AST	Aspartato alanintransferase
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
BRA	Bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II
CAV 1	Caveolina-1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DRC	Doença renal crônica
ENG	Endoglina
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAV	Fístula arteriovenosa
HD	Hemodiálise
HP	Hipertensão pulmonar
IECA	Inibidor da enzima de conversão
IC	Insuficiência cardíaca
IMC	Índice de massa corpórea
KCNK3	Membro 3 da subfamília K de canais de potássio
Kt/V	índice da remoção da ureia
Nox	Metabólitos do óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTH	paratormônio
PAPm	Pressão média da artéria pulmonar
PCR	Proteína C reativa
PON	Paraoxonase
PSAP	Pressão sistólica da artéria pulmonar
PTH	Paratormônio
SH	Grupamento sulfidril
SMAD 9	Decapentaplégico 9
SOD	Superóxido dismutase
T/AC	Relação TRAP/ácido úrico

TRAP	Capacidade antioxidante total plasmática
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VE	Ventrículo esquerdo
VD	Ventrículo direito
VO2	Consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	16
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
3.1	<b>Objetivo Primário</b> .....	16
3.2	<b>Objetivo Secundário</b> .....	17
4	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	17
4.1	<b>Delineamento</b> .....	17
4.2	<b>População</b> .....	17
4.3	<b>Amostragem</b> .....	17
4.4	<b>Avaliação Ecocardiográfica</b> .....	17
4.5	<b>Obtenção das Amostras de Sangue e Exames Laboratorias Realizados</b> .....	19
4.6	<b>Biomarcadores Pró-Oxidantes</b> .....	19
4.6.1	<b>Metabólitos do óxido nítrico (NOx)</b> .....	19
4.6.2	<b>Produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)</b> .....	19
4.7	<b>Biomarcadores Antioxidantes</b> .....	19
4.7.1	<b>Capacidade antioxidante total plásmatica (TRAP)</b> .....	19
4.7.2	<b>Grupamento sulfidrila (SH)</b> .....	20
4.7.3	<b>Atividade da paraoxonase 1 (PON1)</b> .....	20
4.7.4	<b>Superóxido dismutase (SOD)</b> .....	20
4.7.5	<b>Catalase</b> .....	21
4.7.6	<b>Glutathione total (GT), Glutathione reduzida (GSH) e Glutathione oxidada (GSSG)</b> .....	21
4.8	<b>Parâmetros de Inflamação</b> .....	21
4.9	<b>Análises Bioquímicas</b> .....	21
4.10	<b>Análise Estatística</b> .....	21
5	<b>ARTIGO</b> .....	22

<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS DOS ITENS DE 1 A 4.....</b>	<b>39</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>43</b>
	<b>A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>43</b>
	<b>B - Termo de Aprovação de Pesquisa- Comite de Ética.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO Author Guidelines - Revista Hemodialysis International .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A hipertensão pulmonar (HP) é uma condição clínica progressiva, caracterizada por disfunção endotelial e remodelamento das camadas média e íntima dos vasos pulmonares, resultando em lesões vasculares constrictivas e oclusivas, respectivamente [1].

A HP é uma desordem patofisiológica que pode envolver múltiplas condições clínicas e agravar a maioria das doenças cardiovasculares e respiratórias. Os sintomas da HP são inespecíficos e a maioria relacionados à disfunção progressiva do ventrículo direito (VD). Os sintomas iniciais são geralmente induzidos pelo exercício e a dispneia, fadiga, fraqueza, angina e síncope são os mais comuns. Menos comumente, pacientes relatam tosse seca, náuseas e vômitos induzidos por exercício. Sintomas em repouso acontecem em casos avançados. Distensão abdominal e edema de tornozelo acontecem com a progressão da falência do VD. A apresentação da HP pode diferir, a depender da causa ou pode estar associada a outras patologias [2].

O valor normal da pressão média da artéria pulmonar (PAPm) em repouso é  $14 \pm 3$  mmHg, sendo caracterizada a presença de HP quando a mesma se encontra sustentada e  $\geq 25$  mmHg, aferida por cateterismo cardíaco direito, método definido como padrão ouro para o diagnóstico [1,2]. Devido à natureza invasiva do cateterismo cardíaco, a ecocardiografia é o método mais comumente utilizado na prática clínica para o rastreio diagnóstico de HP com boa acurácia em relação ao padrão ouro, inclusive, com boa precisão entre as diversas técnicas ecocardiográficas quando comparadas entre si, conforme descreveu Aduen e cols [3].

Em 1973 foi estabelecido o primeiro sistema de classificação desta patologia, o qual dividia os pacientes acometidos em dois grupos: 1- HP primária; 2- HP secundária, de acordo com a presença ou não de uma condição clínica de base responsável pelo desenvolvimento de HP [4]. Ao longo das últimas décadas, com o aumento do conhecimento sobre mecanismos fisiopatológicos e identificação de várias outras condições clínicas predisponentes, tal classificação se mostrou insuficiente para o adequado manejo dos pacientes e foi sendo modificada com o intuito de categorizar múltiplas condições clínicas em 5 grupos de acordo com as semelhanças clínicas, patológicas, hemodinâmicas e estratégias de tratamento [5], resultando na classificação atualmente utilizada, denominada de Nice, por ter sido esta cidade francesa a sede do último Congresso Mundial sobre HP em 2013. A tipo V, considerada miscelânea, é a categoria que corresponde aos pacientes com hipertensão pulmonar e doença renal

crônica. Considerando-se a probabilidade de mortalidade em função do tempo, os pacientes com HP são divididos em 3 grupos: 1- Baixo risco, quando mortalidade menor que 5% ao ano; 2- Risco moderado, quando mortalidade entre 5 e 10%

ao ano; 3- Alto risco quando mortalidade maior que 10% ao ano. Pacientes classificados como baixo risco comumente apresentam insuficiência cardíaca congestiva (ICC) classe funcional I ou II da OMS, ausência de progressão da doença e teste de caminhada de 6 min maior que 440 m. Os pacientes com risco intermediário apresentam progressão lenta da doença, teste de caminhada de 6 min entre 440 e 165, classe funcional III da OMS e sinais de disfunção do VD, porém, sem sinais clínicos de falência de VD. Pacientes com clínica de disfunção de VD, rápida progressão de sintomas, valores de peptídeo natriurético cerebral (BNP) > 300 ng/L, classe funcional IV da Organização Mundial da Saúde (OMS), teste de caminhada de 6 minutos (min) menor que 165 metros (m), síncope repetidas, pico de  $VO_2 < 11 \text{ mL/min/Kg}$ ,  $VE/VCO_2 \text{ slope} > 45$ , área do átrio direito >  $26 \text{ cm}^2$ , derrame pericárdico, pressão no átrio direito > 14 mmHg, índice cardíaco <  $2,0 \text{ L/min/m}^2$  e saturação venosa central de oxigênio < 60 % são classificados como alto risco [4].

A HP tem alta prevalência em pacientes com doença renal crônica (DRC). Yigla e cols. relataram prevalência de 13,7 % de HP entre 127 pacientes pré-dialíticos [6], enquanto Kowar B e cols mostraram prevalência de 39 % de HP nos pacientes com DRC avançada não dialítica e de 56 % naqueles submetidos à diálise [1]. Em editorial recente, Sarnak&Roberts referem presença de HP entre 30-40% dos pacientes com DRC estágios 4 e 5 (não dialíticos e dialíticos, respectivamente) [7].

Navaneethan e cols. em estudo multicêntrico americano de coorte prospectivo envolvendo cerca de 3.000 pacientes com DRC em diferentes estágios, onde a presença de HP foi definida por pressão sistólica de artéria pulmonar (PSAP) > 35 mmHg e/ou velocidade de regurgitação tricuspídica > 2,5m/s, comprovaram que a prevalência de HP aumenta conforme o estágio da DRC avança, subindo de 6 % em pacientes no estágio 1, para 33% nos em estágio 5 não dialítico [8]. Neste estudo a presença de HP esteve associada de maneira independente com risco aumentado de eventos cardiovasculares e maior mortalidade [8]. De maneira semelhante, muito recentemente, Reque e cols. num mesmo tipo de estudo em 353 pacientes renais crônicos espanhóis, confirmaram que a prevalência de HP aumenta progressivamente à medida que a taxa de filtração glomerular se reduz (pacientes em terapia renal substitutiva não foram incluídos) e que é um fator de risco independente para eventos cardiovasculares e mortalidade por todas as causas (hazard ratio 2,52-IC 95%- 1,95-5,56; P = 0,01) [9].

Alguns autores demonstraram desfechos desfavoráveis para pacientes com HP em HD, entre eles, destacam-se dois. Ramasubbu e cols., em um estudo de coorte com seguimento de 1 ano com 90 pacientes em HD, observaram que 47% deles apresentavam HP e a mortalidade foi de 26% neste grupo contra 6% no grupo sem HP [10], e Agarwal e cols., em estudo com 288 pacientes, 38% deles com HP, seguidos por uma mediana de 2,15 anos;

análise ajustada, razão de chances de 2,17 (IC 95% 1,31-3,61,  $P < 0,01$ ) demonstraram que também neste grupo de pacientes a HP está associada com desfechos desfavoráveis [11].

Em pacientes em terapia dialítica, a HP parece ser prevalente nos pacientes submetidos à hemodiálise (HD) com prevalência entre 30 a 58%, contra 12,5 a 40% em pacientes em diálise peritoneal (DP) [6]. Etemadi e cols, atribuem esta maior prevalência de HP em pacientes em HD principalmente ao aumento do débito cardíaco provocado pela fistula arteriovenosa (FAV) nos pacientes submetidos à HD e pela presença de microbolhas que se formam no sistema de hemodiálise. As microbolhas obstruem os capilares pulmonares e podem induzir a isquemia tecidual, resposta inflamatória e ativação do complemento, corroborando para a gênese da HP [12].

O primeiro estudo realizado em paciente em HD utilizando o padrão-ouro para o diagnóstico de HP, o cateterismo cardíaco direito com medida direta da pressão pulmonar, foi publicado por Pabst e cols. em 2012. O cateterismo direito foi realizado em 62 pacientes com DRC e dispnéia inexplicada (31 em HD e 31 com DRC estágios 4 e 5 não dialítico). Em ambos os grupos, a prevalência de HP foi de 72% (no grupo HD, quando o cateterismo direito foi repetido após HD, a prevalência reduziu-se para 60%). Em ambos os grupos a grande maioria dos casos foi de HP pós-capilar pulmonar, sugerindo HP secundária à disfunção ventricular esquerda. Este estudo revelou, portanto, que mais de 70% dos pacientes com DRC avançada ou em HD com dispneia sem causa identificável apresentaram HP e que em pacientes em HD, o melhor momento para avaliação da HP é logo após o término da sessão de HD [13].

A patogênese da HP em pacientes em HD não é muito bem conhecida e vários mecanismos fisiopatológicos têm sido propostos. Hipervolemia e disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (VE), comumente encontradas nos pacientes com DRC são frequentemente citadas. Várias causas de insuficiência cardíaca (IC) são encontradas nessa população, dentre elas, hipertensão arterial sistêmica, aumento corporal de sal e água, efeitos pleiotrópicos de toxinas urêmicas e isquemia miocárdica [14-15]. A apneia do sono tem prevalência elevada nesta população e pode contribuir para prevalência aumentada de HP [16].

As fístulas AV utilizadas para acesso hemodialítico resultam em aumento do retorno venoso, com concomitante elevação do débito cardíaco. Casos de IC por alto débito como resultado de um alto fluxo na FAV não são raros e frequentemente a ligadura ou redução da FAV é necessária [17]. Esse mecanismo foi uns dos primeiros sugeridos como causa de HP em pacientes em HD. Críticos desta teoria acreditam que o aumento do retorno venoso não teria, sozinho, a capacidade de elevar a pressão arterial pulmonar devido a elevada

complacência dos vasos pulmonares e sugerem que a perda dessa complacência ou outros mecanismos fisiopatológicos estejam envolvidos [14-15-18].

Yigla e cols. em um estudo prospectivo que acompanhou 12 pacientes submetidos confecção de FAV demonstraram que a única diferença entre os que desenvolveram HP e os que não, foi o aumento do débito cardíaco, sugerindo que em pacientes com disfunção ventricular inicial, o retorno venoso elevado poderia elevar a PSAP [18].

O distúrbio mineral ósseo também tem sido apontado como uma das causas de HP em pacientes renais crônicos, possivelmente por causar calcificação dos vasos pulmonares, porém, os estudos a respeito são controversos. A maioria deles falhou em comprovar associação entre níveis elevados de cálcio, fósforo e paratormônio (PTH) e HP [18-19-20]. Estudo de Agarwal e cols. sugeriu efeito antioxidante e protetor de endotélio para a vitamina D em pacientes com DRC, porém, ensaios clínicos aleatorizados são necessários para corroborar este achado [11].

Em pacientes em HD, o próprio tratamento é apontado como possível causa de HP, uma vez que a resposta inflamatória elevada devido a não completa biocompatibilidade das membranas dos capilares contribui para disfunção endotelial e conseqüentemente HP [21].

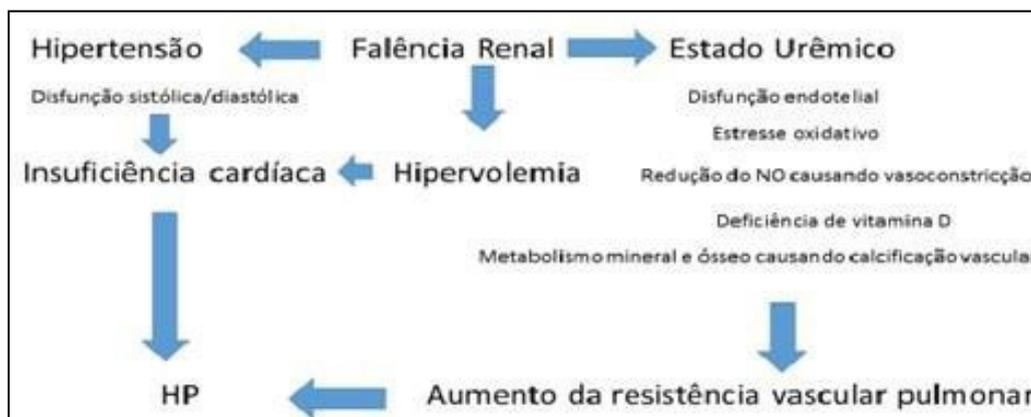
O estresse oxidativo parece estar envolvido, dentre outros fatores, na fisiopatologia da HP. O aumento do estresse oxidativo causado por insultos repetidos externos, gera um desbalanço entre vasodilatadores (óxido nítrico e prostacilina) e vasoconstrictores (endotelina 1, tromboxano, serotonina e angiotensina II) arteriolares. Este desbalanço pode causar oxidação de proteínas, carboidratos, lipídios e ácido desoxirribonucleico (DNA), e promover, nestas substâncias, alterações estruturais, funcionais e conseqüentemente, lesão celular [22].

A elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ativa a via peroxidonitrato, aumentando a ação da tirosina nitrato, a qual, por sua vez, reduz a produção da óxido nítrico sintase e a prostacilina sintase. Como conseqüência, tem-se a redução da produção de óxido nítrico e prostacilina, o que contribui para a vasoconstricção, proliferação miointimal, hipertrofia e fibrose das arteríolas pulmonares [22].

Estudos associam inflamação crônica à uremia. A elevação de mediadores inflamatórios na corrente sanguínea associa-se a aumento no estresse oxidativo e disfunção endotelial. Pacientes com DRC apresentam elevação de fatores vasoconstrictores como endotelina I e angiotensina II e redução de fatores vasodilatadores como o óxido nítrico, sendo a resultante a elevação da resistência vascular pulmonar, podendo acarretar HP [23].

Em recente artigo, Kowar e cols., 2013, apresentam representação gráfica, contemplando os mecanismos mais comumente descritos como associados à HP em pacientes com DRC [1]. Tal gráfico foi traduzido, adaptado e apresentado a seguir como Figura 1.

**Figura 1** Potenciais mecanismos contributivos para desenvolvimento de hipertensão pulmonar em pacientes com doença renal crônica.



Fonte: Traduzido e adaptado de Kowar e cols., 2013.

## 2 JUSTIFICATIVA

A HP tem alta prevalência em pacientes renais crônicos em hemodiálise e está associada com morbidade e mortalidade elevadas. A patogênese da HP no renal crônico não é, ainda, bem conhecida, mas parece ser. Em modelo experimental e em indivíduos sem DRC, o estresse oxidativo aumentado parece estar associado à HP [22].

Pacientes renais crônicos, inclusive aqueles em HD, apresentam estresse oxidativo aumentado quando comparados a controles. Não encontramos na literatura estudos que tenham avaliado possível associação entre marcadores de estresse oxidativo aumentado e HP em pacientes em HD. O encontro de uma possível associação positiva entre elevação de marcadores estresse oxidativo e HP em pacientes em HD pode propiciar justificativa para futuros estudos visando avaliar o papel de medidas de redução do estresse oxidativo (uso de antioxidantes, por exemplo) sobre a HP pulmonar de indivíduos em HD, visando reduzir a morbimortalidade da HP nestes pacientes.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Primário

Avaliar associação entre biomarcadores de estresse oxidativo e HP em uma amostra de pacientes em HD.

### **3.2 Objetivo Secundário**

Estudar a prevalência da HP em uma amostra de pacientes em HD na cidade de Londrina.

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento**

Estudo transversal.

### **4.2 População**

Pacientes renais crônicos em tratamento em unidades de hemodiálise.

### **4.3 Amostragem**

Pacientes renais crônicos, maiores de 18 anos, em HD por mais de três meses em duas clínicas da cidade de Londrina/PR, que após terem sido adequadamente informados sobre a natureza e os objetivos do estudo, concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Estudo aprovado pelo Comitê de Ética - CAAE= 19936413314.4.0000.5231).

Após anamnese e avaliação dos prontuários contendo os histórico clínico dos pacientes, foram excluídos os pacientes que estavam realizando HD por meio de catéteres temporários, portadores de infecção ativa, história de infecção que tivessem motivado internação hospitalar nos últimos 30 dias, portadores de neoplasias ativas, portadores de Hepatites B e C, portadores do vírus HIV, de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), de IC com fração de ejeção menor que 45% avaliada pelos método de Simpsons, portadores de valvopatias (estenoses e insuficiências severas) e hepatopatias crônicas. Ao final desta etapa, 89 pacientes foram selecionados para iniciarem o estudo. Treze pacientes foram perdidos: seis por janela ecocardiográfica difícil, dois por disfunção ventricular esquerda importante ao ecocardiograma, quatro por desistência em participar do estudo e um paciente por dados laboratoriais incompletos. Setenta e seis pacientes, portanto, concluíram o estudo.

Dados antropométricos, clínicos e resultados de exames laboratoriais, rotineiramente realizados para pacientes em HD, foram obtidos a partir da história clínica e da revisão dos prontuários destes pacientes.

As coletas de exames laboratoriais específicos para o estudo, bem como a feitura dos ecocardiogramas, ocorreram na segunda sessão semanal (às quartas e quintas-feiras) entre os meses de maio e junho de 2015. Participaram do estudo, pacientes dos três turnos dialíticos (manhã, tarde e noite). Após a punção das fístulas, logo no início das sessões de diálise, amostras de sangue foram retiradas para a realização dos biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação constantes no protocolo do estudo. Ao final das sessões de HD, com os pacientes sendo considerados como estando no seu “peso seco” (ausência de edema clínico e de sinais de hipovolemia) os mesmos foram encaminhados ao laboratório de ecocardiografia, onde os exames foram realizados e foram obtidos dados da pressão arterial pulmonar.

#### **4.4 Avaliação Ecocardiográfica**

Os exames ecocardiográficos foram realizados pelo mesmo operador (F.R.) utilizando-se ecocardiógrafo GE Vivid I com sonda cardíaca setorial adulta 3S-RS (1,5-4,4 MHz). Durante o exame foram avaliadas as funções ventriculares direita e esquerda, as dimensões das cavidades cardíacas direitas e esquerdas, a pressão de enchimento ventricular esquerdo, o volume do átrio esquerdo, o padrão de enchimento diastólico (com estudo de Color Doppler e Doppler tecidual) e doenças valvares seguindo os critérios da Sociedade Americana de Ecocardiografia (ASE) [24]. A medida da pressão da arterial pulmonar foi realizada de modo indireto através da equação de Bernoulli modificada (velocidade do fluxo regurgitante tricuspídeo ao quadrado multiplicado por quatro, somada à pressão do átrio direito, avaliada pela dimensão da veia cava inferior (VCI) e sua variação respiratória). Para pacientes com dimensão da VCI menor que 2,1 cm e variação respiratória maior que 50 %, foi atribuído 3 mmHg de pressão de átrio direito. Para pacientes com dimensão do VCI maior que 2,1 cm e variação respiratória menor que 50% foi atribuído 15 mmHg de pressão de átrio direito e para as medidas intermediárias foi atribuído 8 mmHg, seguindo as recomendações para medida de câmeras direitas pela ASE [24]. Foi seguida a ordem cronológica de chegada e saída dos pacientes em seus respectivos turnos, minimizando o tempo de espera do paciente para feitura do exame. O valor de corte utilizado para definir HP para este estudo foi presença de PSAP  $\geq 35$ mmHg.

#### **4.5 Obtenção das Amostras de Sangue e Exames Laboratoriais Realizados**

As amostras foram obtidas uma vez, imediatamente antes do início das sessões de HD. Cerca de 20 mL de sangue de cada paciente foi coletado da linha venosa em tubos com vácuo (Vacutainer). Os tubos foram armazenados em geladeira por no máximo 4 horas e a seguir transportados em recipiente refrigerado (bolsa térmica com gelox) até o laboratório de Pós-Graduação do Hospital Universitário de Londrina, com tempo máximo de deslocamento de 20 min. Os frascos foram centrifugados a 1.006 g por 15 min e alíquotas de plasma foram armazenados a -70 °C até a realização das análises.

#### **4.6 Biomarcadores Pró-Oxidantes**

##### **4.6.1 Metabólitos do óxido nítrico (NOx)**

A determinação da concentração de subprodutos do NOx foi realizada pela técnica descrita por Navarro-Gonzalvez *et al.* (1998). O óxido nítrico é um gás muito instável e rapidamente se degrada nos subprodutos nitratos e nitritos, que podem ser detectados no soro. O método de detecção baseia-se na redução de nitrato a nitrito, mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess. A quantificação de NOx foi feita em leitora de microplacas Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) sendo as leituras feitas em 540 nm [23]. A concentração de óxido nítrico foi expressa em µM/L [25].

##### **4.6.2 Produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)**

Este teste foi utilizado para determinar proteínas oxidadas no sangue segundo o método descrito por Hanasand *et al.* (2012). A AOPP é uma medida colorimétrica dos níveis de proteínas oxidadas. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. A concentração de AOPP foi expressa em µM/L de equivalente de cloramina T [26].

#### **4.7 Biomarcadores Antioxidantes**

##### **4.7.1 Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP)**

Este teste avalia os antioxidantes hidro e lipossolúveis do sangue. A avaliação foi

feita por quimiluminescência (QL) em uma adaptação do método descrito por Repetto *et al* (1996). A metodologia é baseada na geração de radicais peroxila ( $RO^{\cdot}$ ), por decomposição térmica, a uma velocidade controlada, do azoiniciador dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (ABAP). Este experimento foi conduzido em uma leitora de microplacas Victor X-3, Perkin Elmer<sup>®</sup>, (Waltham, MA, EUA) por 25 min e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm com controle de temperatura de 30°C. Os resultados foram expressos em  $\mu$ M Trolox [27].

#### **4.7.2 Grupamento sulfidril (SH)**

Este teste foi utilizado para determinar grupamento SH no sangue utilizando o método descrito previamente por Hu (1994) e adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). O grupo sulfidril ocorre em compostos não proteicos (glutathiona e cisteína livre) e em compostos proteicos (albumina). O método de análise é baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com o grupo sulfidril de proteínas que produz o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu$ M [28].

#### **4.7.3 Atividade da paraoxonase 1 (PON1)**

Este teste foi utilizado para determinar a atividade total da PON-1 pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol), baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvink Furlong (2008). A taxa de hidrólise de fenil-acetato, é determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) [29].

#### **4.7.4 Superóxido dismutase (SOD)**

Este teste foi utilizado para determinar a atividade da enzima SOD nos eritrócitos usando o método descrito por Marklund e Marklund (1974). Esta técnica baseia-se na inibição que esta enzima promove na auto-oxidação do pirogallol em solução aquosa. A quantidade de SOD que foi capaz de inibir 50% da oxidação do pirogallol foi definida como uma unidade de atividade enzimática. A leitura da reação da SOD foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos em U/mim/gHb [30].

#### **4.7.5 Catalase**

Este teste foi utilizado para determinar a atividade da enzima catalase nos eritrócitos através da medida do decaimento na concentração de  $H_2O_2$  e geração de oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi (1984). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em abs/min/gHb[31].

#### **4.7.6 Glutathiona total (GT), Glutathiona reduzida (GSH) e Glutathiona oxidada (GSSG)**

Este teste foi utilizado para determinar a concentração de GT, GSH e GSSG em hemácias através da formação do ácido tionitrobenzóico (TNB) no comprimento de onda de 412 nm em espectrofotômetro, utilizando a técnica descrita por Tietze et al. 1969 e Anderson, 1985. O TNB é resultante da reação de duas moléculas de GSH (amostra) e uma do ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB), obtendo-se assim a quantidades de GSH.

Nesta reação além do TNB é formado também a glutathiona oxidada (GSSG). Na presença da glutathiona redutase e de NADPH, a GSSG resultante da primeira reação (ou aquele que já estava presente na amostra) é reconvertido em GSH que é re-oxidado a GSSG formando mais TNB, e obtendo-se as quantidades de GT presente na amostra. A quantidade de GSSG é obtida por cálculo através da subtração da GT-GSH/2. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer<sup>®</sup>, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em mM/gHb[32-33].

#### **4.8 Parâmetros de Inflamação**

Determinações dos níveis de PCR ultrasensível e transtirretina foram obtidas por metodologias automatizadas no aparelho Architect, Abbott, USA.

#### **4.9 Análises Bioquímicas**

Determinações de níveis séricos de hemoglobina, ureia, creatinina, cálcio, fósforo, PTH intacto, hemoglobina, uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e aspartate alanintransferase (AST) fazem parte dos exames de rotina das unidades de HD e foram efetuadas pelos métodos bioquímicos de rotina.

#### **4.10 Análise Estatística**

Os dados foram analisados de forma descritiva e inferencial no programa R Core

Team (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Testes bicaudais foram aplicados e valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

As variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de tabelas de frequência (absoluta e relativa). As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média e intervalo de confiança de 95% ou mediana e intervalo interquartilico, segundo a normalidade dos dados, testada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: portadores ou não de HP, e utilizou-se o teste t para amostras independentes para comparação da idade e IMC e o teste de Mann-Whitney para comparação do tempo em diálise entre os grupos. Além disso, usou-se o Teste do Qui Quadrado ou Exato de Fisher para comparação das proporções de pacientes por idade, sexo, IMC, tempo de diálise em meses, diabetes, tabagismo, uso de IECA ou BRA e de estatinas. O teste de correlação de Pearson não foi usado para correlacionar as variáveis do estresse oxidativo por não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

## **5 ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO À REVISTA HEMODIALYSIS INTERNATIONAL.**

### **TÍTULO: HIPERTENSÃO PULMONAR E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES EM HEMODIÁLISE**

Fabio Roston<sup>1</sup>; Décio S. Barbosa<sup>2</sup>; Marília A. Dagostin<sup>3</sup>; Maísa M. Rodrigues da Silva<sup>3</sup>; Pedro S. Galvão<sup>3</sup>; Carolina Z. Petrus<sup>3</sup>; Vinicius D. A. Delfino<sup>4</sup>

1. Professor, Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Pronto Socorro, Universidade Estadual de (UEL)
2. Professor Doutor, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas (UEL)
3. Acadêmicos do sexto ano de Medicina, UEL
4. Professor Doutor Livre Docente, Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Nefrologia, UEL Hipertensão pulmonar e estresse oxidativo em hemodiálise.
5. Autor Correspondente: Roston F. Email: [fabioroston7@yahoo.com.br](mailto:fabioroston7@yahoo.com.br)
6. Avenida Robert Koch, 60, bairro Operaria, Londrina –PR CEP 86038-350, Brasil Departamento de Clínica Médica, Tel: 43-3371-2000
7. Palavras-chave: hipertensão pulmonar, doença renal crônica, hemodiálise, estresse oxidativo, inflamação.
8. Keywords: pulmonary hypertension, chronic kidney disease, hemodialysis, oxidative stress, inflammation.

## 5.1 RESUMO

**Introdução:** Hipertensão pulmonar (HP) é bastante prevalente em pacientes renais crônicos em Hemodiálise (HD) e está associada com aumento de mortalidade. Estudos revelam estresse oxidativo aumentado em pacientes com HP (primária e experimental). Pacientes em HD apresentam estresse oxidativo aumentado. Não há estudos sobre associação entre estresse oxidativo e presença de HP nestes pacientes. **Métodos:** Estudo transversal com avaliação de setenta e seis pacientes maiores de 18 anos, com doença renal crônica em hemodiálise por mais de três meses. Foram excluídos os pacientes que estavam realizando HD por meio de cateteres temporários, portadores de infecção ativa, história de infecção que tenha motivado internação hospitalar nos últimos 30 dias, portadores de neoplasias ativas, portadores de Hepatites B e C, portadores do vírus HIV, de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), de insuficiência cardíaca (IC) com fração de ejeção menor que 45%, portadores de valvopatias (estenoses e insuficiências severas) e hepatopatias crônicas. Amostras de sangue para determinação de biomarcadores de estresse oxidativo foram obtidas antes do início da segunda sessão semanal de HD e os ecocardiogramas ao final da mesma sessão. HP pulmonar foi definida por Pressão Sistólica da Artéria Pulmonar maior ou igual a 35 mmHg. Os exames foram realizados as quartas e quintas feiras entre os meses de Maio e Junho de 2015. **Resultados:** A prevalência de HP foi de 50%. Os pacientes dos grupos com e sem HP não apresentaram diferença em relação à idade, sexo, índice de massa corpórea (IMC), uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina (IECA), bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA) ou estatinas, assim como tabagismo e diabetes mellitus. Foi observado maior tempo em diálise nos pacientes com HP em relação ao grupo sem HP (57 x 36 meses,  $P = 0,026$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos quando comparados os biomarcadores de estresse oxidativo. **Conclusão:** Não foi encontrada associação entre presença de HP e aumento no estresse oxidativo nos pacientes estudados. O tempo de diálise esteve associado à ocorrência de HP.

## 5.2 INTRODUÇÃO

Hipertensão pulmonar (HP) é a condição hemodinâmica e patofisiológica definida por aumento sustentado da pressão arterial pulmonar média, medida por cateterismo cardíaco direito, maior ou igual a 25 mmHg [1]. Em pacientes renais crônicos, a Equação de Bernoulli é frequentemente utilizada para o rastreamento ecocardiográfico de HP, sendo que a maioria dos autores considera HP presente nestes indivíduos se  $PASP >$  ou igual a 35mmHg [1-2]. A HP tem alta prevalência em pacientes com doença renal crônica (DRC). Em estudos transversais prévios, Yigla e cols. relataram prevalência de 13,7 % de HP entre 127 pacientes pré-dialíticos [3], enquanto outros autores mostraram prevalência de 39 % de HP nos pacientes com DRC avançada não dialítica e de 56 % naqueles submetidos à diálise [3-4]. Em pacientes em terapia dialítica, a HP parece ter maior prevalência nos pacientes submetidos à hemodiálise (HD) aos submetidos a diálise peritoneal (DP) (30 a 58%, contra 12,5-40%, respectivamente) [5] e está associada à aumento de eventos cardiovasculares, mortalidade cardiovascular e geral e piores desfechos pós transplante renal [1-6]. A patogênese da HP nessa população não é muito bem conhecida. Em pacientes em HD, presença de FAV com acesso vascular para HD, anemia, disfunção cardíaca,

hipervolemia, baixa biocompatibilidade das membranas dialíticas, distúrbios do metabolismo mineral e ósseo, incluindo aumento de fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF 23) e inflamação sistêmica, dentre outros, têm sido sugeridos como fatores associados [7-8].

Pessoas com DRC apresentam estresse oxidativo aumentado, sendo que este aumento se acentua quanto maior for o grau de disfunção renal crônica, sendo bastante elevado em pacientes em HD e DP [5-9]. Não encontramos na literatura estudos que tenham avaliado possível associação entre biomarcadores de estresse oxidativo e HP em pacientes em HD. O objetivo do estudo foi avaliar a possibilidade desta associação, assim como avaliar a prevalência de HP em uma amostra de indivíduos em HD. O encontro de uma possível associação positiva entre estes biomarcadores e HP em pacientes em HD pode ajudar a elucidar a patogênese, assim como reduzir a morbimortalidade destes indivíduos.

### **5.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.3.1 Delineamento e População**

Estudo transversal, no qual participaram pacientes renais crônicos, maiores de 18 anos, em HD por mais de três meses em duas unidades de hemodiálise, que, após serem adequadamente informados sobre a natureza e os objetivos do estudo, concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Estudo aprovado pelo comitê de ética- CAAE= 36413314.4.0000.5231). Foram excluídos os pacientes que estavam realizando HD por meio de cateteres temporários, portadores de infecção ativa, história de infecção que tenha motivado internação hospitalar nos últimos 30 dias, portadores de neoplasias ativas, portadores de Hepatites B e C, portadores do vírus HIV, de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), de insuficiência cardíaca (IC) com fração de ejeção menor que 45%, portadores de valvopatias (estenoses e insuficiências severas) e hepatopatias crônicas. Ao final desta etapa, 89 pacientes foram selecionados para iniciarem o estudo. Deste total, treze pacientes foram perdidos, sendo seis por janela ecocardiográfica difícil; dois por disfunção ventricular esquerda < 45 % ao ecocardiograma; quatro por desistência em participar do estudo e um por dados laboratoriais

incompletos. Dados antropométricos, clínicos e resultados de exames laboratoriais rotineiramente realizados para pacientes em HD foram obtidos a partir da história clínica e da revisão dos prontuários destes pacientes.

As coletas de exames laboratoriais específicos para o estudo, bem como a feitura dos ecocardiogramas, ocorreram na segunda sessão semanal (às quartas e quintas-feiras) entre os meses de maio e junho de 2015.

Participaram do estudo pacientes dos três turnos dialíticos (manhã, tarde e noite). Após a punção das fistulas arteriovenosas (FAVs), antes do início das sessões de diálise, amostras de sangue foram retiradas para a realização dos biomarcadores de estresse oxidativo e inflamação constantes no protocolo do estudo. Ao final das sessões de HD, com os pacientes sendo considerados como estando no seu “peso seco” (ausência de edema clínico e de sinais de hipovolemia) os mesmos foram encaminhados ao laboratório de ecocardiografia, onde os exames foram realizados e obtidos dados da pressão arterial pulmonar.

### **5.3.2 Avaliação ecocardiográfica**

Os exames ecocardiográficos foram realizados pelo mesmo operador (F.R.) utilizando-se ecocardiógrafo GE Vivid I com sonda cardíaca setorial adulta 3S-RS (1,5-4,4 MHz). Durante o exame foram avaliadas as funções ventriculares direita e esquerda, as dimensões das cavidades cardíacas direitas e esquerdas, a pressão de enchimento ventricular esquerdo, o volume do átrio esquerdo, o padrão de enchimento diastólico (com estudo de Color Doppler e Doppler tecidual) e doenças valvares seguindo os critérios da ASE.

A medida da pressão da arterial pulmonar foi realizada de modo indireto através da equação de Bernouli modificada {velocidade do fluxo regurgitante tricuspídeo ao quadrado multiplicado por quatro, somada à pressão do átrio direito, avaliada pela dimensão da veia cava inferior (VCI) e sua variação respiratória}. Para pacientes com dimensão da VCI menor que 2,1 cm e variação respiratória maior que 50 %, foi atribuído 3 mmHg de pressão de átrio direito. Para pacientes com dimensão da VCI maior que

2,1 cm e variação respiratória menor que 50% foi atribuído 15 mmHg de pressão de átrio direito e para as medidas intermediárias foi atribuído 8 mmHg, seguindo as recomendações para medida de câmeras direitas pela ASE [2]. Foi seguida a ordem cronológica de chegada e saída dos pacientes em seus respectivos turnos, minimizando o tempo de espera do paciente para feitura do exame. O valor de corte utilizado para definir HP para este estudo foi presença de PAPS  $\geq$  35 mmHg.

### 5.3.3 Análises bioquímicas

As amostras foram obtidas apenas uma vez, imediatamente antes do início das sessões de HD. Cerca de 20 mL de sangue de cada paciente foi coletado da linha venosa em tubos com vácuo (Vacutainer). Os tubos foram armazenados em geladeira por no máximo 4 horas e a seguir transportados em recipiente refrigerado (bolsa térmica com gelox) até o laboratório de Pós-Graduação do Hospital Universitário de Londrina, com tempo máximo de deslocamento de 20 min. Os frascos foram centrifugados a 1.006 g por 15 min e alíquotas de plasma foram armazenados a **70 °C até a realização das análises.**

Determinações de níveis séricos de hemoglobina, ureia, creatinina, cálcio, fósforo, paratormônio (PTH), hemoglobina, uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e aspartate alanintransferase (AST) fazem parte dos exames de rotina das unidades de HD e foram efetuadas pelos métodos bioquímicos de rotina.

### 5.3.4 Mensuração de parâmetros de inflamação

Determinações dos níveis de proteína c reativa (PCR) ultrasensível e transtirretina (pré-albumina) foram obtidas por metodologias automatizadas no aparelho Architect, Abbott, USA.

### 5.3.5 Mensuração do estresse oxidativo

Para mensuração do estresse oxidativo, utilizamos o seguinte painel: Potencial Antioxidante Total Plasmático – TRAP; dosagem de metabólitos do Óxido Nítrico – NOx; quantificação dos Produtos de Oxidação Proteica Avançada – AOPP; grupamento sulfidrílica – SH; atividade da paroxonase 1 - PON1; superóxido dismutase – SOD; catalase; glutatona total – GT; glutatona reduzida – GR; glutatona oxidada – GSSG; transtirretina (pré-albumina).

Os níveis de NOx foram avaliados indiretamente por meio da determinação da concentração de nitritos plasmáticos, utilizando uma adaptação da técnica descrita por Navarro-Gonzalez et al. 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 [10]. A TRAP foi avaliada por quimioluminescência em uma adaptação do método descrito por Repetto et al. Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no plasma e fornece valores de TRAP em equivalentes de Trolox (um análogo de vitamina E), corrigidos para o ácido úrico sérico dos pacientes [11]. Para determinar proteínas oxidadas no sangue (AOPP) foi utilizada o método descrito por Hanasand et al. (2012). AOPP é uma medida colorimétrica dos níveis de proteínas oxidadas. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 340nm. A concentração de AOPP foi expressa em  $\mu\text{M/L}$  de equivalente de cloramina 657 T [12]. Para determinar grupamento SH no sangue foi utilizado o método descrito previamente por Hu (1994) e adaptado para microplaca por Taylan e Resmi (2010). O grupo sulfidril ocorre em compostos não proteicos (glutationa e cisteína livre) e em compostos proteicos (albumina). O método de análise é baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB) com o grupo sulfidril de proteínas que produz o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela. A leitura da reação foi feita em um em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 412 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ . [14]. O teste utilizado para determinar a atividade total da PON-1 pela formação de hidrólise do fenil-acetato (fenol), foi baseado na metodologia descrita por Richter, Jarvink Furlong (2008). A taxa de hidrólise de fenil-acetato, é determinada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 270 nm, medidos durante 4 min (16 leituras com intervalo de 15 segundos entre as leituras) com a temperatura mantida a 25°. A atividade foi expressa em U/mL com base no coeficiente de extinção molar do fenil-acetato que equivale a 1,31mMol/Lcm-1 [15]. Para determinar a atividade da enzima SOD nos eritrócitos foi usado o método

descrito por Marklund e Marklund (1974). Esta técnica baseia-se na inibição que esta enzima promove na auto-oxidação do pirogalol em solução aquosa. A quantidade de SOD que foi capaz de inibir 50% da oxidação do pirogalol foi definida como uma unidade de atividade enzimática. A leitura da reação da SOD foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) com o comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos em U/mim/gHb [15]. A atividade da enzima catalase nos eritrócitos foi aferida através da medida do decaimento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e geração de oxigênio, utilizando a técnica descrita por Aebi (1984). A leitura foi realizada em uma leitora de microplacas, marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em abs/min/gHb [16]. Para determinar a concentração de GT, GSH e GSSG em hemácias através da formação do ácido tionitrobenzóico (TNB) no comprimento de onda de 412 nm em espectrofotômetro, foi utilizada a técnica descrita por Tietze et al. 1969 e Anderson, 1985. O TNB é resultante da reação de duas moléculas de GSH (amostra) e uma do ácido ditio-bis-nitrobenzóico (DTNB), obtendo-se assim a quantidades de GSH. Nesta reação além do TNB é formado também a glutatona oxidada (GSSG). Na presença da glutatona redutase e de NADPH a GSSG resultante da primeira reação (ou aquele que já estava presente na amostra) é reconvertido em GSH que é re-oxidado a GSSG formando mais TNB, e obtendo-se as quantidades de GT presente na amostra. A quantidade de GSSG é obtida por cálculo através da subtração da GT- GSH/2. A leitura da reação foi feita em uma leitora de microplaca marca Perkin Elmer®, modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em mM/gHb [17-18].

### 5.1.1 Análise estatística

Os dados foram analisados de forma descritiva e inferencial no programa R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, testes bicaudais foram aplicados e valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo. As variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de tabelas de frequência (absoluta e relativa). As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média e intervalo de confiança de 95% ou mediana e intervalo interquartil, segundo a normalidade dos dados, testada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Os pacientes foram divididos em dois grupos: portadores ou não de HP, e utilizou-se o teste t para amostras independentes para comparação da idade e IMC e o teste de Mann-Whitney para comparação do tempo de diálise entre os grupos. Além disso, usou-se o Teste do Qui Quadrado ou Exato de Fisher para comparação das proporções de pacientes por gênero, prevalência de hipertensão, diabetes e tabagismo e uso de estatinas.

O teste de correlação de Pearson não foi usado para correlacionar as variáveis do estresse oxidativo por não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

#### **5.4 Resultados**

Os 76 pacientes foram divididos em 2 grupos, com e sem HP (com medida indireta realizada pelo ecocardiograma) e valor de corte para HP utilizado foi maior ou igual a 35 mmHg. A prevalência foi de 50 % de pacientes com HP na população estudada. Os grupos apresentaram características semelhantes (Tabela 1) quando comparados quanto a idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), tabagismo, diabetes, uso de estatinas e inibidores dos receptores de angiotensina (IECA) ou bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA). Foi observado maior tempo em diálise nos pacientes com HP em relação aos pacientes sem HP (57 versus 36 meses), ( $P=0,026$ ).

A comparação dos resultados de exames laboratoriais de estresse oxidativo e de inflamação nos grupos com e sem HP não revelou diferença entre os grupos, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Os exames laboratoriais de rotina selecionados para o estudo também foram comparados entre os dois grupos, novamente sem que se observasse diferença significativa entre os mesmos, conforme apresentado na Tabela 3.

#### **5.5 Discussão**

O presente estudo teve como proposta evidenciar possíveis diferenças entre vários biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes em HD apresentando e não apresentando HP, utilizando o ecocardiograma como método de triagem e valores de PSAP  $\geq 35$  mmHg como critério para

os biomarcadores de estresse oxidativo, bem como os de inflamação e de metabolismo mineral e ósseo estudados, não se mostraram diferentes entre os grupos. Na literatura, não encontramos estudos clínicos que avaliaram possível associação entre HP e aumento de estresse oxidativo em pacientes em HD. De Marco e cols encontraram elevação de estresse oxidativo em ratos com HP [9]. Achados semelhantes foram encontrados em indivíduos com HP, mas sem DRC [19].

O estresse oxidativo em conjunto com fatores inflamatórios elevados pode gerar disfunção endotelial por promover desbalanço entre os sistemas vasoconstrictores (endotelina 1, serotonina, tromboxano e angiotensina II) e vasodilatadores (óxido nítrico e prostaciclina) e assim promover proliferação, hipertrofia e fibrose das arteríolas pulmonares. A oclusão causada pela hipertrofia em estágios avançados pode causar um aumento da pós-carga do VD devido a HP e contribuir assim para a sua hipertrofia. Inicialmente o VD aumenta seu débito para tentar vencer a pressão elevada no sistema pulmonar, porém, em casos avançados, ele pode ficar insuficiente [20]. O aumento do seu diâmetro, débito cardíaco direito reduzido e pressões de enchimento elevadas aumentam a isquemia miocárdica e assim contribuem para o desarranjo hemodinâmico, pois ativam o BNP, angiotensina II, aldosterona, estresse oxidativo e inflamação, causando a morte celular. A falência do VD é uma causa comum de morte em pacientes com HP [4-9-10- 20]. Alguns autores consideram que a HP em pacientes renais crônicos seja uma condição ligada à disfunção endotelial encontrada nestes pacientes [7-9]. Neste sentido, Meng e cols [19] demonstraram correlação positiva moderada entre os níveis séricos de dimetilarginina assimétrica (ADMA) e valores de PSAP ( $r = 0,521$ ;  $P = 0,013$ ) em pacientes em HD. A ADMA é uma potente inibidora da óxido nítrico sintase. Níveis séricos de ADMA encontram-se aumentados em pacientes com DRC. A redução na disponibilidade de óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador endotelial, é uma importante causa de disfunção endotelial associada à uremia.

O tempo em diálise, em meses, foi maior no grupo com HP. Tal achado pode sugerir que eventos relacionados a maior tempo de permanência em diálise como, por exemplo, tempo de permanência das FAVs, anemia crônica, maior tempo de exposição às membranas de dialisadores não completamente biocompatíveis, maior tempo exposição à hipervolemia com sobrecarga crônica ao VD,

maior tempo de exposição à toxinas urêmicas/ambiente urêmico ou outros fatores ainda não claramente identificados possam estar envolvidos na fisiopatologia da HP em pacientes em HD, como já sugerido por outros autores [1-4-6]. Como exemplo desta última afirmação muito recentemente foi proposto que microbolhas geradas durante o procedimento de hemodiálise, não detectadas pelos detectores de ar atualmente disponíveis nas máquinas de HD, poderiam causar dano à vasculatura pulmonar e acarretar HP [21]. O fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF 23) é um hormônio fosfatúrico produzido principalmente por osteócitos e postulado como causador de dano ao miocárdio e piores desfechos em pacientes com DRC, e também pode estar associado com presença de HP [10]. Estudo realizado na Turquia evidenciou achado semelhante, com tempo médio em meses de diálise significativamente maiores para o grupo de pacientes em HD com HP [22] resultado idêntico ao observado por Mahdavi-Mazdeh e cols. em pacientes sauditas em HD [23].

Meng J e cols. estudando pacientes chineses em HD relataram prevalência de 32% de HP. Este estudo também mostrou redução da HP após transplante renal [19] sugerindo, a exemplo de Yigla e cols., que o transplante renal precoce possa ser de valor para os pacientes renais crônicos em HD com HP [3]. Alguns estudos apontavam níveis baixos de hemoglobina (Hb) como um possível fator para a elevação dos marcadores de estresse oxidativo, porém, os grupos estudados apresentaram resultados semelhantes de níveis de Hb [24]. Foi encontrado prevalência de 50% de HP nos pacientes estudados, resultado um pouco maior que a prevalência de 30,6% de HP relatada Telini et al [25] entre pacientes em HD na cidade de Botucatu, SP, BR, mas semelhante ao encontrado por outros autores em diferentes países, utilizando de forma semelhante, o ecocardiograma como critério diagnóstico para HP [26].

As análises das características gerais dos dois grupos evidenciaram uma distribuição homogênea entre idade, sexo, IMC, tabagismo, diabetes, uso de IECA, BRA e estatina. O uso de estatinas poderia resultar em níveis menores de estresse oxidativo devido ao efeito antioxidante desses fármacos [9].

Em relação aos exames laboratoriais referentes aos distúrbios minerais e ósseos (cálcio, fósforo, PTH), nenhuma diferença foi encontrada entre os dois grupos. A elevação desses fatores está associada a maior calcificação dos vasos pulmonares, corroborando assim para a genese da HP [1].

Os pacientes dos dois grupos encontravam-se adequadamente dialisados com médias semelhantes de Kt/V. As médias de glicemia, aspartatoalanina transferase (AST), ureia e creatinina também não diferiram entre os grupos.

O presente estudo apresenta limitações como, por exemplo, o número relativamente pequeno de pacientes estudados e a falta de cateterismo cardíaco direito para o diagnóstico definitivo de HP. Entretanto, a ecocardiografia é frequentemente utilizada para o rastreamento de HP em pacientes com e sem DRC.

Como pontos positivos do trabalho, citamos a avaliação ecocardiográfica após a sessão de HD, com os pacientes supostamente nos seus “pesos secos” e a avaliação da cava e sua variação respiratória como forma de estimar a pressão no átrio direito, evitando-se o sobrediagnóstico de HP. Muitos estudos atribuíram valor fixo em 10 mmHg a pressão do atrio direito, não considerando a cava e sua variabilidade respiratória, além de critérios de exclusão para causas conhecidas de HP e utilização de um amplo painel de biomarcadores tanto de substâncias antioxidantes endógenas, quanto de marcadores de lesão por estresse oxidativo aumentado em lipídios e proteínas.

#### **5.4 Conclusão**

A A HP acometeu 50% da amostra estudada. Não houve associação entre presença de HP e biomarcadores de estresse oxidativo aumentado. A fisiopatologia da HP parece ser multifatorial e o presente estudo está em linha com esta observação. Pela associação positiva entre tempo em hemodiálise e presença de HP verificada neste estudo, outros fatores como tempo de permanência de FAV para acesso hemodialítico e flutuações nos níveis de hemoglobina gerando aumento na pré-carga nas câmaras cardíacas direitas, hipervolemia crônica, disfunção cardíaca incipiente, disfunção endotelial, bem como outros fatores associados à uremia, talvez possuam papel mais relevante que o estresse oxidativo para o desenvolvimento de HP em pacientes em HD. Estudos adicionais são necessários para o maior entendimento e manejo da HP em pacientes em HD.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO**

- [1] Kawar B, Ellam T, Jackson C, et al. Pulmonary hypertension in renal disease: Epidemiology, potential mechanisms and implications. *AmJ Nephrol* 2013; 37:281-290.
- [2] ASE- American Society of Echocardiography Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging, *JASE*, January 2015.
- [3] Yigla M, Nakhoul F, Sabag A, Tov N, et al. Pulmonary hypertension in patients with end-stage renal disease. *Chest* 2003; 123:1577–1582.
- [4] Kosmadakis G, Aguilera D, Carceles O, et al. Pulmonary hypertension in dialysis patients. *Ren Fail* 2013; 35:5114-5120.
- [5] Bolignano D, Restelli S, Agarwal R, et al. Pulmonary hypertension in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2013;61(4):612-622.
- [6] Agarwal R: Prevalence, determinants and prognosis of pulmonary hypertension among hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:3908–3914.
- [7] Yu M, Chen H, Hsu Y, et al. Systemic inflammation is associated with pulmonary hypertension in patients undergoing haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1946-1951.
- [8] Sise E, Courtwright M, Channick R, et al. Pulmonary hypertension in patients with chronic and end-stage kidney disease. *Kidney Int* 2013; 84:682-692873
- [9] DeMarco V, Whaley-Connell A, Sowers J, et al Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *WJC* 2010 october 26; 2(10):316-324.
- [10] Navarro-gonzález J, García-benayas C, Arenas J, et al. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinica Chemica* 1998; 44:679-681.
- [11] Repetto M, Reides C, Carretero G, et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chemica* 1996; 255: 107-117.

- [12] Hanasand M, Omdal R, Norheim K, et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta* 2012; 413:901-906. Hu M, Abelson J, Simon M, et al. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press 1994;233:380-82.
- [13] Richter R, Jarvik G, Furlong C, et al. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ. Cardiovasc* 2008;1:147-152.
- [14] Marklund S, Marklund, G. Involvement of the superoxide dismutase anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 1974; 47:469-471.
- [15] Aebi, H. Catalase in vitro. in: PACKER, Lester. *Methods Enzymology*, Elsevier, 1984;105: 121-126.
- [16] Anderson M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 1985;113: 548-555.
- [17] Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 1969; 27: 502-522.
- [18] Meng J, Li Z, Jiang W, et al. Relationship of Serum ADMA with pulmonary hypertension in patients on Hemodialysis. *Dialysis and Transplantation* 2010;242-246.
- [19] Sise M, Courtwright A, Channick R et al. Pulmonary hypertension in patients with chronic and end-stage kidney disease. *Kidney Int* 2013; 84:682-692.
- [20] Etemadi J, Zolfaghari H, Firoozi R, et al. Unexplained pulmonary hypertension in peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Rev Port Pneumol*. 2012;18(1):10-14.
- [21] Bozbas S, Kanylmaz S, Akcay S, et al. Renal transplant improves pulmonary hypertension in patients with end stage renal disease. *Multiidisciplinary respiratory Medicine* 2011;6(3):155-160.
- [22] Mahdavi-Mazdeh M, Alijavad-Mousavi S, Yahyazadeh H, et al. Pulmonary hypertension in hemodialysis patient. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2008;19(2):189-193.

[23] Sarnak M, Roberts K, Pulmonary hypertention in CKD: Some Answers, yet more questions. Editorial J Am Soc Nephrol.2015.27.

[24] Telini W, Yoo H, Queluz T, et al. Hipertensão pulmonar em pacientes com doença renal crônica dialítica está associada com hipervolemia e inflação, Repositório institucional UNESP 2015-02-15.

[25] Mukhtar K, Mohkumuddin S, Mahmood S, et al. Frequency of pulmonary hypertension in hemodialysis patients. Pak j Med Sci 2014;30 (6):1319-1322.

**Tabela 1- Características gerais da população do estudo.**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>SEM HIPERTENSÃO PULMONAR (n=38)</b>	<b>COM HIPERTENSÃO PULMONAR (n=38)</b>	<b>P IC 95%</b>
Idade, anos (3 <sup>a</sup> media; IC 95%)	54,68 (50,24-59,11)	55,78 (51,26-60,31)	0,7238
IMC (3 <sup>a</sup> media; IC 95%)	27,59 (25,53-29,64)	25,63 (23,93-27,33)	0,1406
Tempo de Diálise, meses (Mediana; 10 Quartil-30 Quartil)	36,0 (24-72)	57,0 (40-108)	0,2572 x 10 <sup>-1</sup> a
Sexo			
Masculino, n (%)	21 (46,67)	24 (53,33)	0,6339
Feminino, n (%)	16 (55,17)	13 (44,82)	
Diabetes Melitus, n (%)	6 (16,22)	5 (13,51)	1,00
Tabagismo, n (%)	3 (8,11)	3 (8,11)	1,00
Uso de Estatina, n (%)	9 (24,32)	11 (29,73)	0,794
Uso de IECA/BRA n (%)	15 (40,54)	13 (35,14)	0,8106

IMC: Índice de massa corporal; IECA: Inibidor da enzima de conversão; BRA: Bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II

a Teste Mann-Whitney

**Tabela 2 - Comparação das medidas laboratoriais de estresse oxidativo e de inflamação nos grupos com e sem hipertensão pulmonar.**

<b>MEDIDAS LABORATORIAIS</b>	<b>SEM HIPERTENSÃO PULMONAR (n=38)</b>	<b>COM HIPERTENSÃO PULMONAR (n=38)</b>	<b>P IC 95%</b>
Nox- uM, Média (IC 95%)	13,36 (11,47-15,25)	13,46 (11,67-15,24)	0,94
SH- uM, Média (IC 95%)	258,76 (237,94-279,57)	260,45 (240,58-280,32)	0,9051
Ácido Úrico- mg/dl Mediana (IIQ)	5,72 (5,04-6,57)	5,45 (4,76-6,07)	0,3173
TRAP- uM Trolox Média (IC 95%)	1138,94 (1105,14-1172,74)	1155,23 (1123,77-1186,69)	0,4766
TRAP/Ácido Úrico Média (IC 95%)	200,75 (188,17- 213,32)	211,47 (196,80 - 226,13)	0,2641
HIDRO- RLU Mediana (IIQ)	15,10x105 (9,18x105 - 17,02x105)	14,10x105 (10,22x105- 18,67x105)	0,7309
AOPP- umoles/L de equivalentes de cloramina T, Mediana (IIQ)	152,60 (110,90- 190,10)	129,20 (104,50- 141,70)	0,1198
PON- U/ml Média (IC 95%)	152,30 (140,00- 164,60)	148,39 (137,85- 158,93)	0,6257
SOD- U/min/gHb Mediana (IIQ)	72,15 (63,66- 81,10)	75,03 (54,08- 89,25)	1,00
Catalase- abs/min/gHb Média (IC 95%)	48,64 (44,97- 52,31)	46,80 (43,26- 50,35)	0,4673
Glutaciona Total- mM/gHb Mediana (IIQ)	8,25 (7,59- 9,16)	8,84 (7,97- 9,33)	0,1474
Glutaciona Reduzida- mM/gHb Mediana (IIQ)	4,537 (4,25- 4,76)	4,509 (4,41- 4,80)	0,5188
Glutaciona Oxidada- mM/gHb Mediana (IIQ)	1,80 (1,65- 2,23)	2,12 (1,76- 2,41)	0,1608
Transtirretina- mg/dl Média (IC 95%)	41,7 (37,52- 45,96)	37,77 (33,82- 41,72)	0,1674

Nox: Metabólitos do óxido nítrico; SH: Grupamento sulfidril; TRAP: Capacidade antioxidante total plasmática; Hidro: Hidroperóxidos; AOPP: Produtos avançados da oxidação de proteínas; PON: Atividade da Paraoxonase; SOD: Superóxido dismutase; PCR: Proteína C reativa; RLU: Relative light units (unidades relativamente leves).

**Tabela 3** - Comparação das medidas laboratoriais de rotina nos grupos com e sem Hipertensão pulmonar.

<b>MEDIDAS LABORATORIAIS</b>	<b>SEM HIPERTENSÃO PULMONAR (n=38)</b>	<b>COM HIPERTENSÃO PULMONAR (n=38)</b>	<b>P IC 95%</b>
Hemoglobina- g/dl Mediana (IIQ)	11,30 (10,10- 12,10)	11,10 (10,30- 12,00)	0,5375
Uréia sérica- mg/dl Média (IC 95%)	135,49 (123,84- 147,13)	135,93 (125,43- 146,43)	0,9547
Creatinina sérica- mg/dl Média (IC 95%)	10,59 (9,66- 11,52)	10,47 (9,61- 11,33)	0,8461
Kt/V Média (IC 95%)	1,34 (1,26- 1,42)	1,28 (1,20- 1,35)	0,2278
Paratormônio- ng/L Mediana (IIQ)	277,2 (123,6- 510,0)	386,3 (187,0- 802,9)	0,1452
Cálcio sérico- mg/dl Mediana (IIQ)	8,50 (8,00- 8,90)	8,60 (8,20- 9,60)	0,1777
Fósforo sérico- mg/dl Mediana (IIQ)	5,80 (4,70- 6,70)	5,80 (4,20- 6,80)	0,833
Glicose- mg/dl Mediana (IIQ)	95,0 (84,0- 141,0)	101,0 (85,0- 121,0)	0,9698
ALT-UI/L Mediana (IIQ)	15,00 (9,00- 19,00)	13,00 (10,00- 19,00)	0,8454

Kt/V: Índice da remoção de ureia durante a sessão de hemodiálise (marcador de adequação de hemodiálise; valores maiores que 1,2 considerados indicativo de diálise adequada; ALT: Aspartato alanina aminotransferase.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos pelo presente estudo evidenciam, na opinião dos autores, o caráter multifatorial da HP nos pacientes em HD, sendo que o estresse oxidativo não mostrou estar associado à presença de HP, talvez pela preponderância de outros possíveis fatores causativos de HP nestes pacientes. Fatores associados com o tempo prolongado de tratamento hemodialítico parecem ter papel importante na gênese da HP e a abreviação do tempo em HD pelo transplante renal, sempre que possível, cuidado e correção de FAVs com fluxos sanguíneos exagerados, combate à hipervolemia, manejo otimizado da anemia e uso de capilares com membranas o mais biocompatíveis possíveis, por exemplo, podem ser benéficos para a redução da prevalência e da gravidade da HP.

### REFERÊNCIAS DOS ITENS DE 1 A 4

- [1] Kowar B, Ellam T, Jackson C, et al. Pulmonary hypertension in renal disease. Epidemiology, potential mechanisms and implications. *Am J Nephrol* 2013;37:281- 923 290.
- [2] Bozbas S, Kanylmaz S, Akcay S, et al. Renal trasplant improves pulmonary hypertension in patients with end stage renal disease. *Multidisciplinary respiratory Medicine* 2011;6(3):155-160.
- [3] Aduen J, Castello R, Daniels J, et al. Accuraci and precision of three Echocardiographic Methodos for estimating mean pulmonary artery pressure. *Chest* 2011;139:347-352.
- [4] ESC guideline for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European heart journal* 2016 37: 67-119. Disponível em: <https://www.escardio.org/>.
- [5] Acarturk G, Albayrak R, Melek M, et al. The relationship between arteriovenous fistula blood flow rate and pulmonary artery pressurein hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2008; 40:509–513.
- [6] Yigla M, Nakhoul F, Sabag A, et al. Pulmonary hypertension in patients with end-stage renal disease. *Chest* 2003; 123: 1577–1582.

[7] Sarnak M, Roberts K. Pulmonary hypertention in CKD: Some Answers, yet more questions. Editorial J Am Soc Nephrol 27;2015.

[8] Navaneethan S, Wehbe E, Heresi G, et al. Presence and outcomes of kidney disease in patients with pulmonary hypertension: Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(5):855-863.

[9] Reque J, Prieto G, Linares T, et al. Pulmonary hypertension is associated with mortality and cardiovascular events in chronic kidney disease patients. Am J nephrol 2017;45:107-114.

[10] Ramasubbu K, Deswal A, Herdejürgen C, et al. A prospective echocardiographic evaluation of pulmonary hypertension in chronic hemodialysis patients in the United States: prevalence and clinical significance. Int J Gen Med 2010; 3: 279–286.

[11] Agarwal R: Prevalence, determinants and prognosis of pulmonary hypertension among hemodialysis patients. Nephrol Dial Transplant 2012; 27:3908–3914.

[12] Etemadi J, Zolfaghari H, Firoozi R, et al. Unexplained pulmonary hypertension in peritoneal dialysis and hemodialysis patients. Rev Port Pneumol. 2012;18(1):10-14.

[13] Pabst S, Hammerstingl C, Hundt F, et al. Pulmonary hypertension in patients with chronic kidney disease on dialysis and without dialysis: results of the PEPPER-study. PLoS One 2012; 7:e35310.

[14] Sise M, Courtwright A, Channick R, et al. Pulmonary hypertension in patients with chronic and end-stage kidney disease. Kidney Int 2013;84:682-692.

[15] Yu T, Chen Y, Hsu J, et al. Systemic inflammation is associated with pulmonary hypertension in patients undergoing haemodialysis. Nephrol Dial Transplant 2009;24:1946-1951.

[16] Nicholl D, Ahmed S, Loewen A, et al. Declining kidney function increases the prevalence of sleep apnea and nocturnal hypoxia. Chest 2012; 141: 1422–1430.

[17]Basile C, Lomonte C, Vernaglione L, et al. The relationship between the flow of arteriovenous fistula and cardiac output in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 282–287.

[18]Yigla M, Banderski R, Azzam Z, et al. Arterio-venous access in end-stage renal disease patients and pulmonary hypertension. *Ther Adv Respir Dis* 2008; 2: 49–53.

[19]Fabbian F, Cantelli S, Molino C, et al. Pulmonary hypertension in dialysis patients: a cross-sectional Italian study. *Int J Nephrol* 2010; 2011: 283475.

[20]Amin M, Fawzy A, Hamid M, et al. Pulmonary hypertension in patients with chronic renal failure: role of parathyroid hormone and pulmonary artery calcifications. *Chest* 2003; 124: 2093–2097.

[21]Kiykim A, Horoz M, Ozcan T, et al. Pulmonary hypertension in hemodialysis patients without arteriovenous fistula: the effect of dialyzer composition. *Ren Fail* 2010; 32: 1148–1152.

[22]DeMarco V, Whaley-Connell A, et al Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *WJC* 2010 October 26;2(10):316-324.

[23]Dhaun N, Goddard J, Webb DJ: The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 943–955.

[24]ASE- American society of Echocardiography Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging, JASE, January 2015.

[25]Navarro-gonzález J, García-benayas C, Arenas J. et al. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinica Chemica* 1998;44: 679-681.

[26]Repetto M, Reides C, Carretero G, et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chemica* 1996; 255: 107-117

[27]Hanasand M, Omdal R, Norheim K, et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chemica* 2012; 413:901-906

[28]Hu M, Abelson J, Simon M, et al. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*. California: Academic Press 1994;233:380-82.

[29]Richter R, Jarvik, G, Furlong C, et al. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ. Cardiovasc. Genet.*2008;1:147- 152.

[30]Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide dismutase anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry* 1974; 47: 469-471.

[31]Aebi, E. Catalase in vitro. in: PACKER, Lester. *Methods Enzymology*, Elsevier, 1984; 105:121-126.

[32]Anderson, M. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*.1985;113:548-555.

[33]Tietze, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*.1969;27: 502-522.

## APÊNDICES

### A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Estresse Oxidativo e Hipertensão Pulmonar em Pacientes em Hemodiálise”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa: “Estresse Oxidativo e Hipertensão Pulmonar em Pacientes em Hemodiálise”, a ser realizada em: “Unidades de Hemodiálise em Londrina: Instituto do Rim de Londrina e Histocom Atividades Médicas de Londrina”.

O objetivo da pesquisa é avaliar os níveis de hipertensão pulmonar e de estresse oxidativo em uma amostra dos pacientes em hemodiálise na cidade de Londrina. Hipertensão Pulmonar é a pressão alta nas artérias dos pulmões, que causa entre outros, cansaço e falta de ar. O estresse oxidativo é o desbalanço entre produção e eliminação das espécies reativas de oxigênio. Esse desbalanço prejudica a respiração das células e pode até mata-las. Sabemos que a insuficiência renal é uma causa de hipertensão pulmonar.

Queremos descobrir se os pacientes com níveis altos de estresse oxidativo têm níveis mais altos de hipertensão pulmonar. Se isso for comprovado, poderemos estudar alguma forma de tratamento (uso de antioxidantes?) e entenderemos um pouco mais sobre as causas de hipertensão pulmonar nos pacientes renais crônicos. Sabemos muito pouco sobre essa doença até o momento e, com sua ajuda, vamos contribuir independente do resultado, com a comunidade científica. Por isso, sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: Coleta de exame de sangue e análise dos resultados, seguindo a rotina do centro de diálise que o sr (a) já frequenta. Não serão necessárias novas coletas. Usaremos a mesma amostra de sangue coletada mensalmente nos exames de rotina. Dosaremos alguns marcadores de inflamação além dos demais exames já solicitados rotineiramente. Realizaremos exame de ecocardiograma antes da diálise e logo após o seu término. Os pacientes que concordarem, repetirão o exame de ecocardiograma na manhã do dia seguinte. O ecocardiograma é um ultrassom do coração. É um exame que não dói e não faz mal para a saúde. Todos os exames serão realizados por mim (Dr Fábio Roston).

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas 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. As amostras de sangue, após análise, serão descartadas. Os dados dos exames de ecocardiograma serão armazenados e poderão ser usados para pesquisas e análises futuras.

Esclarecemos, ainda, que o (a) senhor (a) não pagará e nem será remunerado (a) 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, inclusive gastos com transporte ida e volta no dia da dialise e na manhã do dia seguinte, caso o senhor (a) concorde em retornar para a feitura do exame de ecocardiograma. O senhor (a) não pagará por nenhum exame realizado, seja ele de sangue ou ecocardiograma, sendo todo o projeto custeado por nós.

Os benefícios esperados são:

- 1) esclarecer e identificar o estresse oxidativo como uma possível causa ou agravante de hipertensão pulmonar nos pacientes em hemodiálise;
- 2) tentar identificar o melhor momento para avaliação de hipertensão pulmonar (pré, pós ou na manhã seguinte a diálise);
- 3) contribuir com a comunidade científica a esclarecer os malefícios do estresse oxidativo e
- 4) abrir portas, dependendo dos resultados, para um tratamento. Não há nenhum risco a saúde ao participar desse estudo.

Caso o (a) senhor (a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar: Fábio Roston- rua Fernando de Noronha, 609 apto 1001, CEP 86020-300, telefone (43) 96214871 ou residencial (43) 33015446, email: [fabioroston7@yahoo.com.br](mailto:fabioroston7@yahoo.com.br); ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380 (PR 445), Londrina- Pr - CEP: 86057-970, telefone 3371-5455 ou por e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor (a).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

\_\_\_\_\_  
Fábio Roston

RG: 33815377-9

**B - Termo de Aprovação de Pesquisa- Comite de Ética**



COMITÊ de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estresse oxidativo e hipertensão pulmonar em pacientes em hemodíalise  
**Pesquisador:** FABIO ROSTON

**Área Temática: Versão:** 3

**CAAE:** 36413314.4.0000.5231

**Instituição Proponente:** CCS - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Stricto sensu

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 903.152

**Data da Relatoria:** 04/12/2014

### Apresentação do Projeto:

O presente estudo foi classificado como transversal, será realizado em pacientes renais crônicos, maiores de 18 anos, em tratamento dialítico por mais de 3 meses, no Hospital Universitário de Londrina, Instituto do Rim de Londrina e Histocom atividades Médicas de Londrina. Os participantes serão submetidos a um estudo ecocardiográfico completo, pré e pós diálise imediata e 24 horas após o término da diálise com análise da função sistólica e diastólica ventricular esquerda e direita, medidas de dimensões e volumes e análise valvares. Os participantes também serão submetidos a coleta de amostra de sangue periférica (apenas uma única vez) de 20ml, as dosagens séricas investigadas serão: cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, PHT intacto, ferritina, hemoglobina, hematócrito, saturação de transferrina, ureia, creatinina, albumina, ast, alt (exames de rotina do ambulatório de hemodiálise), além de PCR, dialdeído malônico, proteínas oxidadas, proteínas carbamílicas, atividade da paraoxonase (PON1) e metabólitos do óxido nítrico. Os dados irão para análise estatística tentando relacionar o maior nível de pressão pulmonar com níveis mais altos de estresse oxidativo.

### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar possível relação entre alguns biomarcadores de estresse oxidativo e hipertensão pulmonar em uma amostra de pacientes em hemodiálise na cidade de Londrina. Objetivos Secundários:

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Comitê de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer: 903.152

Estudar a prevalência de hipertensão pulmonar em uma amostra de pacientes em hemodiálise na cidade de Londrina, avaliar o melhor momento para rastreamento de hipertensão pulmonar por meio de ecocardiograma, analisar o papel da hipervolemia na patogênese da hipertensão pulmonar em pacientes em hemodiálise. Estudar possível correlação entre os distúrbios do metabolismo mineral ósseo e hipertensão pulmonar em pacientes em hemodiálise. Investigar se há relação entre marcadores do metabolismo de ferro e Hipertensão Pulmonar em pacientes em Hemodiálise.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O pesquisador relata que o projeto não apresenta riscos pois não é classificado como invasivo, as amostras de sangue serão obtidas de acordo com a rotina normal do setor de hemodialise, portanto não necessitarão de coletas sanguíneas adicionais. Segundo a literatura, a pressão pulmonar está relacionado com maior mortalidade. Os dados encontrados na literatura sobre estresse oxidativo e hipertensão pulmonar em pacientes renais crônicos são raros. Novos estudos são necessários para elucidar a fisiopatologia da hipertensão pulmonar em pacientes dialíticos, sugerindo o estresse oxidativo ser mais um fator, porém, talvez passível de tratamento. Como benefícios indiretos, poderemos contribuir ajudando a elucidar o melhor momento da realização do ecocardiograma como método indireto para detecção de hipertensão pulmonar (pré, pós ou na manhã seguinte após dialise). Encontrar relação entre metabolismo mineral ósseo, fatores inflamatórios e estresse oxidativo com níveis mais elevados de pressão pulmonar e sugerir estudos para novos tratamentos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa relevante da área específica, que pretende verificar se o ecocardiograma poderá ser utilizado como um método indireto para detecção de hipertensão pulmonar (HP) e ainda analisar se os pacientes com HP apresentam maior estresse oxidativo e atividade inflamatória.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em relação aos Termos de apresentação obrigatória a Folha Rosto foi refeita e está de acordo. As instituições indicadas no projeto foram: Instituto do Rim, Histocon e HU, no entanto, o pesquisador refere que o HU não será mais instituição participante da pesquisa. A autorização da Clínica Histocon foi substituída com assinatura de outro diretor em papel oficial com a devida assinatura e carimbo funcional. O Termo de Sigilo e Confidencialidade está assinado e foi anexado.

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Comitê de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



Continuação do Parecer: 903.152

O cronograma está adequado e o orçamento apresentado será de responsabilidade do pesquisador. TCLE foi corrigido e está de acordo com a Resolução 466/12.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências foram atendidas pelo pesquisador recomendo aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

LONDRINA, 08 de Dezembro de 2014

**Assinado por:**

---

**Paula Mariza Zedu Alliprandini**  
(Coordenador)

**Endereço:** PROPPG - LABESC - Sala 3

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br

## ANEXO

### Revista Hemodialysis International

#### Author Guidelines

#### Author Services

Resources for authors can be found at Wiley's Author Services website: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/>

#### Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to Pub-Med Central upon acceptance. The accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

#### Online Open

We offer OnlineOpen to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. For information on Online Open and Wiley's Open Access publishing options for authors, please click [here](#).

#### Author Guidelines

#### Editorial Overview

*Hemodialysis International* is an official publication of the International Society for Hemodialysis. There are four quarterly issues: January, April, July, and October. The annual fall supplement, published in October, presents the proceedings of the International Symposium on Hemodialysis of the Annual Dialysis Conference.

*Hemodialysis International* considers only manuscripts that are related in any way to hemodialysis, in the form of original research, clinical experiences, case reports, review papers, letters to the editor, and editorials. Special articles such as commentaries, laudations, history of hemodialysis, clinical quizzes, and brief news notes are also considered.

**Beginning August 1, 2014, all case reports accepted by the Journal will be published online only, and will not appear in the print copy of the Journal, except at the discretion of the editor. Please direct queries to the editorial office at [hdeditorial@wiley.com](mailto:hdeditorial@wiley.com).**

#### Types of Articles Published by *Hemodialysis International*

*Original Investigations* present findings of a research investigation or a large series of cases. *Criteria for review:* validity, originality, and clinical importance. *Limitations:* 3,500 words (excluding abstract, references, acknowledgements, tables, and figure legends); no limit on tables or figures; no limit on authors.

*Case Reports* present a single case or a series of no more than 10 patients. These reports should be succinct and original and should have a single, well-defined message. *Criteria for review:* clinical plausibility and originality. *Limitations:* 1,400 words (excluding abstract, references, acknowledgements, tables, and figure legends); total of 2 figures or tables; maximum of 8 authors is generally recommended. *Beginning August 1, 2014, all case reports accepted by the Journal will be published online only, and will not appear in the print copy of the Journal, except at the discretion of the editor.*

*Editorials* are brief pieces which provide focused commentary and analysis on an article published in HI or in another journal, or on a current issue related to hemodialysis. Editorials are usually invited but may be submitted without invitation. *Limitations:* 1,400 words (excluding abstract, references, acknowledgements, tables, and figure legends); total of 1 figure or table; maximum 3 authors is generally recommended.

*In a Few Words* is a nonfiction narrative essay which gives voice to the personal experiences and stories that relate to hemodialysis. Submissions from physicians, allied health professionals, patients, or family members are welcome, and may concern the personal, ethical, or policy implications of any aspect of hemodialysis in adults and children (acute kidney injury, hemodialysis, ethics, health policy, etc.). Footnotes or references are discouraged. *Limitations:* 1,600 words.

*Correspondence.* A Letter to the Editor may be in response to an article in Hemodialysis International (HI), may concern a topic of current interest relevant to hemodialysis, or may present an abbreviated discussion of research findings. There is no guarantee that letters will be published, and they are subject to editing and abridgment without notice.

Letters responding to HI articles must be received no more than 6 weeks after the article's date of print publication. Letters discussing topics of current interest may be submitted at any time. *Limitations:* 400 words (excluding (excluding abstract, references, acknowledgements, tables, and figure legends); maximum 10 references; total of 1 figure or table; maximum 3 authors.

Correspondence presenting abbreviated research findings should include an introduction, concise methods/results, and a discussion in separate paragraphs (no subheadings are used). As reports of cases do not include methods, they are not suitable for this type of correspondence. *Limitations:* 800 words (excluding abstract, references, acknowledgements, tables, and figure legends); maximum 10 references; total of 2 figures or tables; no limit on authors.

*Review and Special Articles.* A Review Article presents a comprehensive review and/or critique of the literature paired with the authors' experience. It must be thorough and provide educational value and scientific insight. Special Articles encompass content that does not fit in the above categories and may cover any topic of interest related to hemodialysis. Both of these article types are limited to 4,000 words and must include an abstract. Review abstracts are unstructured and limited to 200 words. Special Article abstracts may be unstructured and limited to 200 words, or, if the manuscript reports original research, structured using the standard labels Background, Methods, Results, and Conclusion and limited to 300 words.

Authors of *Invited Articles* should query the editorial office for specific parameters, and may otherwise follow the below instructions.

## **SUBMISSION INSTRUCTIONS**

### **Submission Policy**

Papers submitted to Hemodialysis International are accepted with the understanding that the material described in the manuscript has not been previously published, except in abstract form, and that it is not simultaneously under consideration by any other journal.

**For Regular Issues:** Manuscripts for regular issues (January, April, July and October) must be submitted electronically directly through the *Hemodialysis International* online submission and peer review system: <http://mc.manuscriptcentral.com/hdi>.

Questions concerning the regular issues may be directed to the Journal's Editorial Office: [hdieditorial@wiley.com](mailto:hdieditorial@wiley.com).

**For Proceedings Issues (October Supplement):** If you attended and/or presented at the International Symposium on Hemodialysis (HD) held in conjunction with the Annual Dialysis Conference, you may submit a conference proceedings paper to be considered for publication in the October Proceedings Supplement Issue. Manuscripts for the Proceedings issue should be sent directly to the Proceedings Editorial Office: Claire Oser, Assistant to Dr. Madhukar Misra, University of Missouri, Division of Nephrology, 1 Hospital Drive CE422, Columbia, MO 65212; E-mail: [oserc@health.missouri.edu](mailto:oserc@health.missouri.edu) or [misram@health.missouri.edu](mailto:misram@health.missouri.edu).

The submission deadline for the Proceedings issue is two weeks after the Symposium. Questions concerning the Proceedings issue may be directed to the Proceedings Editorial Office. Manuscripts are peer-reviewed; the comments and recommendations for revisions will be preferentially sent by e-mail. Any manuscript declined by the Proceedings Supplement may be re-submitted to the journal for consideration in a regular issue.

### Manuscript Specifications

Manuscripts must be written in English and double-spaced, 12 pt. Times New Roman font, with 1" margins. The title page, abstract and key words, text, acknowledgments, references, figure legends, and tables should be saved in a *single* file. Figures, supporting information, and permission/disclosure forms should be supplied as separate files. The following instructions should be adhered to:

- Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.
- Do not use I (ell) for 1 (one), O (upper case oh) for 0 (zero) or ß (German esszett) for β(beta).
- Use a tab, not spaces, to separate data points in tables.
- If you use a table editor function, ensure that each data point is contained within a unique cell; do not use carriage returns within cells.

**Title page.** Must include all of the following elements:

- Title of the paper
- Running Head (short title) of less than 40 characters
- First name, middle initial(s), and surname for each author
- Author affiliation(s), indicated by numbers
- Complete contact information for the corresponding author (name, mailing and email addresses)
- Conflict of Interest Statement
- Disclosure of grants or other funding

**Structured Abstract and Keywords.** Manuscripts for Original Articles require a structured abstract of no more than 300 words, presenting essential data in four paragraphs introduced by separate headings in the following order: Introduction, Methods, Findings, and Discussion. For Case Reports and Reviews, authors may submit an unstructured abstract of 250 words or less. The abstract should not include references, figures, tables, or graphs. All manuscripts are required to have 3-6 keywords suitable for indexing. Correspondence and In a Few Words narrative essays do not require abstracts, but should include keywords.

**Sections and Subheadings.** The text should be organized, if possible, into the following sections: Abstract, Body of Article, Acknowledgments, References, Figure Legends, Tables, Appendices. For original papers, the body of the article should have the following subheadings: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion

**Product Names.** In the text, preferentially use generic names. For all brand names of drugs, equipment, and supplies, provide the manufacturer and location including city and country. For trademarks and registered trademarks, use appropriate symbols.

**Methods Section.** When reporting experiments on humans, indicate whether the procedures followed were in accord with the ethical standards of the committee on human experimentation of your institution or in accord with the Declaration of Helsinki and its revisions. If the procedures used were not approved, please explain why approval was waived or unnecessary. Include a statement about whether informed consent was obtained from subjects and, if so, whether it was oral or written. For experiments on animals, indicate whether the guidelines of the institution's committee on animal experimentation or of the [National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) were followed.

**Acknowledgements.** Please include all Acknowledgements at the end of the text before the References.

**References.** Cite within the text using superscript numbers. At the end of the manuscript, double-space the entire reference list and arrange the references in the order in which they are first cited within the text. Include only works cited in the text. Cite personal communications and unpublished work in the text only, giving name and initials of authors and the year of writing. Spelling of author's name and citation of dates must correspond exactly in text and reference list. Do not underscore or italicize anything (except genus and species names, and journal titles), and omit almost all punctuation (see examples). Use italics for foreign words. For references with up to 6 authors use all author names. For 7 authors or more, use et al. after third author name. Use Index Medicus abbreviations for journal titles.

Examples:

*Abstracts*

Kiaii M, Kianfar C, Heidenheim AP, Lindsay RM. What "blood volume" do we dialyze? (abstract). *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:277A.

*Papers in journals*

Twardowski ZJ, Van Stone JC, Haynie J. All currently used measurements of recirculation in blood access by chemical methods are flawed due to intradialytic disequilibrium or recirculation at low flow. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(6):1046-1058.

*Papers in supplements to journals*

Stenvinkel P. The role of inflammation in the anaemia of endstage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2001; 16(Suppl 7):36-40.

*Papers in supplements numbered separately*

Lonnemann G. The quality of dialysate: An integrated approach. *Kidney Int Suppl.* 2000; 76:S112-119.

#### *Edited books*

Amerling R, Cu GA, Dubrow A, Levin NW, Osheroff RJ. Complications during hemodialysis. In: Nissenson AR, Fine RN, Gentile DE. eds. *Clinical Dialysis*, 3rd ed. Norwalk, CN: Appleton & Lange, 1995; 235-267.

#### *Books*

Singh KS, Reinhold N. *The Genesis of Life*. Elmsford, NY: Pergamon Press, 1984.

**Figure Legends.** Each figure should be briefly and clearly described, with all unique abbreviations defined. Remarks such as "For explanation, see text" should be avoided. List Figure Legends after the References section.

**Tables.** Tables should be typed on separate sheets, numbered consecutively with Arabic numerals (e.g., Table 1, Table 1-3, etc.), and given a title. Do not use vertical lines in tables. All unique abbreviations must be defined. Do not submit images as tables; all tables must be editable text.

**Figures.** All photographs, graphs, and diagrams are referred to as Figures (e.g., Figure 1, Figures 1-3) and are numbered consecutively throughout in Arabic numerals. The journal accepts TIFF, JPG, and EPS file formats ONLY. Line art (charts and graphs) should have a resolution of at least 600 dpi at final size. Pictures should have a resolution of at least 300 dpi at final size. Any letters and numbers in the illustrations must be legible when the figures are reduced. More detailed information on the submission of electronic artwork can be found [here](#).

Each figure must be uploaded as an individual file at time of manuscript submission.

If a figure has been published previously, acknowledge its source and submit written permission of the author and publisher on a permission form; the source of the figure should be included in the list of references.

**Supporting Information (supplementary material).** *Hemodialysis International* hosts Supporting Information (supplementary material) as an online-only add-on to published articles. Supporting information is submitted with a paper and must be important, ancillary information that is relevant to the parent article but cannot be included in the published version (extra tables and figures, large data sets, video clips, etc). Supporting Information should not include references or be used to submit primary material in avoidance of restrictions on article length or the permitted number of tables or figures. All Supporting Information must be referred to in the manuscript text and include a legend. Submit Supporting Information files independently of primary manuscript materials and include "supporting" or "supplementary" in file names (for example, "supp\_table 1.doc"). Supporting Information will be published as submitted and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. Full instructions for submitting Supporting Information can be found [here](#).

**Revisions.** When submitting a revision, please include a marked copy of the manuscript showing the changes made ("track changes," colored text, or highlighting are all acceptable methods). Please also include a detailed "Response to Review" in which the authors respond to reviewer and editor comments point-by-point, so the revision can be thoroughly understood and evaluated.

#### **CHECKLIST FOR SUBMISSION**

- Manuscript: Single document (title page; abstract and keywords; text; references; figure legends; tables)
- Figures: separate uploads (individual TIFF, JPG, or EPSfiles)
- Any necessary permission/disclosure forms or Supporting Informationfiles
- FOR REVISIONS: Marked revision and point-by-point response to review

#### **Copyright License**

Accepted articles cannot be published until the publisher has received the appropriate signed license agreement. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log into Wiley's Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### **For authors signing the standard copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the standard copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be reviewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

#### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs

hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>

### **Proofs**

Authors of accepted manuscripts will be notified by e-mail when their page proofs are ready to download. Page proofs are produced as PDF (Portable Document Format) files and full instructions for accessing them are contained in the e-mail notification. The answered query sheet and any corrections should be returned directly to the publisher by e-mail or fax within 48 hours of receipt to allow for accommodation of authors' corrections and to avoid publication delay.

### **Early View**

*Hemodialysis International* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

**Author Material Archive Policy:** Please note that unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor as soon as possible, if you have not yet done so.